

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

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Funkční studie potenciální nukleotidasy kódované genem *spr1057* *Streptococcus pneumoniae*, homologa proteinu YjjG *Escherichia coli*.

Functional study of the putative nucleotidase encoded by *spr1057* gene in *Streptococcus pneumoniae*, a likely homolog of *Escherichia coli* protein YjjG.

Bc. Zuzana Vacková

Praha, 2010

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři buněčné signalizace pod odborným vedením RNDr. Pavla Brannyho, CSc.

Práce vznikla v letech 2008 - 2010 za podpory Grantové agentury ČR, projekt byl registrován pod číslem 204/08/1423 (název projektu: Funkční vztah mezi aktivitou Ser/Thr proteinkinás a virulencí patogenních mikroorganismů).

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Pavla Brannyho, CSc. a použila jsem jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Za odborné vedení této práce děkuji Pavlovi Brannymu. Dále můj dík patří především Janě Goldové a Lindě Novákové za cenné rady a trpělivost, se kterou mi pomáhali při provádění laboratorní práce. Děkuji i celému zbytku laboratoře buněčné signalizace za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Své rodině a kamarádům děkuji za podporu.

OBSAH

1	ABSTRAKT.....	Chyba! Záložka není definována.
2	ÚVOD	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
3.1.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> a historie	11
3.1.2	Taxonomická klasifikace <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
3.1.3	Morfologické a fyziologické vlastnosti <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
3.1.3.1	Morfologie	12
3.1.3.2	Růstové a kultivační podmínky.....	13
3.1.3.3	Fysiologie.....	13
3.1.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i> jako lidský patogen	15
3.1.4.1	Patogenita.....	15
3.1.4.2	Patogeneze	18
3.1.4.3	Terapie	20
3.1.4.4	Prevence	20
3.1.5	Genetická výbava <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
3.2	Základní mechanismus přenosu informací a signálů	24
3.2.1	Fosforylace a defosforylace proteinů	25
3.2.2	Proteinkinasy.....	25
3.2.3	<i>S. pneumoniae</i> a proteinkinasy.....	27
3.3	Haloacid dehalogenasy	30
3.3.1	Obecná charakteristika haloacid dehalogenas.....	30
3.3.2	„House - cleaning“ úklidové funkce enzymů.....	33
3.3.3	Jednotlivé bakteriální haloacid dehalogenasy.....	35
3.3.3.1	Rod <i>Escherichia coli</i>	35
3.3.3.2	Rod <i>Pseudomonas</i>	38
3.3.3.3	Rod <i>Proteus</i>	39
3.3.3.4	Rod <i>Haemophilus</i>	39
3.3.3.5	Rod <i>Salmonella</i>	40
3.3.3.6	Rod <i>Porphyromonas</i>	40
3.3.3.7	Rod <i>Burkholderia</i>	41
3.3.3.8	Rod <i>Sulfolobus</i>	41
3.3.3.9	Rod <i>Pyrococcus</i>	41
3.3.3.10	Rod <i>Thermococcus</i>	42
3.3.3.11	Rod <i>Sacharomyces</i>	42
3.3.3.12	Rod <i>Plasmodium</i>	42
4	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	43
5	MATERIÁL A METODIKA	44
5.1	MATERIÁL	44
5.1.1	Bakteriální kmeny	44
5.1.2	Vektory.....	45
5.1.3	Oligonukleotidy	46
5.1.4	Enzymy modifikující DNA	47
5.1.5	Protilátky	48
5.1.6	Standardy	48

5.1.7	Komerční soupravy	48
5.1.8	Membrány	49
5.1.9	Filmy	49
5.1.10	Kazeta	50
5.1.11	Chemikálie	50
5.1.12	Roztoky a pufry	53
5.1.13	Média	55
5.1.14	Laboratorní přístroje	56
5.1.15	Programy a Software	57
5.2	METODIKA	59
5.2.1	Manipulace s bakteriálními buňkami	59
5.2.1.1	Kultivační metody	59
5.2.1.1.1	Kultivace <i>Streptococcus pneumoniae</i>	59
5.2.1.1.2	Kultivace <i>Escherichia coli</i>	59
5.2.1.1.3	Tvorba konzerv <i>S. pneumoniae</i>	59
5.2.1.1.4	Tvorba konzerv <i>E. coli</i>	59
5.2.1.1.5	Zjišťování citlivosti <i>S. pneumoniae</i> k analogům basí DNA	60
5.2.1.1.6	Inkorporace analogů basí do DNA <i>S. pneumoniae</i> in vivo	60
5.2.1.1.7	Mechanická desintegrace buněk	60
5.2.2	Manipulace s DNA	60
5.2.2.1	Izolace DNA	60
	Izolace chromosomální DNA <i>S. pneumoniae</i>	60
	Izolace plasmidové DNA <i>E. coli</i> metodou alkalické lyze	61
	Izolace plasmidové DNA <i>E. coli</i> pomocí komerční soupravy (QIA prep Spin Miniprep kit, QIAGEN)	61
5.2.2.2	Precipitace DNA	61
5.2.2.3	PCR	62
	Amplifikace částí DNA pomocí PCR	62
	Koloniová PCR	66
	Purifikace PCR směsi	66
5.2.2.4	Elektroforesa DNA	66
	Analytická DNA elektroforesa	66
	Preparativní DNA elektroforesa	67
5.2.2.5	Štěpení DNA restrikčními endonukleasami	67
	Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas	67
	Purifikace restrikční směsi	67
5.2.2.6	Ligace molekul DNA	67
	Ligace molekul DNA	67
	Ligace pomocí In-fusion systému	68
5.2.2.7	Transformace	68
	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> JM109	68
	Příprava jednorázových kompetentních buněk <i>E. coli</i> BL21	68
	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> (JM109, BL21) plasmidovou DNA teplotním šokem	68
	Transformace SURE Elektroporation - Competent <i>E. coli</i> plasmidovou DNA elektroporací	69
	Transformace <i>S. pneumoniae</i>	69
5.2.2.8	Imunodetekce	69
5.2.3	Manipulace s proteiny	70
5.2.3.1	Indukce a proteinová exprese	70

Indukce a proteinová exprese v <i>E. coli</i> pomocí IPTG	70
Indukce a proteinová exprese v <i>S. pneumoniae</i> pomocí maltosy.....	70
Indukce a proteinová exprese v <i>S. pneumoniae</i> pomocí Zn ²⁺	71
5.2.3.2 Frakcionace proteinů.....	71
5.2.3.3 SDS-PAGE elektroforesa.....	71
5.2.3.4 Barvení proteinového gelu Commasie Blue	72
5.2.3.5 Přenos proteinů na membránu (Western přenos).....	72
5.2.3.6 Imunodetekce	73
5.2.3.7 Izolace a purifikace proteinů.....	73
Purifikace a izolace proteinů s chitinovou kotvou	73
Izolace proteinů s histidinovou kotvou	74
5.2.3.7 Dialýza proteinů	74
5.2.3.8 Měření koncentrace proteinu.....	74
5.2.3.9 Koncentrování proteinů.....	74
5.2.3.10 Fosfatasová reakce	75
6 VÝSLEDKY	76
6.1 Analýza sekvence proteinu Spr1057 <i>S. pneumoniae</i> jako možného homologa proteinu YjjG <i>E. coli</i>	76
6.2 Testování citlivosti <i>S. pneumoniae</i> k analogům basí.....	80
6.3 Inkorporace analogů bází do DNA <i>S. pneumoniae</i> in vivo	89
6.4 Manipulace s genem spr1057 <i>S. pneumoniae</i>	91
6.4.1 Amplifikace genu <i>spr1057 L a S</i>	91
6.4.2 Klonování genu <i>spr1057 L</i> do vektoru	93
6.4.3 Transformace expresního plasmidu do buněk <i>E. coli</i> BL21	101
6.5 Manipulace s proteinem Spr1057 L a S <i>S. pneumoniae</i>	101
6.5.1 Exprese proteinu Spr1057 L a S	101
6.5.2 Izolace a purifikace proteinu Spr1057L.....	104
6.6 Testování aktivity proteinu Spr1057L <i>S. pneumoniae</i>	105
6.6.1 Závislost aktivity proteinu Spr1057L na pH.....	108
6.6.2 Závislost aktivity proteinu Spr1057L na teplotě.....	109
6.6.3 Závislost aktivity proteinu Spr1057L na iontech.....	109
6.6.4 Substrátová specifita proteinu Spr1057L.....	110
6.7 Komplementační testy.....	123
6.7.1 Příprava komplementačního konstruktů na bázi vektoru pCEP a komplementace	124
6.7.2 Příprava komplementačního konstruktů na bázi vektoru pJWV25 a komplementace	127
6.8 Příprava konstruktů pro tvorbu mutantů spr1057 <i>S. pneumoniae</i>	130
7 DISKUSE.....	132
8 SOUHRN	138
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	140
10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	141

Functional study of the putative nucleotidase encoded by *spr1057* gene in *Streptococcus pneumoniae*, a likely homolog of *Escherichia coli* protein YjjG.

Bacterial cells are constantly exposed to innumerable toxic substances, either in their external environment or by by-products of their own metabolism. For these reasons, the bacterial cells evolved several mechanisms to cope with this challenge. These mechanisms are represented by: blocking the uptake, export by specific transporters as well as specific inactivation of these substance by enzymes. A particular group of these toxic substances are noncanonica nucleotides, which can directly inhibit bacterial cell DNA replication or can result in increased mutation rate. Enzymes recognizing these modified derivatives are known as „house-cleaning“ nucleotide phsphateses, which can inactivate the potentially mutagenic nucleotides and prevent their incorporation into DNA and RNA. Some of the „house-cleaning“ enzymes belong to a group of haloacid dehalogenase enzymes (haloacid dehalogenase-like hydrolase superfamily), which are found in many bacterial species.

This thesis is focused on the function of hypothetical protein Spr1057 of *Streptococcus pneumoniae* with an unknown function. Sequence comparison revealed that Spr1057 has a significant similarity to YjjG protein of *Escherichia coli*.

Analysis of transcription profile of the mutant in the *stkP* gene encoding a eukaryotic-type Ser/Thr protein kinase of *S. pneumoniae* revealed that there is a large decrease (59-fold) in expression for the *spr1057* gene. This gene encodes a homologue of the haloacid dehalogenase (HAD)-like protein superfamily, which includes a variety of enzymes with different functions. The *E. coli* YjjG protein, a member of the HAD superfamily, exhibits a high-phosphatase activity towards nucleotide monophosphates. It is thought that this enzyme could be protect the cell against noncanonical pyrimidine derivatives and prevent the incorporation of potentially mutagenic nucleotides into DNA.

The aim of this thesis was:

Theoretical evaluation of Spr1057 hypothetical protein with unknown function as a potential homologue of YjjG protein of *E. coli*.

The study focused on the sensitivity of *S. pneumoniae* Δ stkP mutant strain to mutagenic nucleotides.

Expression, isolation and purification of recombinant protein Spr1057.

Analysis of the biochemical properties of purified recombinant protein Spr1057

Streptococcus pneumoniae

eukaryotic-type protein kinase - protein kinasy eukaryotního typu

Ser/Thr protein kinase - Ser/Thr protein kinasa

haloacid dehalogenase-like hydrolase superfamily - haloacid dehalogenasy z rodiny

hydrolas

HAD hydrolase - HAD hydrolasy

noncanonical bases - modifikované base

mutagenic nucleotides - mtagení nkleotidy

YjjG protein *E. coli* - protein YjjG *E. coli*

Spr1057 protein *S. pneumoniae* - protein Spr1057 *S. pneumoniae*

2 ÚVOD

Bakteriální buňky jsou neustále vystavovány nespočetným toxickým látkám, ať už z vnějšího prostředí či vedlejším produktům jejich vlastního metabolismu. Z těchto důvodů jsou bakteriální buňky vybaveny několika mechanismy, které tyto toxické látky eliminují. Jedná se hlavně o: blokaci absorpce, transport specifickými transportéry a specifickou inaktivací těchto látek enzymy.

Zvláštní skupinou z těchto toxických substancí jsou modifikované nukleotidy, které mohou v bakteriální buňce přímo zabránit replikaci DNA, nebo způsobit mutace. Enzymy rozpoznávající tyto modifikované deriváty se označují jako „house-cleaning“ „úklidové“ nukleotidfosfatasy, působí na modifikované potenciálně mutagenní nukleotidy a zabraňují tak jejich včlenění do DNA či RNA.

Část těchto „úklidových“ enzymů se řadí do skupiny haloacid dehalogenas (haloacid dehalogenase-like hydrolase superfamily) nalezených u mnoha bakteriálních druhů.

Předkládaná diplomová práce se zabývá hypotetickým proteinem Spr1057 *S. pneumoniae* s dosud neznámou funkcí. Analýza jeho sekvence prokázala, že je homologní s proteinem YjjG *E. coli*. U proteinu YjjG byla prokázána vysoká afinita vůči modifikovaným nukleotidům a tak přiřazena funkce „úklidové“ nukleotidfosfatasy.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Streptococcus pneumoniae*

***Streptococcus pneumoniae* a historie**

Streptococcus pneumoniae je velmi významná bakterie, běžně označována též jako pneumokok. Byla objevena a popsána již v roce 1881. O tento objev se zasloužili nezávisle na sobě Louis Pasteur a George Miller Sternberg. Protože se jedná o bakterii pro člověka patogenní a v mnoha ohledech zajímavou, byla již od svého objevení studována. Do doby objevení antibiotik 1940 závažně komplikovala lidstvu existenci a to velkým počtem úmrtí za které byla zodpovědná (LOPEZ, 2004). *S. pneumoniae* se také jako modelový mikroorganismus výrazně podílel na výzkumu přirozené kompetence. První pokus potvrzující transformaci provedl roku 1928 Griffith pomocí *S. pneumoniae* na myších. Teprve v roce 1944 však Avery, McLeod a McCarthy podali vysvětlení co je látkou vedoucí k bakteriální transformaci a že nositelkou genetické informace je DNA. V posledních desetiletích je *Streptococcus pneumoniae* studován ve vztahu k nemocem jež způsobuje. Velká pozornost je věnována jeho odolnosti k antibiotikům a množství dětských onemocnění jež způsobuje.

3.1.2 Taxonomická klasifikace *Streptococcus pneumoniae*

říše - Bakteria

oddělení - Firmicutes

třída - cocci

řád - Lactobacillales

čeleď - Streptococcaceae

rod - *Streptococcus*

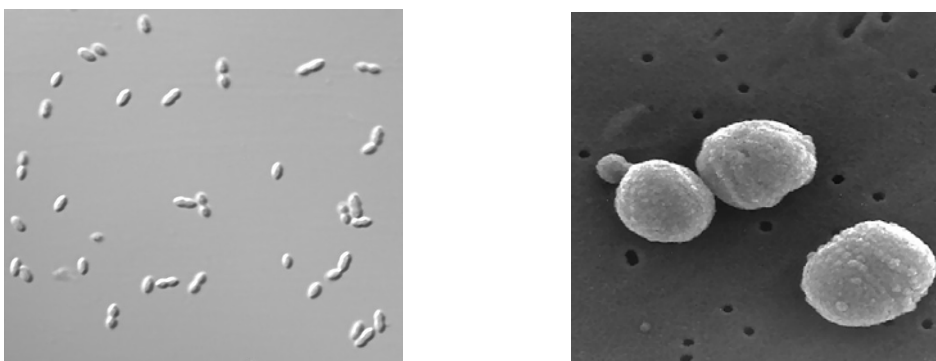
druh - *Streptococcus pneumoniae*

U *S. pneumoniae* je také důležitý termín sérotyp. Séroskupina zahrnuje více antigenních typů vzájemně příbuzných. Pro označení sérotypů *S. pneumoniae* se obecně využívá tzv. dánská nomenklatura. Sérotyp je značen buď pouze číslicí, neexistuje-li další antigenní varianta, nebo kombinací číslice a písmene, pokud je popsáno více antigenních typů v rámci séroskupiny. Rozložení sérotypů se liší v závislosti na geografických a etnických faktorech (LOVEČKOVÁ et al. 2002). Rozlišujeme více než 90 sérotypů *S. pneumoniae* podle typu pouzdrného antigenu.

3.1.3 Morfologické a fyziologické vlastnosti *Streptococcus pneumoniae*

3.1.3.1 Morfologie

Morfologicky se jedná o grampozitivní koky vyskytující se převážně ve dvojicích, tzv. diplokoky. Mají lancetovitý (zašpičatělý) tvar.



Obr. 3. 1. : Obraz *S. pneumoniae* elektronovou mikroskopií a skenovací elektronovou mikroskopií (www.biomed.cas.cz)

U této bakterie je možné z hlediska morfologie rozlišit dvě formy:

- 1) neopouzdržené kmeny - rostou v drsných koloniích „R fáze“ („neprůhledné“)
- nevirulentní
- 2) opouzdržené kmeny - rostou v hladkých až mukózních koloniích
„S fáze“ až „M fáze“ („průhledné, transparentní“),
pouzdro obklopuje celou dvojici a často se tvoří i řetízky
diplokoků
- virulentní

Bakteriální organismus dokáže střídavě měnit tyto fáze.

Fenotypové rozdíly transparentní a neprůhledné formy *S. pneumoniae*:

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

Tab. 3. 1. : *S. pneumoniae* fenotypové rozdíly (GILLESPIE AND BALAKRISHNAN, 2000)

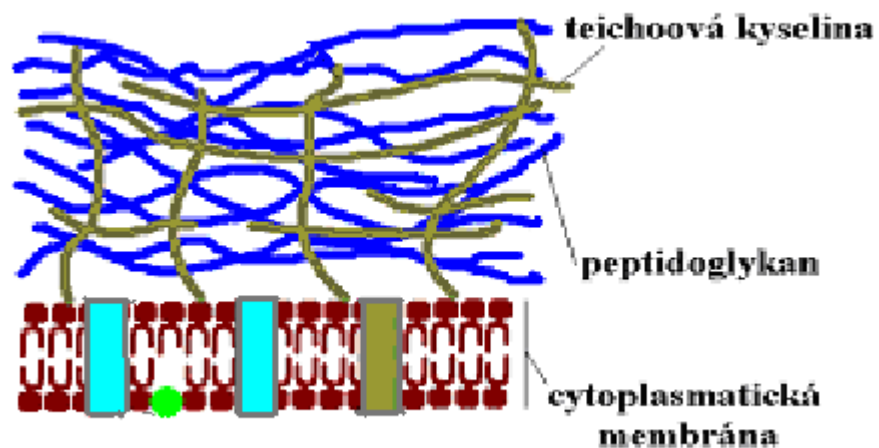
3.1.3.2 Růstové a kultivační podmínky

Z hlediska kultivačních podmínek se jedná o relativně náročnou bakterii. Buňky *S. pneumoniae* rostou při teplotě okolo 37°C. Většina bakteriálních kmenů vyžaduje anaerobní podmínky (fakultativně anaerobní). Na krevním agaru roste *S. pneumoniae* v koloniích, jež jsou obklopeny zónou α hemolýzy, tzv. viridaci (jedná se o zelené zbarvení půdy okolo kolonií způsobené přeměnou hemoglobinu na methemoglobin).

3.1.3.3 Fysiologie

Bakterie *S. pneumoniae* jsou grampozitivní koky. Tyto bakterie mají charakteristické složení buněčné stěny. U grampozitivních bakterií je stavba buněčné stěny jednodušší, je tvořena pouze peptidoglykanem tzv. mureinem (lineární polymer dvou střídajících se aminocukrů: N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové) a teichoovými kyselinami (glycerolteichoové kys., ribitolteichoové kys.). Na N-konci acetylmuramové kyseliny je navázán řetízek čtyř aminokyselin. Typickou kombinací aminokyselin je L-alanin - D-glutamová kys. - R - D-alanin. R je proměnlivá aminokyselina, nejčastěji se jedná o L-lysin, L,L-diaminopimelová kyselina (DAP) či L-ornithin. Jednotlivé tetrapeptidové řetízky jsou mezi sebou navzájem propojeny pomocí

jedné či více pomocných aminokyselin. Díky tomuto propojení se z lineárního polymeru stává pevná síťovina. Peptidoglykan tedy vytváří 15 - 50nm silnou vrstvu složenou z mnoha vrstev lineárních řetězců navzájem propojených do síťoviny. Skrz tuto silnou vrstvu pronikají od cytoplasmatické membrány až na povrch lineární řetězce teichoových kyselin. Teichoové kyseliny jsou kovalentně vázány k muramové kyselině peptidoglykanu. Jedná se o kyseliny bohaté na galaktosamin a cholin. U bakterií se cholin v buněčné stěně vyskytuje pouze velmi výjimečně. Cholin je nepostradatelným růstovým faktorem a jeho přítomnost je nezbytná pro činnost autolysinů, pro transformaci a podílí se na ukotvení povrchových proteinů (MORONA et al., 2003). Cholin je také důležitý pro patogenitu *S. pneumoniae*, díky možnosti adherence cholinu na cholin-vazebné receptory lokalizované v lidských buňkách. Buněčná stěna gram pozitivních bakterií neobsahuje lipidy. Běžně zde také nenacházíme proteiny a v tomto ohledu streptokoky představují výjimku. Mohou mít proteiny kovalentně navázané na povrchu, udílející jim specifické antigenní vlastnosti.



Obr. 3. 2. : Buněčná stěna gram pozitivních bakterií

Pneumokoky jsou bakterie obklopené pouzdrém. Pouzdro se nachází nad buněčnou stěnou a tvoří ho pouzdrné polysacharidy. Chrání bakterii před nepříznivými vlivy okolí a má antigenní vlastnosti. Z hlediska funkčnosti je pro pneumokoky hlavním virulencním faktorem, neboť zabraňuje fagocytóze. Pouzdro často obklopuje celé diplokoky a vytváří se tak řetízky. Na syntéze pouzdra se podílí tzv. *cps* geny (capsular polysacharide CPS). Tři tyto geny jsou pro pneumokoka nepostradatelné - *cpsC* (protein fosforylující CpsD), *cpsB* (Tyr proteinfosfatasa) a *cpsD* (Tyr proteinkinasa) (MORONA et al. 2003).

S. pneumoniae patří mezi nesporulující bakterie, které nemají schopnost přeměňovat své vegetativní formy buněk za nepříznivých okolních podmínek na klidové formy buněk.

Buňky *S. pneumoniae* nejsou pohyblivé a to přesto, že někdy lze nalézt buňky které mají pili, neslouží k pohybu, nýbrž k adhezenci.

Jedná se o fakultativně anaerobní (mikroaerofilní) bakterie. Jsou schopné adaptace a energii získávají jak oxidativní fosforylací tak fermentací.

Pneumokoky patří vzhledem k jejich požadavkům na teplotu mezi tzv. mezofilní bakterie, charakterizované optimálními teplotními podmínkami při 20 – 40°C. Pro *S. pneumoniae* je ideální teplota prostředí 37°C, jako u většiny lidských kolonizátorů a patogenů.

Podle způsobu získávání energie se jedná o chemotrofní bakterie (oxidace substrátů) a podle zdrojů uhlíku jsou pneumokoky heterotrofní bakterie (organické látky). Celkově se tento typ bakterií označuje jako chemoheterotrofní bakterie.

Pneumokok, stejně jako většina významných patogenních bakterií vyžaduje optimálně neutrální pH okolo 7.

3.1.4 *Streptococcus pneumoniae* jako lidský patogen

3.1.4.1 Patogenita

Patogenita je schopnost bakteriálního druhu vyvolat onemocnění. Míru patogenity, jako kvantitativní popis charakterizuje virulence, typická pro bakteriální kmeny.

S. pneumoniae je běžný kolonizátor sliznic horních cest dýchacích v nevirulentní formě. Jedná se tedy o běžnou součást přirozené mikroflóry (MORONA et al., 2003). Výskyt v nosohltanu (nasopharyngu) a ústní části hltanu (oropharyngu) je u 15% dětí a 5% dospělých.

U virulentních forem je hlavním faktorem patogenity pouzdro (HAMMERSCHMIDT et al., 2005). Dříve byla přítomnost pouzdra považována za jediný virulenci faktor, tato domněnka se však nepotvrdila. Ukázalo se, že se vyskytuje celá řada dalších virulenci faktorů jež se na vzniku onemocnění mohou podílet.

Mezi virulenci faktory se dnes řadí:

- 1) Amidasy - Autolytické enzymy hydrolyzující peptidoglykan (vazbu mezi N-acetylmuramovou kys. a alaninovým zbytkem. Fragmenty rozštěpeného peptidoglykanu mohou následovně zasahovat do krevního srážení a způsobovat koagulopatie.
- 2) Autolysin LytA - Autolytický enzym hydrolyzující bakteriální buněčnou stěnu, jejíž složky pak způsobují zánětlivou reakci. Podílí se také na uvolnění pneumolysinu a jiných povrchových proteinů.
- 3) Hyaluronidasa - Enzym štěpící kys. hyaluronovou extracelulární matrix a přispívající k průniku a šíření bakterií. Tento enzym je lokalizován na povrchu bakterie.
- 4) Neuraminidasa - Enzym štěpící glykoproteiny a glykolipidy, čímž přispívá k šíření bakterií v infikované tkáni.
- 5) Pneumolysin - Toxin lokalizovaný v cytoplasmě, uvolňující se v závislosti na činnosti povrchového autolysinu. Pneumolysin má cytotoxický efekt na epitelální buňky průdušek vedoucí k hemoragiím a plicním edémům. Dále inhibuje fagocyty a buňky imunitního systému, čímž zpomaluje imunitní odpověď. Pneumolysin je tzv. cholesterol dependentní cytolysin, což znamená, že se váže na cholesterol v cytoplasmatické membráně hostitelské buňky, kde oligomerizuje a tento proces vede ke vzniku pórů.
- 6) Pouzdro - Brání fagocytose alveolárními makrofágy. Je polysacharidové z polysacharidových typových antigenů. Pouzderný polysacharid není toxický. Je obtížně degradovatelný a proto dlouhou dobu přetrvává v tělních tekutinách, kde může být prokázán. Volná forma tohoto polysacharidu je označována jako SSS - specifická solubilní substance. Mohou se na ni vázat specifické protilátky in vivo.
- 7) Povrchové proteiny - PspA (pneumococcal surface protein A):

Protein nacházející se v buněčné stěně pneumokoka, účastní se ochrany bakteriální buňky před komplementem a fagocytózou.

PsaA (pneumococcal surface antigen A):

Povrchový antigen fungující jako transportér Mn^{2+} a Zn^{2+} do cytoplasmy bakterie. Mutace v genu *psaA* vede ke ztrátě virulence.

CbpA (cholin binding protein A):

Cholin vazebný protein má specifický cholin vazebný motiv pomocí kterého se váže na zbytek kys. teichoové či kys. lipoteichoové a uskutečňuje tak adhezi na hostitelské tkáň.

8) Purpuru - produkující faktor - Toxická substance uvolňující se při rozpadu bakterií.

S. pneumoniae patří k bakteriím, které se mohou téměř bez problémů množit v krevním řečišti a zde svou metabolickou aktivitou ohrožují lidský organismus metabolickým rozvratem.

Lidský organismus, a to hlavně dětský, je také vystaven riziku vzniku nosičství *S. pneumoniae*. Zde poté hrozí riziko vzniku endogenní infekce. Z nosohltanu či ústní části hltanu se bakterie mohou šířit do plic, vedlejších dutin nosních (paranasální dutiny), středouší a na mozkové pleny (meningy). Při bakteriémii může dojít k zanesení i do jiných lokalit.

Vzhledem k běžnému výskytu *S. pneumoniae*, jak na sliznicích horních cestách dýchacích bez vzniku onemocnění, tak i k výskytu onemocnění způsobené touto bakterií zařazuje se *S. pneumoniae* do skupiny potenciálních patogenních bakterií. Pro tyto bakterie je typické, že se jako patogenní bakterie uplatňují za situace kdy je lidský organismus oslaben. Pneumokoky tedy dočasně bezpříznakově kolonizují lidské sliznice horních cest dýchacích, ale při selhání obraných mechanismů mohou bakterie proniknout do doposud sterilních prostor a způsobit infekce (HAVLÍK, 2008). A to jak lokálně na sliznici dýchacích cest či celkově lidského organismu. Ke vzniku lokálních infekcí dochází nejčastěji na podkladu jiné respirační infekce či chronického respiračního onemocnění. Systémové poškození (invazivní) se rozvíjí po vniknutí bakterií do krevního řečiště a ohrožuje zdraví i život dospělých i dětí. Tato situace může postihnout hlavně nemocné osoby (poškození sleziny, jater, AIDS atd.), alkoholiky nebo starší jedince.

Onemocnění způsobená *S. pneumoniae*: respirační onemocnění

otitis media

sinusitis

pneumoniae

peritonitis
perikarditis
endokarditis
arthritis
osteomyelitis
meningitidis
abscesy
sepsy
novorozenecké infekce
infekce genitálního traktu

Přenos je interhumánní, respiračními sekrety a aerosolem, tzv. kapénkovou nákazou. Místo vstupu infekce je nejčastěji nosohltan. Při endogenní nákaze dochází k aspiraci z horních cest dýchacích. U novorozeneckých infekcí dochází k aspiraci pneumokoků z kontaminovaného cervikovaginálního sekretu.

Inkubační doba vzniku onemocnění je 1-3 dny.

Období nakažlivosti může být dlouhé, zejména u bezpříznakových nosičů. Po zahájení terapie antibiotiky nakažlivost končí během 24-48 hodin.

U pneumokokových onemocnění se předpokládá všeobecná vnímavost. Imunita je podmíněna přítomností baktericidních antikapsulárních protilátek, jež jsou získávány transplacentárně, po prodělaném onemocnění a po imunizaci.

3.1.4.2 Patogeneze

Patogeneze je soubor mechanismů vedoucích ke vzniku onemocnění. Důležité je jak etiologické agens vniká do organismu, kde se lokalizuje a co narušuje či způsobuje. Sleduje vznik, průběh a zakončení nemoci. Pochopení mechanismů nemoci je důležité při volbě správné terapie.

Rozvoj pneumokokové infekce je výsledkem vzájemné interakce mezi virulenčními faktory kmene *S. pneumoniae* a imunitní odpovědí hostitelského organismu. Na vzniku onemocnění se tedy uplatňuje více faktorů, jednak virulenční schopnosti daného bakteriálního kmene, imunitní obrana hostitele a neméně i vlivy okolí.

S. pneumoniae má velký soubor virulenčních faktorů, jež mu umožňují kolonizovat rozsáhlé sliznice lidského organismu. Nejčastěji tyto bakterie kolonizují nosohltan a ústní část hltanu, kde jsou nejvhodnější podmínky pro růst pneumokoků (KADIOGLU et al.,

2006) Dále je toto místo pro bakterie výhodné vzhledem k možnosti rozšíření bakterií. Jak do dolních cest dýchacích tak do krve (ORIHUELA et al., 2004). Kolonizovaný organismus musí rychle vyvolat imunitní odpověď. Jelikož tato odpověď vzniká pomaleji u dětí než u dospělých jedinců, mají dětské infekce častěji závažnější charakter. Na vzniku onemocnění může hrát roli i okolní prostředí. V horních cestách dýchacích se vyskytují běžně různé bakterie vytvářející běžnou flóru. Tyto bakterie mohou mít symbiotické či kompetiční vztahy s pneumokoky, proto vznik onemocnění závisí i na složení této fyziologické mikroflory.

S. pneumoniae poškozuje svého hostitele různými způsoby:

- a) adheze a invaze do buněk
- b) produkce toxinů
- c) vznik zánětlivé reakce a uvolnění cytokinů (infekce, šok)

Adheze je schopnost bakterie se pomocí různých mechanismů navázat na buněčné povrchy. U *S. pneumoniae* bylo zjištěno, že schopnost adheze úzce souvisí s vlastností zvanou opacita - neprůhlednost. Lidské sliznice snadno kolonizují pneumokoky v transparentních formách. Tyto rozdílné schopnosti obou forem bakterií souvisí převážně s rozdílným zastoupením povrchových proteinů v buněčné stěně (GILLEPSIE and BALAKRISHMAN, 2000). Na adhezi *S. pneumoniae* se podílí hlavně pneumokokový povrchový adhezín A (PsaA), povrchový proteín A (PspA), povrchový proteín C (PspC) a cholin vazebný proteín A (CbpA).

Invaze, proces proniknutí bakterií a jejich šíření je u pneumokokových infekcí představován šířením bakterií do dolních cest dýchacích popřípadě do krevního oběhu u invazivních postižení. Na tomto procesu se podílejí hlavně enzym hyaluronidasa, neuraminidasa, a také toxin pneumolysin.

Na následném poškození hostitele zánětlivou reakcí se uplatňují autolytické enzymy, pneumolysin, pouzdro atd. (MORONA et al. 2006). Vznikne tedy zánětlivá reakce a možná následná migrace bakterií krví.

Lidský organismus se pneumokokům brání imunitní odpovědí. Dochází k uvolnění cytokinů. Cytokiny, jako signální proteiny účastníci se imunitní odpovědi se uvolňují jako následek adheze bakterií na buňky. Produkují se pouzdrově specifické IgA slizniční protilátky, následně se zvyšuje syntéza protilátek IgG proti pneumokokovému povrchovému proteínu PsaA a IgM proti kapsulárním polysacharidům (RICHARDS et al., 2009).

3.1.4.3 Terapie

Původně byl téměř výhradně volbou léčby pneumokokových onemocnění penicilin. Dnešní terapeutické možnosti se zhoršují s narůstající rezistencí pneumokoků na antibiotika. Proto je nezbytné před započatím terapie určení citlivosti *S. pneumoniae* na antibiotika. V případě nezbytnosti rychlého zahájení antibiotické terapie lze zahájit terapii širokospektrálním antibiotikem a dodatečně jí upravit po zjištění citlivosti. K léčbě se vedle penicilinu používá i erytromycin, cefalosporiny, makrolidy či chloramfenikol.

3.1.4.4 Prevence

Možnou prevencí je od roku 1983 očkování dospělých osob polyvalentní polysacharidovou vakcínou. Jedná se o vakcínu tvořenou 23 purifikovanými polysacharidovými antigeny pouzdra. Tyto polysacharidy představují hlavní antigeny u sérotypů *S. pneumoniae* způsobujících invazivní onemocnění. Problém s touto vakcínou způsobuje její nemožnost použití u dětí do dvou měsíců, protože mají omezenou protilátkovou odpověď na polysacharidové složky díky nevyzrálému imunitnímu systému (BOGAERT et al., 2004).

U dětí se používají konjugované vakcíny, které mají v podmínkách neúplně vyzrálého imunitního systému vyšší schopnost tvorby protilátek.

Komerční vakcíny registrované v ČR:

1) PNEUMO 23 - Vakcína připravená z purifikovaných kapsulárních polysacharidových antigenů, získaných ze 23 sérotypů *Streptococcus pneumoniae*, které jsou odpovědné přibližně za 90% všech invazivních pneumokokových infekcí. Imunita se objevuje za 2 až 3 týdny po vakcinaci. Určena pro dospělé osoby a děti starší 2 let.

(účinná látka - Polysaccharidum Streptococci pneumoniae typus: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F)

2) PREVENAR - Pneumokoková sacharidová konjugovaná vakcína proti onemocněním vyvolaným *Streptococcus pneumoniae* 7 sérotypů (zahrnujícím sepse, meningitidy, pneumonie, bakteremie a akutní otitis media) u kojenců a dětí ve věku od 2 měsíců do 5 let. Polysacharidové antigeny jsou konjugovány s nosným proteinem CRM197 (netoxická mutanta difterického toxinu) a adsorbovány na minerální nosič (fosforečnan hlinitý).

(účinná látka - Pneumococcale polysaccharidum sérotypus 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F)

3) PREVENAR 13 - Pneumokoková sacharidová konjugovaná vakcína proti onemocněním vyvolaným *Streptococcus pneumoniae* 13 sérotypů určená k aktivní imunizaci kojenců a dětí ve věku od 6 týdnů do 5 let k prevenci invazivních onemocnění, pneumonie a akutní otitis media, vyvolaných *Streptococcus pneumoniae*. Polysacharidové antigeny jsou konjugovány s nosným proteinem CRM197 a adsorbovány na fosforečnan hlinitý.

(účinná látka - Pneumococcale polysaccharidum sérotypus 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F)

4) SYNFLORIX - Pneumokoková polysacharidová konjugovaná vakcína (adsorbovaná) pro aktivní imunizace proti invazivním onemocněním a akutní otitis media způsobeným *Streptococcus pneumoniae* u kojenců a dětí ve věku od 6 týdnů do 2 let. Polysacharidové antigeny jsou konjugovány na tři různé proteinové nosiče - protein D (odvozený z kmenů netytovatelného *Haemophilus influenzae*), tetanický toxoid, difterický toxoid, které jsou adsorbovány na fosforečnan hlinitý.

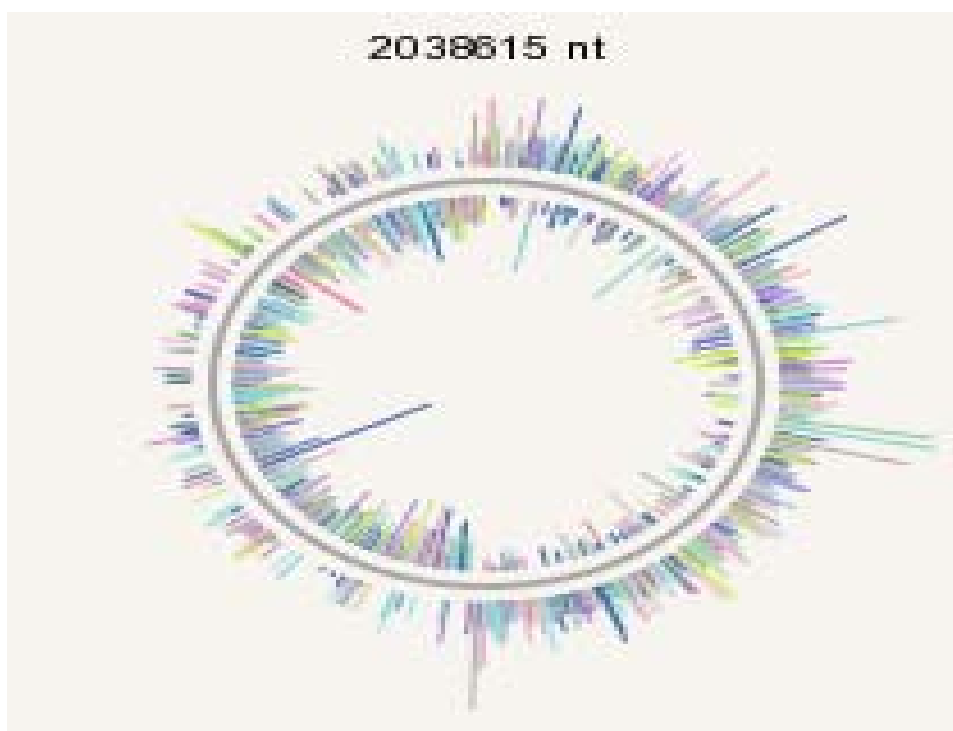
3.1.5 Genetická výbava *Streptococcus pneumoniae*

Genom *S. pneumoniae* je představován jediným cirkulárním chromosomem o velikosti dsDNA 2,1 – 2,2 Mbp. Kmeny *S. pneumoniae* mají výraznou genetickou tvárnost. V dnešní době jsou již známy sekvence mnoha kmenů *S. pneumoniae* - *Streptococcus pneumoniae* 70585, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 700669, *Streptococcus pneumoniae* CGSP14, *Streptococcus pneumoniae* D39 (LANIE et al., 2007), *Streptococcus pneumoniae* G54, *Streptococcus pneumoniae* Hungary19A-6, *Streptococcus pneumoniae* JJA, *Streptococcus pneumoniae* P1031, *Streptococcus pneumoniae* R6 (HOSKINS et al., 2001), *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (TETTELIN et al., 2001), *Streptococcus pneumoniae* Taiwan19F-14. Sekvence těchto genomů se liší hlavně přítomností 7,5 kbp dlouhého úseku odpovědného za virulenci kmene, neboť nese geny pro tvorbu pouzdra.

Kmen	Délka (Mbp)	poměr GC párů	počet proteinů	RNAs
Streptococcus pneumoniae 70585	2,2	39.7%	2202	77
Streptococcus pneumoniae ATCC 700669	2,2	39.5%	1990	90
Streptococcus pneumoniae CGSP14	2,2	39.5%	2206	70
Streptococcus pneumoniae D39	2,1	39.7%	1914	73
Streptococcus pneumoniae G54	2,1	39.6%	2115	71
Streptococcus pneumoniae Hungary19A-6	2,2	39.6%	2155	70
Streptococcus pneumoniae JJA	2,1	39.7%	2123	70
Streptococcus pneumoniae P1031	2,1	39.7%	2073	77
Streptococcus pneumoniae R6	2,1	39.7%	2042	73
Streptococcus pneumoniae TIGR4	2,2	39.7%	2105	70
Streptococcus pneumoniae Taiwan19F-14	2,1	39.8%	2044	77

Tab. 3. 2. : Charakterisované genomy *S. pneumoniae*

(NCBI Genome Bacteria complete chromosomes <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>>)



Obr. 3. 3. : Znáznornění cirkulárního genomu *S. pneumoniae* R6

(NCBI Genome Bacteria complete chromosomes <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>>)

Chromosom *S. pneumoniae* je bohatý na AT páry. Páry GC představují jen asi 39,5 – 39,8% , páry AT tedy 60,5 – 60,2%.

Genom virulentního kmene kóduje 2236 předpokládaných kódujících oblastí, 64% z nich má známou biologickou funkci, 5% genomu tvoří inzerční sekvence, které přispívají k přeskupení genomu během příjmu cizorodé DNA (TETTELIN et al., 2001).

Genetická tvárnost těchto bakterií je způsobena hlavně jejich přirozenou kompetencí, umožňující horizontální přenos genetické informace transformací. Kompetence označuje přechodný fyziologický stav bakteriální buňky, během kterého je schopna přijmout cizorodou DNA ze svého okolí. Pokud je bakterie tohoto schopna bez předchozích úprav jedná se o přirozenou kompetenci. Naopak při vyvolání tohoto stavu specifickými vlivy (chemické látky, elektrický proud, atd.) se jedná o umělou kompetenci. Schopnost přirozené kompetence se vyskytuje pouze u několika bakteriálních rodů. Typickými, nejlépe prostudovanými zástupci gram pozitivních bakterií jsou *Streptococcus pneumoniae* a *Bacillus subtilis*, gram negativních *Haemophilus influenzae* a *Neisseria gonorrhoeae* (SNYDER AND CHAMPNESS, 2003). Některé bakteriální druhy přijímají DNA snáze než jiné. Navození stavu kompetence záleží na mnoha podmínkách: růstové fáze bakterie, složení okolního prostředí i koncentraci přijímané DNA. Stav kompetence u *S. pneumoniae* je řízen systémem quorum sensing, jež je závislý na pH, koncentraci kyslíku, fosfátu, koncentraci manganatých a vápenatých iontů, teplotě a růstové fázi (CLAVERYS AND HAVARSTEIN, 2002). Celý proces funguje díky genům *com* a je indukován kompetenčním faktorem CSP (Competence Stimulating Peptide). Quorum sensing systém je mechanismus bakteriální komunikace ovládající expresi genů v závislosti na hustotě bakteriální populace. Quorum sensing je založen na produkci a detekci signálních molekul zvaných autoinduktory (SUNTHARALINGAM AND CVITKOVITCH, 2005). Quorum sensing systém se u *S. pneumoniae* skládá z následujících komponent:

- a) peptid CSP - signální peptid (Competence Stimulating Peptide)
- b) dvousložkový regulační systém ComDE - zahrnuje membránově vázanou histidinovou protinkinasu ComD, na níž se váže CSP a intracelulární DNA vazebný regulátor ComE. Geny *comC*, *comD* i *comE* tvoří jeden operon.

c) ABC transportér ComAB - transportér s proteolytickou doménou, který zajišťuje sestřih a transport CSP přes buněčnou stěnu do extracelulárního prostředí (HAVARSTEIN and MORRISON, 1999).

Přirozená kompetence je celkově u rodu *Streptococcus* rozšířená. Každý z kmenů vylučuje kompetenční faktor CSP s odlišnou primární strukturou, jež je druhově specifická a odpovídá receptorové proteinkinase ComD daného druhu. Tento mechanismus zajišťuje, že CSP produkovaný jedním druhem nebývá cizími druhy rozpoznán a nevyvolá u nich tedy kompetenci. Příslušník každé populace reaguje jen na signály vlastní skupiny. Z tohoto důvodu je velice pravděpodobné, že přirozená kompetence a následná transformace slouží k výměně DNA mezi danou příbuznou populací. Výměna DNA mezi méně příbuznými druhy by způsobila vznik nefunkčních či mozaikových genů, zatímco přenos u příbuzných bakterií vede ke vzniku funkčních genů (HAVARSTEIN and MORRISON, 1999).

Po příjmu cizorodé DNA mohou nastat dvě situace. Pokud má cizorodá DNA vysoký stupeň sekvenční homologie s hostitelskou DNA dojde pomocí homologní rekombinace ke včlenění do genomu. Cizorodá DNA může z funkčního hlediska bakterii sloužit jako zdroj nových vlastností (antibiotická rezistence, tvorba pouzdra, atd.), anebo sloužit jako templát pro rekombinační opravy DNA. Pokud ovšem je cizorodá DNA sekvenčně příliš odlišná, dojde ke vzniku mozaikových genů (geny složené z hostitelské a cizorodé DNA), jejichž produkty nemusí být funkční.

3.2 Základní mechanismus přenosu informací a signálů

Předpokladem existence všech živých organismů, ať již mnohobuněčných či jednobuněčných je schopnost vnímat a reagovat na své vnější okolí, ale zároveň i informovat okolí o své vlastní situaci. Tento dvousměrný přenos informací umožňuje buňce zachovat si stálost svého vnitřního prostředí oproti vnějším podmínkám.

Bakteriální buňky ve svém přirozeném prostředí musí neustále čelit náhlým změnám teploty, koncentrace živin, pH, osmolarity, vlhkosti, atd. a z tohoto důvodu si bakterie během evoluce vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožňují změny prostředí monitorovat a pružně na ně reagovat.

Pro proces přenosu informace a komunikace mezi buňkami u bakterií jsou klíčové molekuly proteinů. Proteiny, jež jsou součástí bakteriální buněk lze rozdělit na dvě skupiny proteinů: strukturní a funkční (enzymy), z nichž některé mají regulační a signální funkci.

Jednou z možností jak ovlivnit aktivitu příslušného enzymu je jeho modifikace. Nejdůležitější proteinové modifikace jsou fosforylace a defosforylace.

3.2.1 Fosforylace a defosforylace proteinů

Fosforylace představuje kovalentní posttranslační modifikaci proteinů a je katalyzovaná enzymy - proteinkinasami. Defosforylace je opačně probíhající reakce katalyzovaná enzymy - proteinfosfatasami.

Tyto dvě reakce představují jeden z nejdůležitějších mechanismů regulace molekulárních procesů probíhajících při odpovědi bakteriální buňky na vnitrobuněčný či mimobuněčný podnět. Velmi důležitým faktorem u těchto procesů je jejich reversibilita. Kovalentní modifikací se protein mění z neaktivního na aktivní a naopak.

3.2.2 Proteinkinasy

Mnoho let se předpokládalo, že k fosforylaci proteinů dochází pouze u eukaryot, neboť se u bakterií nedařilo úspěšně detekovat fosforylované proteiny. K jednoznačnému průkazu proteinkinasové aktivity vlastní bakteriím došlo až během sedmdesátých let 20. století (*Salmonella typhimurium* (WANG A KOSHLAND, 1978); *Escherichia coli* (GARNAK A REEYES, 1979). Prvním bakteriálním proteinem, který byl identifikován jakožto substrát proteinkinasy byla isocitrátdehydrogenasa (IDH) *E. coli* (GARNAK A REEYES, 1979). Katalytická aktivita IDH je regulována fosforylací serinu. Bylo objeveno, že fosforylace a defosforylace IDH je kontrolována bifunkční IDH kinasou/fosfatasou. V devadesátých letech byl objeven u bakterií další mechanismus přenosu signálu pomocí fosforylace proteinů uskutečňován tzv. dvousložkovým systémem (EGGER et al., 1997). Fosforylace proteinů u bakterií je tedy běžným jevem. Kromě histidinu a asparaginu mohou být fosforylované také serinové, threoninové a tyrosinové zbytky.

U prokaryot jsou fyziologické procesy regulovány více typy fosforylačních systémů. Jedná se o: Fosfoenolpyruát (PEP)-dependentní fosfotransferázový systém,

dvousložkový systém, ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinasy. Existuje několik těchto enzymů, lišících se hlavně tím, na které aminokyselině se autofosforylují. V nedávné době byly u bakterií nalezeny kromě již známých proteinkinasy prokaryotního typu i proteinkinasy eukaryotního typu. Původně se předpokládalo, že u prokaryot je přenos signálů zprostředkován jen tzv. dvousložkovými systémy skládající se v nejjednodušší podobě ze senzorové kinasy a regulačního proteinu. Nyní však už byla u některých prokaryot prokázána přítomnost také druhé skupiny regulačních proteinů sekvenčně vysoce homologních s proteinkinasami eukaryot.

Dělení typů proteinkinasy u prokaryot:

1. Fosfoenolpyruát (PEP)-dependentní fosfotransferázový systém

- Fosfotransferázový systém (PTS) je velmi dobře charakterizovaný fosforylační mechanismus. Hlavní funkcí systému je skupinová translokace zprostředkovávající přenos sacharidů přes membránu a jejich fosforylaci. Mimo jiné se podílí i na chemotaxi k sacharidům. Donorem fosfátové skupiny je fosfoenolpyruát. Zbytek systému je představován dvěma cytoplasmatickými proteiny (EI, HPr) a specifickým transmembránovým proteinem (EII, resp. EIII). K fosforylaci proteinů dochází na histidinových zbytcích.

2. Dvousložkové systémy

- Dvousložkové systémy zajišťují odpověď na extracelulární signály, kontrolují genovou expresi a adaptivní buněčnou odpověď. Dvousložkový systém je tvořen senzorem a regulátorem. Senzor je histidinová proteinkinasa, jež se na podnět z vnějšku autofosforyluje na histidinovém zbytku v konzervované C-terminální doméně. Fosfátová skupina je následně přenesena na aspartátový zbytek konzervované N-terminální domény regulačního proteinu, který zajistí výstupní signál.

3. ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinasy

- Jedná se o ATP-dependentní proteinkinasy fosforylující serin, threonin či tyrosin. Tyto proteiny jsou alostericky aktivovány hlavně buněčnými metabolity, ale je známa i regulace pomocí Ca^{2+} iontů. Do této skupiny se řadí isocitrátdehydrogenasa (IDH) kinasa/fosfatasa a skupina proteinkinasy grampozitivních bakterií fosforylujících HPr protein v PTS systému.

4. Proteinkinasy eukaryotního typu u bakterií

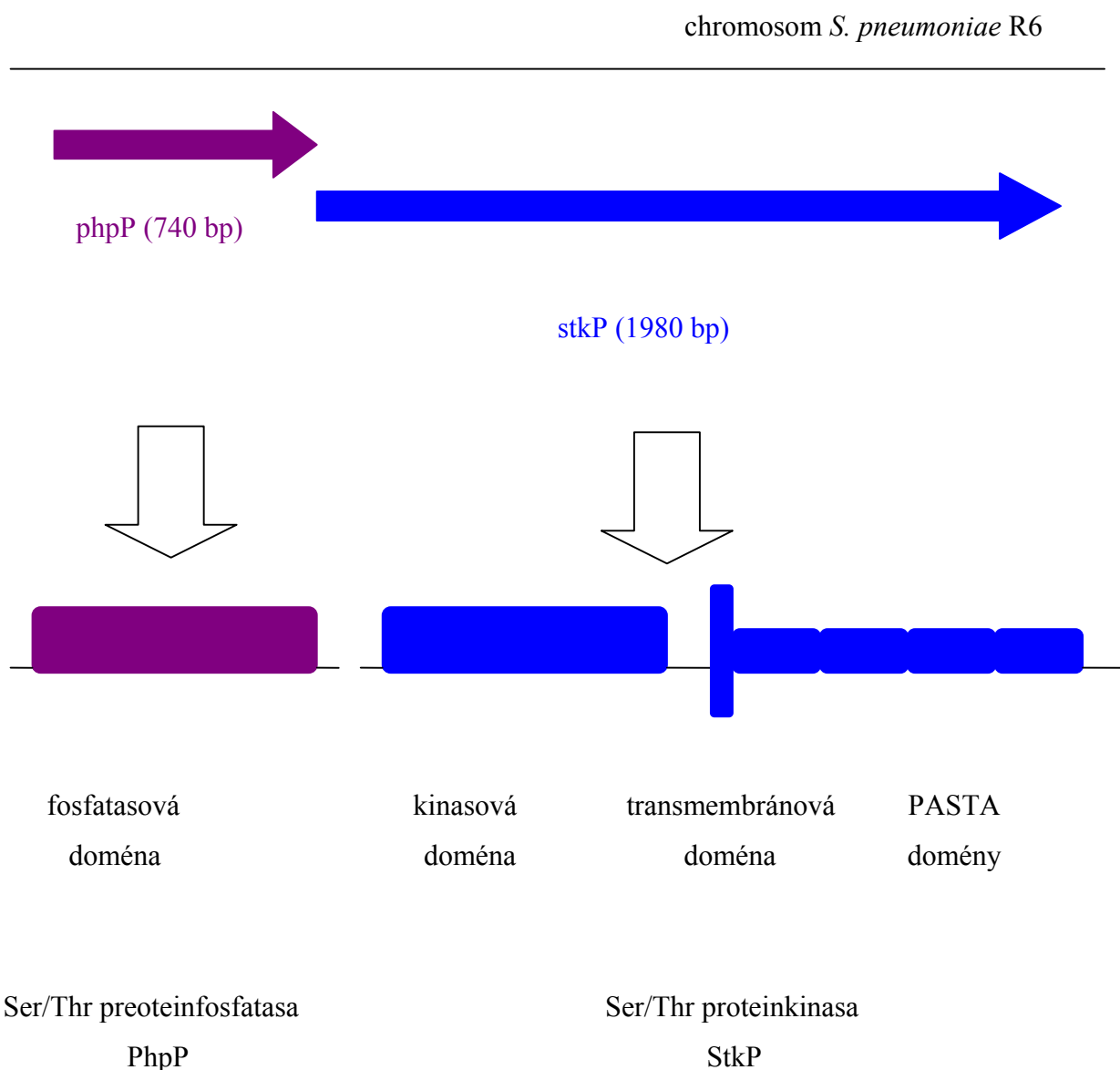
- U prokaryot byla také prokázána přítomnost proteinkinasy vysoce homologní s eukaryotními proteinkinasami. Tyto proteinkinasy obsahují všechny konzervované domény charakteristické pro proteinkinasy nalezené u eukaryot (HANKS et al., 1988). Většina těchto proteinkinasy má schopnost autofosforylace. Fosforylují serinové, threoninové a tyrosinové zbytky. Nalezeny byly u téměř 2/3 sekvenovaných bakteriálních kmenů. Většinou u kmenů *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Chloroflex*, *Acidobacteria* a *Planctomycetes* (PEREZ et al., 2008). Tyto proteiny hrají roli při reakci na stresové podmínky, při regulaci růstu, diferenciaci, sporulaci, produkci sekundárních metabolitů a patogenezí.

3.2.3 *S. pneumoniae* a proteinkinasy

S. pneumoniae je vhodným modelovým organismem pro studium proteinkinasy eukaryotního typu, neboť u něj pro přenos informací a signálů kromě třinácti dvousložkových systémů byla identifikována pouze jediná proteinkinasa eukaryotního typu StkP.

Jedná se o transmembránovou proteinkinasu vyskytující se výlučně u gram pozitivních bakterií. StkP je membránový Mn^{2+} a Mg^{2+} -dependentní protein schopný autofosforylace a podléhající defosforylaci ze strany Ser/Thr proteinfosfatasy PhpP (antagonisté). Oba geny *stkP* a *phpP* se překrývají dvěma páry bazí a jsou součástí jednoho operonu. Podobná chromosomální organizace genů pro tyto signalizační proteiny byla nalezena také u jiných gram pozitivních bakterií a naznačuje funkční souvislost proteinů. StkP se autofosforyluje na threoninových zbytcích a PhpP defosforyluje threoninové zbytky. StkP tvořena z intracelulární kinasové domény na N-konci molekuly proteinu, hydrofóbního transmembránového úseku a sensorové domény tvořenou opakujícím se peptidovým motivem PASTA (penicilin-binding protein and Ser/Thr kinase associated domains) v extracelulární části na C-konci molekuly. Motiv PASTA byl identifikován u penicilin-vazebného proteinu, u kterého bylo zjištěno, že interaguje s β -laktamovým kruhem. Vzhledem k tomu, že β -laktamový kruh je strukturně velmi podobný motivu D-Ala-D-Ala peptidu peptidoglykanu byla vyslovena hypotéza, že efektem proteinkinasy s PASTA motivy jsou podjednotky volného peptidoglykanu. StkP má schopnost dimerizovat prostřednictvím svých extracelulárních a transmembránových domén, vznik

dimeru je rozhodující pro enzymatickou aktivitu (PALLOVÁ et al., 2007). Pomocí proteomové analýzy byly určeny endogenní substráty proteinkinasy StkP, kterými jsou fosfoglukosaminmutasa GlmM, první klíčový enzym biosyntetické dráhy buněčné stěny (syntesa UDP-N-acetylglukosaminu, základního společného prekurzoru biosyntézy buněčných komponent) a α -podjednotka RNA polymerasy (NOVÁKOVÁ et al., 2005).



Obr. 3. 4. : Schéma PhpP a StkP

Naše laboratoř se zabývá studiem těchto dvou proteinů: proteinfosfatasy PhpP a proteinkinasy eukaryotního typu StkP u *S. pneumoniae* detailně (NOVÁKOVÁ et al., 2005; PALLOVÁ et al., 2007; SASKOVÁ et al., 2007).

Pro objasnění funkce proteinfosfatasy PhpP byl studovaný gen *phpP* na chromosomu pneumokoka inaktivován pomocí metody inserce kazety, při níž dochází po

dvojitým crossing-overu k deleci studovaného genu s následným vložením genu kódující rezistenci vůči antibiotiku. Příprava mutantu $\Delta phpP$ se však i přes opakované snahy nezdařila a tento výsledek vedl k hypotese o esencialitě proteinfosfatasy PhpP pro *S. pneumoniae*. Spolu s přípravou jednoduchého mutantu v genu *phpP* byla připravena dvojitá mutanta s deletovanými geny *phpP - stkP*, neboť se předpokládalo na základě již publikovaných dat, že ztráta funkce obou genů by mohla vyústit v životaschopný fenotyp. Tato mutanta $\Delta phpP-stkP$ byla životaschopná, což nasvědčovalo tomu, že proteinfosfatasa PhpP je pro buňky nezbytná, neboť je důležitá pro regulaci funkce proteinkinasy StkP. Pro objasnění funkce proteinkinasy byla obdobným způsobem připravena mutanta v genu *stkP*.

U jednotlivých mutantních kmenů byl charakterizován fenotypový projev, schopnost navodit stav přirozené kompetence, odpovědi bakteriálních buněk na stres, buněčná morfologie a dělení buněk atd. (SASKOVA et al., 2007).

Jednoduchá mutanta $\Delta stkP$ vykazovala až o dva řády sníženou schopnost přirozené kompetence ve srovnání s divokým typem *S. pneumoniae*.

Vzhledem ke skutečnosti, že mutanti v kinasach a fosfatasach mívají často defekty v buněčné morfologii, popř. v buněčném dělení, byly kmeny sledovány ve světelném mikroskopu. Buňky divokého kmene a $\Delta stkP$ mutantního kmene se morfologicky téměř neliší. Vyskytovaly se po dvojicích a pouze ojediněle tvořily krátké řetízky. Naproti tomu buňky $\Delta phpP-stkP$ mutantního kmene vytvářely dlouhé řetízky, kdy jednotlivé buňky nebyly zcela odděleny, což značí nedokončenou tvorbu buněčných přepážek. Pozorovaný fenotyp připomínal fenotyp mutantu v genu *divIVA* *S. pneumoniae*, jehož produkt je odpovědný za buněčné dělení.

$\Delta stkP$ mutantní kmen se vzhledem k divokému kmenu *S. pneumoniae* vyrovnával hůře s oxidativním, osmotickým a pH stresem a vůbec se nebyl schopen vyrovnat s teplotním stresem. To ukazuje na úlohu StkP v regulaci odpovědi buňky na vnější stresové podmínky.

Pomocí DNA čipů byla proveden analýsa transkriptomu mutantního a divokého kmene *S. pneumoniae*, při které bylo identifikováno 95 genů. Jejich exprese byla v $\Delta stkP$ mutantním kmenu ovlivněna více než dvojnásobně. Počet ovlivněných genů pak představuje více než 4% genomu, což proteinkinase StkP pasuje do role proteinu s globální regulační funkcí. Z výsledků vyplývá, že StkP kinasa reguluje rozličné buněčné procesy, jako jsou: kompetence, stresová odpověď, metabolické procesy, tvorba buněčné stěny, biosyntesa pyrimidinů, opravy DNA, transport železa a další. Seznam genů jež StkP ovlivňuje společně se zařazením do funkčních skupin je uveden v kapitole Přílohy (viz.

kapitola Přílohy: Příloha číslo 2.). Gen, jehož exprese byla u mutanty *ΔstkP S. pneumoniae* nejvíce změněna je *spr1057*, konzervovaný hypotetický protein patřící do skupiny „haloacid hydrolase HAD-like family“. Transkripce tohoto genu byla dle výsledků analýzy transkriptomu snížena 59 krát. Studium tohoto genu se předkládaná diplomová práce zabývá.

3.3 Haloacid dehalogenasy

3.3.1 Obecná charakteristika haloacid dehalogenas

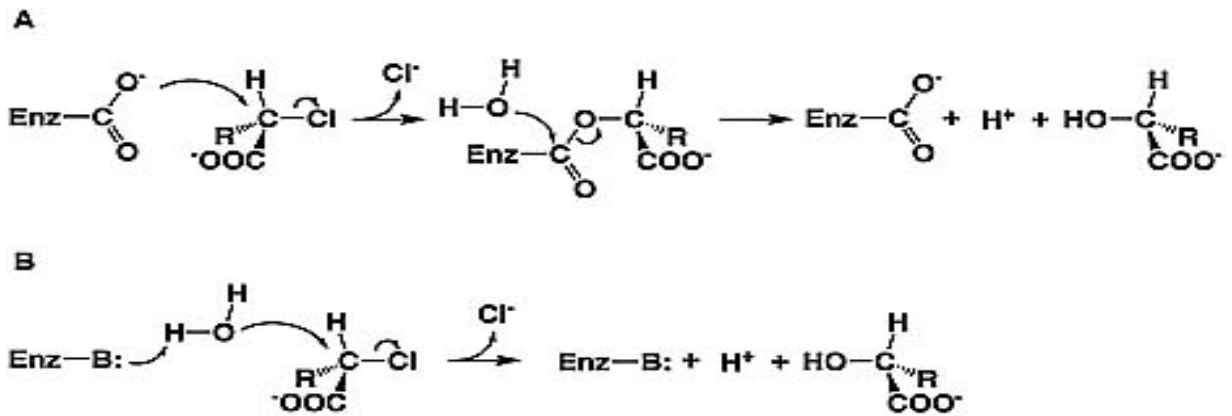
Různé druhy dehalogenas se liší využíváním odlišných strategií štěpení různých uhlík-halogenových sloučenin. Strukturně jsou charakterizované haloalkan dehalogenasy, haloacid dehalogenasy a 4-chlorbenzoat-coenzym A dehalogenasa (JONG and DIJKSTRA, 2003).

Haloacid dehalogenasy představují skupina převážně necharakterizovaných enzymů z nadčeledi haloacid dehalogenas (HAD), kam patří ještě Mg^{2+} -dependentní fofatasy a P-typ ATPas.

Haloacid dehalogenasy katalysují štěpení halogenu na uhlíkové kostře organohalogenových sloučenin (KURIHARA, ESAKI, 2007). Haloacid dehalogenasy lze dělit na dvě základní skupiny: L-2-haloacid dehalogenasy a DL-2-haloacid dehalogenasy.

L-2-haloacid dehalogenasy katalysují hydrolytické dehalogenace L-2-halogenalkanových kyselin. L-2-haloacid dehalogenasy jsou unikátní tím, že katalysují štěpení vysoce stabilní vazby mezi C - F u fluorovaných alifatických sloučenin. Karboxyl asparagové kyseliny (Asp) vykonává nukleofilní útok na $^{\alpha}C$ substrátu, čímž dojde k uvolnění halogenu, za vzniku D-2-hydroxyalkanové kyseliny.

DL-2-haloacid dehalogenasy katalysují hydrolytické dehalogenace D- a L-2-halogenalkanových kyselin. Enzymy jsou zajímavé tím, že působí na chirální atomy uhlíku obou enantiomerů. DL-2-haloacid dehalogenasy jsou jedinečné v tom, že pomocí molekuly vody dojde k přímému útoku substrátu, což způsobí uvolnění atomu halogenu, za vzniku odpovídající L- a D-2-hydroxyalkanové kyseliny.



Obr. 3. 5. : Mechanismy dehalogenace: A) L-2-haloacid dehalogenas; B) DL-2-haloacid dehalogenas (KURIHARA, ESAKI, 2007)

Enzymy patřící do nadčeledi („superfamily“) haloacid dehalogenas (HAD) katalyzují podobné reakce, ale jednotlivé enzymy mají vyvinuté specifické biologické funkce. Tato enzymatická nadčeleď je charakteristická neobyčejně rozmanitým spektrem substrátů, na něž působí. Kompletní substrátové specifity představují zásadní první krok k objasnění funkce daného enzymu (KUZNETSOVA et al. 2010). V této enzymatické nadčeledi se z funkčního hlediska vyskytují enzymy čeledí („family“) s aktivitou:

- fosfatasovou
- fosfonatasovou
- dehalogenasovou
- β-fosfoglucomutasovou
- fosfoesterasovou
- ATPasovou
- nukleotidasovou

Tyto enzymy byly objeveny konzervované u bakterií, archeí, eukaryot i člověka. U prokaryot došlo asi k největšímu zájmu a studiu enzymů z této skupiny o fosfatasy, nukleotidasy a dehalogenasy.

Fosfatasy představují enzymy jež odštěpují a přenášejí fosfátovou skupinu z jedné molekuly na druhou. Haloacid dehalogenasy skupiny fosfatas se většinou funkčně uplatňují u prokaryot v metabolických procesech.

Byly nalezeny u mnoha bakterií gram pozitivních i gram negativních (např. z rodů *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Aeromonas* atd.)

Nukleotidasy jsou enzymy odštěpující z nukleotidů kyselinu fosforečnou za vzniku nukleosidů. Haloacid dehalogenasy skupiny nukleotidas se většinou funkčně uplatňují u prokaryot v metabolických drahách nukleových kyselin DNA a RNA, regulují buněčnou koncentraci ribo- a deoxyribonukleotidů, podílí se na opravách DNA a jako „úklidové enzymy“.

Byly nalezeny u mnoha bakterií gram pozitivních, gram negativních, kvasinek, prvoků i hub (např. z rodů *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Plasmodium*, atd.)

Dehalogenasy byly popsány jako bakteriální enzymy schopné odštěpovat z halogenovaných uhlovodíků právě halogen. Haloacid dehalogenasy skupiny dehalogenas se většinou funkčně uplatňují u prokaryot v metabolických procesech a činí bakterie potenciálně využitelné v chemickém průmyslu, bioremediacích či obnově čistoty životního prostředí.

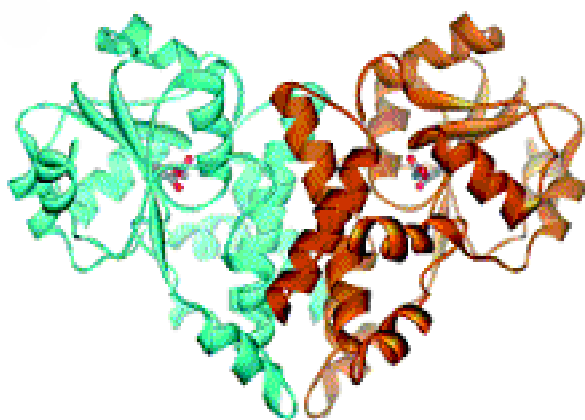
Byly nalezeny u mnoha bakterií gram pozitivních, gram negativních a archeí (např. z rodů *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sulfolobus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, atd.)

Po krystalizaci proteinů z HAD nadčeledi se ukázalo, že na strukturální úrovni jsou HAD sjednoceny s několika dalšími nadčeledmi (DHH, CheY-like, von Willebrand A, TOPRIM, histon deacetylasy, PIN/FLAP nukleasy), které všechny obsahují specifickou formu tzv. Rossmannovy domény („Rossmannoid fold“) (BURROUGHS et al., 2006). Jedná se o strukturální motiv častěji se vyskytující u proteinů vázajících nukleotidy. Její struktura se skládá ze třech nebo více paralelních β -listů spojených se dvěma α -šroubovicemi v topologické pořadí $\beta - \alpha - \beta - \alpha - \beta$. Každá Rossmannova doména může vázat pouze jeden nukleotid, vazebná doména pro di- či tri-nukleotidy se skládá spárováním dvou či tří Rossmannových domén. HAD doména se odlišuje od těchto podobných domén dvěma hlavními strukturálními odlišnostmi: jedna helikální část a motiv β -vlásky (klapky). Vzniká tedy útvar s topologickým pořadím $\alpha - \beta - \beta - \beta$ s odpovídajícím sekvenčním motivem 1 - 4. Předpokládá se, že přítomnost těchto dvou odlišností poskytne enzymu potřebnou mobilitu s možností tvořit „otevřenou“ a „uzavřenou“ konformaci. Navíc většina členů HAD nadčeledi obsahuje inzerty, nazvané „cap“ (čepička) podílející se zřejmě na substrátové specifitě enzymů (LAHIRI et al., 2004). Tyto

cap drobné domény jsou tvořeny motivem α -šroubovice - β -list - α -šroubovice. Kde v β -listu obsahuje přísně zachovaný Glycin (Gly) (v pořadí sekvence 5. motiv), lemovaný zbytky jejichž boční řetězce přispívají k tvorbě katalytického místa na rozhraní domény. U skupiny capC1 je čepička přímo vložena do motivu β -vlásky a reguluje přístup substrátů do aktivního místa enzymu. U druhé skupiny capC2 tvoří čepička střechu nad aktivním místem enzymu a přístup k jeho vnitřní dutině může být částečně upraven pohybem β -vlásky (BURROUGHS et al., 2006).

Haloacid dehalogenasesy jsou dimery se dvěma či třemi podjednotkami, kdy každá podjednotka je tedy tvořena jednou hlavní („core“) doménou a mnoha malými „cap“ doménami. Aktivní místo enzymu je tvořeno čtyřmi smyčkami (1 - 4) s pozicí pro substrát a kofaktory (dvojmocné kovové ionty).

Jde tedy o rozsáhlou rodinu enzymů o celkově nízké sekvenční podobnosti (< 29%), která je soustředěna do 3 krátkých katalytických motivů. Nejdůležitější z nich je první motiv DXDXT, jehož první aspartát je nejvíce konzervován a přímo se účastní fosforyl - transferasových reakcí.



Obr. 3. 6. : Dimerní struktura haloacid dehalogenasy (JONG AND DIJKSTRA, 2003)

3.3.2 „House - cleaning“ úklidové funkce enzymů

Bakteriální buňky jsou neustále vystavovány nespočtým toxickým látkám, ať už z jejich vnějšího prostředí či vedlejším produktům jejich vlastního metabolismu. Z těchto důvodů jsou bakteriální buňky vybaveny několika mechanismy, které mají zvládat tuto výzvu. Jedná se hlavně o: blokaci absorpce (vnější membrána u gramnegativních bakterií),

transport specifickými transportéry (ABC systém), specifická inaktivace těchto látek enzymy (TITZ et al., 2006).

Zvláště za povšimnutí stojí skupina toxických substancí „noncanonical“ (modifikovaných) nukleobasí, jež mohou buď zabránit replikaci DNA přímo, nebo nepřímo vést ke zvýšení mutační rychlosti. Velmi často se jedná o oxidované, deaminované, halogenované, methylované či jinak modifikované base (KUZNETSONOVA et. al., 2006; WEISS 2007; BEAN and TOMASZ 1971; HARTMAN and HEIDELBERGER 1961)

Příklady modifikovaných basí jsou uvedeny v kapitole Přílohy (viz. kapitola Přílohy: Příloha číslo 3.). Enzymy rozpoznávající tyto modifikované deriváty jsou „house - cleaning (úklidové) nukleotidasy“. Předpokládá se, že působí na modifikované nukleotidy a při tom zabraňují jejich včlenění do DNA či RNA. House - cleaning enzymy tedy chrání bakteriální buňky před účinky modifikovaných metabolických chemických sloučenin a řadí se do skupin výše zmiňovaných enzymů (HAD). „House-cleaning“ enzymy rozpoznávající modifikované base pracují souběžně s enzymy opravujícími DNA, jež opravují léze DNA po modifikovaných basích (GALPERIN et al., 2005).

„House-cleaning“ funkce na modifikované nukleobase byly popsány u 4 skupin enzymů : MutT-related (nudix) hydrolasy, dUTPasy, ITPasy (Maf/HAM1) a all- α NTP pyrofosfatasy (MazG). U těchto enzymů se prokázala vysoká afinita k jejich přirozeným substrátům (8-oxo-dGTP, dUTP, aITP, 2-oxo-dATP), která je až 1000krát větší než k běžným nukleobasím (GALPERIN et al., 2005). Některé tyto enzymy jsou již charakterizovány, ale genomická data společně s rostoucími údaji strukturálními a biochemickými naznačují, že počet těchto enzymů je rozsáhlejší než se dříve myslelo a zahrnují řadu obdobných enzymů s překrývajícími se funkcemi.

3.3.3 Jednotlivé bakteriální haloacid dehalogenasy

3.3.3.1 Rod *Escherichia coli*

E. coli je jedna z nejprostudovanějších bakterií, což platí i v ohledu těchto enzymů. U této gramnegativní bakterie bylo popsáno mnoho zmiňovaných enzymů, hlavně s fosfatasovou a nukleotidasovou aktivitou. Některé z nich již byly krystalizovány a funkčně charakterisovány. V genomu *E. coli* bylo identifikováno 5 membránových a 23 cytoplasmatických HAD-like hydrolas reprezentujících ~ 40% proteinů *E. coli* se známou či předpokládanou fosfatasovou aktivitou (KUZNETSOVA et al., 2006). Popsané enzymy jsou: YjjG (PROUDFOOT et al., 2004; TITZ et al., 2006; KUZNETSOVA et al., 2006; WEISS 2007), MutT (TITZ et al., 2006), dUMP fosfatasa (WEISS 2007), UshA 5'-nukleotidasa (PROUDFOOT et al., 2004), SurE, YfbR (PROUDFOOT et al., 2004), YniC, YfbT, YieH, YihX, YqaB, YigB, YrfG, SerB, Gph, YcjU, YbiV, YidA, YbhA, YbjI, YigL, OtsB, Cof, YedP, YaeD, HisB, Yrbl (KUZNETSOVA et al., 2006), KdsC (BISWAS et al., 2009).

Souhrnně se tato skupina proteinů se vyznačuje ~ 15 - 30% sekvenční identitou. Vyžadují pro svou enzymatickou aktivitu bivalentní ionty Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , ale liší se jejich preferencí. Aktivní jsou v neutrálním pH. U haloacid dehalogenas *E. coli* byly zjištěny různé funkce. Některé enzymy byly funkčně popsány a uplatňují se v nukleotidovém metabolismu, snižování četnosti mutací, při opravách DNA, detoxikačních funkcích, rezistenci, signalizaci, biosyntesach lipopolysacharidů, biosyntesach aminokyselin a odpovědi bakteriální buňky na zevní stresové podmínky (teplota, pH, osmotický tlak, kyslík atd.).

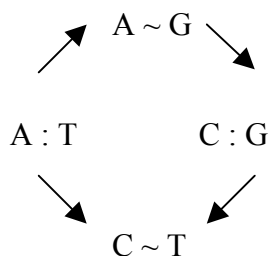
Protein **YjjG**, kodovaný genem *yjjG* o velikosti 678 bp, je „house - cleaning“ nukleotid fosfatasa funkční in vivo v *E. coli*. Prokázané či předpokládané homologní proteiny YjjG se vyskytují i u mnoha dalších bakterií (viz. kapitoly Přílohy: Příloha číslo 1.).

Primární struktura sestává z 225 aminokyselin. Pro svou optimální aktivitu vyžaduje neutrální pH (7,5) a přítomnost bivalentních kovových kationtů s preferenčním pořadím $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+}$. Substrátová specifita: 5-monofosforylované pyrimidinové deriváty (5-fluorouridin, 5-fluorouracyl, 5-fluorotic acid, 5-aza-2'-deoxycytidin, 5-fluoro-

2'-deoxyuridin, 5-bromo-2'-deoxyuridin, 5-iodo-2'-deoxyuridine, 5'-dTMP, 5'-dUMP, 5'-UMP).

Funkce YjjG byla studována v mutantním kmeni *E. coli* s delecí v genu *yjjG* (WEISS 2007). Posuzovala se afinita YjjG k substrátům vyskytujících se v běžném nukleotidovém metabolismu a k modifikovaným basím (dUMP, UMP, dTMP, BrdU, 5-FUdR). Bylo zjištěno, že regulační aktivita YjjG v pyrimidinovém metabolismu není hlavní funkcí tohoto enzymu, kterou je spíše house - cleaning (TITZ et al., 2006). Funkce YjjG k modifikovaným nukleotidům ukazuje na ochrannou funkci před těmito nukleotidy. YjjG také zabraňuje inkorporaci potenciálních mutagenních nukleotidů do DNA, jak se ukázalo u BrdU. Odstraňuje modifikované nukleotidy a chrání tak bakteriální buňku před toxickým vlivem a vznikem mutací.

Protein **MutT** je protein s fosfatasovou aktivitou u *E. coli*. Sekvenčně podobné proteiny byly nalezeny u *Y. pestis*, *P. mirabilis*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. pneumonia* (NAKAMURA et al., 2010). Primární struktura polypeptidového řetězce sestává ze 129 aminokyselin. Enzymatická aktivita je závislá na přítomnosti bivalentních iontů Mn^{2+} . Tento enzym štěpí dNTP (MAURICE et al., 1996), přičemž hlavně specificky defosforyluje substráty: 8-oxo-dGTP (SUZUKI et al., 2007), 8-oxo-GTP (NAKAMURA et al., 2010) 2-oxo-dATP a 8-oxo-dATP (GALPERIN et al., 2005). MutT tímto brání inkorporaci 8-oxoguaninu do DNA či RNA, kde jinak 8-oxoguanin je schopen párovat s adeninem. MutT tedy snižuje rychlost vzniku mutací (snižuje mutační rychlost ~ 100 - 3200 krát). Zvýšení mutační rychlosti lze prokázat u mutanty Δ mutT *E. coli* (WEISS 2007), u které byl zvýšen výskyt přirozených mutací 100 - 10000 krát a jednalo se výlučně o AT - CG transverze vznikající během replikace DNA (MAURICE et al., 1996).



Obr. 3. 7. : AT - CG transverze



Protein **SurE** je další fosfatasa *E. coli* a je známá i její 3D (IWASAKI AND MIKI, 2007). Tento protein byl nalezen jak u archeí, eukaryot tak i u prokaryot. Plní funkci ve vnitrobuněčném metabolismu nukleotidů. Skládá se z 253 aminokyselin. Pro svou

optimální aktivitu vyžaduje přítomnost bivalentních kovových kationtů s preferenčním $Mn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Mg^{2+}$. Substrátová specifita: tento protein vykazuje širokou substrátovou specifitu k ribo- či deoxyribonukleosid-5'-monofosfátům a ribonukleosid-3'-monofosfátům. U tohoto enzymu je stejná senzitivita k di- i tri-fosfátům (PROUDFOOT et al., 2004). Nejvyšší afinitu prokazuje k 3'-AMP (IWASAKI AND MIKI, 2007).

Protein **YfbR** je úzce specifická fosfatasa prokázaná u *E. coli*. Orthology tohoto proteinu byly nalezeny nejen u prokaryot, archeí, eukaryot, ale i u člověka (HDDC2 protein). Jedná se o enzym hrající roli ve vnitrobuněčném nukleotidovém metabolismu (de novo syntesa deoxycytidinu) a signalizaci. Sestává z 199 aminokyselin. Po krystalizaci tohoto proteinu zde byla identifikována konzervovaná HD-doména fosfohydrolasy s nukleotidasovou a fosfodiesterovou aktivitou (ZIMMERMAN et al., 2008). Pro svou optimální aktivitu vyžaduje bivalentní kovové kationty s preferenčním pořadím $Co^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Mg^{2+}$. Substrátová specifita: pouze k 2'-deoxyribonukleosid-5'-monofosfátům (PROUDFOOT et al., 2004), a proto se také označuje jako 5'-deoxyribonukleasa.

Protein **UshA 5'-nukleotidasa** identifikovaná v periplasmě *E. coli*. Sestává z 550 aminokyselin. Substrátová specifita: nukleosidy 5'-mono-, di-, a tri-fosfáty, včetně UDP-glukosy. Hlavní funkcí tohoto enzymu je degradace exogenní UDP-glukosy a 5'-nukleosidů za vzniku glukosy-1P, nukleotidů a fosfátů pro potřeby buňky (PROUDFOOT et al., 2004).

Protein **Gph** (fosfoglykolat fosfatasa) *E. coli* se podílí na degradaci 2-fosfoglykolatu vznikajícího během oprav DNA (KUZNETSOVA et al., 2006).

Proteiny **YrbI** (3'-deoxy-D-manno-octulosonate 8-fosfatasa) a **YaeD** (GmhB, D,D-heptose 1,7-bisfosfatasa) *E. coli* jsou zapojeny do lipopolysacharidové biosyntesy (KUZNETSOVA et al., 2006).

Protein **KdsC** (3'-deoxy-D-manno-octulosonate 8-fosfatasa) nalezen u *E. coli*, již i krystalizován, je funkčně podobný proteinu YrbI. KdsC štěpí 3'-deoxy-D-manno-octulosonate 8-fosfat za vzniku anorganického fosfátu a 3'-deoxy-D-manno-octulosonate. 3'-deoxy-D-manno-octulosonate je nezbytnou složkou lipopolysacharidu u

gramnegativních bakterií. Vzhledem k tomu, že lipopolysacharid je důležitým činitelem bakteriální rezistence a toxicity, KdsC je považován za potenciální cíl pro nové antibakteriální látky (BISWAS et al., 2009).

Protein **OtsB** (trehalose 6-fosfatasa) hraje důležitou roli v odpovědi *E. coli* na zevní stresové vlivy, např. teplotu, pH, osmotický tlak, kyslík (KUZNETSOVA et al., 2006).

Protein **SerB** (fosfoserin fosfatasa) *E. coli* se podílí na biosyntese aminokyseliny serinu (KUZNETSOVA et al., 2006).

Protein **YbiV** u *E. coli* je protein s předpokládanou funkcí fosfatasy (ROBERT et al., 2005) podílející se defosforylací na opravách fosforylovaných proteinů či DNA (KUZNETSOVA et al., 2006).

Proteiny **YniC** (2-6-fosfatasa deoxyglukosy), **YfbT**, **YbiV**, **YidA**, **YjjG**, **YihX** a **YigL** v *E. coli* mají detoxikační funkce (KUZNETSOVA et al., 2006).

Proteiny **YniC**, **YfbT**, **YbiV**, **YidA**, **YigL** se u *E. coli* podílejí na glykačních opravách přímou defosforylací fosfoglykovaných proteinů či DNA (KUZNETSOVA et al., 2006).

3.3.3.2 Rod *Pseudomonas*

U rodu gramnegativních bakterií *Pseudomonas* byly již také nalezeny enzymy patřící do skupiny haloacid dehalogenas. Enzymy byly popsány u druhů *P. species*, *P. putida*, *P. aeruginosa*. Jedná se hlavně o enzymy s dehalogenasovou aktivitou.

Protein **L-2-Haloacid dehalogenasa** byl nalezen u *P. species* YL, ale také u gramnegativní bakterie *Xanthobacter* (HISANO et al., 1996). Jedná se o enzym katalyzující hydrolytickou dehalogenaci L-2-halogenalkanových kyselin. Halogenové organické sloučeniny jsou široce používány pro nejrůznější průmyslové výroby (př. insekticidy, rozpouštědla). Tyto látky mohou způsobit vážné problémy v životním prostředí v důsledku jejich perzistence. U zmiňovaných bakteriálních druhů bylo zjištěno,

že jsou schopny využívat tyto sloučeniny jako zdroj uhlíku, energie a pomocí enzymů haloacid dehalogenas je degradovat. Enzym byl krystalizován a následně byl charakterizován jako homodimer ze dvou strukturně odlišných oblastí: jádra domény a subdomény. Jádro je tvořeno šesti paralelními β -listy lemovanými pěti α -šroubovicemi. Subdoména je inkorporována do jádra a je tvořena čtyřmi α -šroubovicemi uspořádanými do svazku.

Proteiny **DehI** a **DehII** nalezeny u *P. putida* kmen PP3 (SCHMIDBERGER et al., 2008). Jedná se o dvě dehalogenasy patřící do skupiny I a II α -haloacid dehalogenas, resp. skupiny dehalogenas katalyzujících odstranění halogenu u D-haloalkanových kyselin. U těchto enzymů nejsou zatím přesně známy jejich hlavní funkce.

Protein **ThrH** nalezen u *P. aeruginosa* je enzym patřící do skupiny I-2-haloacid dehalogenas (SINGH et al., 2004). U tohoto proteinu je prokázána schopnost přenosu fosforylu a enzymatická funkce fosfoserin:homoserin fosfotransferasy.

3.3.3.3 Rod *Proteus*

U rodu gramnegativních bakterií *Proteus* byl popsán enzym patřící do nadčeledi haloacid dehalogenas. U enterobakterie druhu *Proteus vulgaris* je popsán protein MutT (BESSMAN et al., 1996).

Protein **MutT** nalezen u *P. vulgaris* je homolog proteinu MutT *E. coli* a MutX *S. pneumoniae*. Jedná se o „house-cleaning“ enzym s funkcí nukleosid trifosfatasy.

3.3.3.4 Rod *Haemophilus*

U rodu gramnegativních bakterií *Haemophilus* již byly popsány enzymy patřící do nadčeledi haloacid dehalogenas. U potenciálně patogenního druhu *Haemophilus influenzae* byla nalezena YrbI fosfatasa (PARSONS et al., 2002) a e (P4) fosfatasa (FELTS et al., 2007).

Protein **YrbI** nalezen u *H. influenzae* (HI1679) je tetramer tvořený čtyřmi monomery uspořádanými do kruhu, závislý na Mg^{2+} iontech. Jedná se o fosfatasu hydrolyzující mnoho substrátů, hlavně 6-fosfoglukonat a fosfoserin. Tento enzym je zapojen do metabolismu cukrů.

E (P4) je lipoprotein strukturně tvořený dvěma doménami, jádrem z 5 β -listů lemovaných z obou stran α -šroubovicemi a druhou menší doménou pouze s α -šroubovicí. Jedná se o fosfatasu řazenou mezi fosfohydrolasy. P4 je také součástí vakcíny proti *H. influenzae*.

3.3.3.5 Rod *Salmonella*

U gramnegativních bakterií zařazených do rodu *Salmonella* byl nalezen enzym patřící do skupiny haloacid dehalogenasy.

Jedná se o protein **AphA** nalezený u patogenní *Salmonella typhimurium* (MAKDE et al., 2007). Tento protein je závislý na přítomnosti Mg^{2+} iontů. Jedná se o enzym řazený do skupiny L-2-haloacid dehalogenas s fosfatasovou funkcí.

3.3.3.6 Rod *Porphyromonas*

U gramnegativních bakterií zařazených do rodu *Porphyromonas* (dříve *Bacteroides*) byl nalezen enzym patřící do skupiny haloacid dehalogenasy.

Jedná se o protein **SerB653** identifikovaný u druhu *P. gingivalis* (TRIBLLE et al., 2006). SerB653 je haloacid dehalogenasa s rodiny fosfatas, interaguje s lidskými fosfoproteiny a je důležitá pro invazi této bakterie do závěsného aparátu zubů (paradontu). *P. gingivalis* produkuje tento enzym při styku s gingiválními epiteliálními buňkami. Byly identifikovány dva potenciální substráty tohoto enzymu GAPDH a heat-shock protein 90 (TRIBLLE et al., 2006).

3.3.3.7 Rod *Burkholderia*

U gramnegativního bakteriálního kmene *Burkholderia* byl také nalezen enzym ze skupiny haloacid dehalogenas (YU et al., 2007).

Deh4 je membránový integrální protein nalezený u *Burkholderia cepacia* MBA4. Tento protein se uplatňuje v metabolismu, jelikož se jedná o bakterie, které mohou využít 2-halokyseliny jako zdroj uhlíku a energie pro růst. Deh4 je haloacid permeasa zprostředkávající bakteriální buňce příjem halokyseliny. Tento enzym má také potenciální možnost využití při odstranění znečištění životního prostředí halogeny a využití v syntese průmyslových chemikálií (SCHMIDBERGER J. W., et al., 2007).

3.3.3.8 Rod *Sulfolobus*

Rod archeí *Sulfolobus* je termofilní organismus žijící převážně v horkých termálních pramenech. U druhu *Sulfolobus tokodaii* byla popsána L-haloacid dehalogenasa (RYE et al., 2008).

L-haloacid dehalogenasa má aktivitu vůči karboxylovým kyselinám s halogenem na pozici C2. Nejvyšší aktivita byla prokázána k chloropropionové kyselině. Vzhledem k této funkci má L-haloacid dehalogenasa potenciální využití ve farmaceutickém či chemickém průmyslu hlavně pro čištění a obnovu kontaminované půdy (RYE et al., 2008). Enzym je termostabilní s maximální aktivitou při 60°C. Strukturně se jedná o homodimer. Každý monomer je složen z jádra, β -listu obklopeného α -šroubovicí a šroubovicové subdomény složené z α -šroubovic.

3.3.3.9 Rod *Pyrococcus*

Pyrococcus je hypertermofilní kmen archeí s teplotním optimem téměř při 100°C. U druhu *Pyrococcus horikoshii* OT3 je popsán hypotetický protein PH1421 zařazovaný mezi haloacid dehalogenasy, podobný HAD TA 0175 archeí *Thermoplasma* (YAMAMOTO et al., 2008).

PH1421 je hypotetický protein ze skupiny haloacid dehalogenas s fosfatovou aktivitou závislou na přítomnosti Mg^{2+} iontů. Jedná se o homodimer. Monomerní protomer se skládá ze dvou odlišných oblastí, velkého jádra a malé domény.

3.3.3.10 Rod *Thermococcus*

Thermococcus je striktně anaerobní kmen archeí s optimálním růstem při 85°C a v přítomnosti elementární síry S^0 , která je redukována na sirovodík. U druhu *Thermococcus onnurineus* NA1 byla nalezena pyrofosfatasa patřící do skupiny haloacid dehalogenas (LEE et al., 2009).

Pyrofosfatasa je enzym s optimální aktivitou při pH 6 a je závislá na přítomnosti dvojmocných kovových iontů, hl. Ni^{2+} . Tato pyrofosfatasa je kodovaná genem TON0002, který se nachází v těsné blízkosti lokusu DNA polymerasy. Funkce tohoto enzymu je hydrolyza pyrofosforečnanu během DNA polymerizace.

3.3.3.11 Rod *Sacharomyces*

U kvasinek rodu *Sacharomyces* jsou enzymy patřící do skupiny haloacid dehalogenas a to u *S. cerevisiae* či *S. ambofaciens* (BESSMAN et al., 1996).

Protein **YeastYAS1** *S. cerevisiae* a protein **Orf154** *S. ambofaciens* jsou homology proteinu MutT *E. coli*. Jedná se o „house-cleaning“ enzymy s nukleosid trifosfatovou aktivitou.

3.3.3.12 Rod *Plasmodium*

U rodu patogenních prvoků *Plasmodium* byl nalezen protein ISN1 patřící do skupiny haloacid dehalogenas (SRINIVASAN, BALARAM 2007). Totožný enzym byl popsán u některých kvasinek a hub.

ISN1 je 5'-nukleotidasa patřící do skupiny haloacid dehalogenas se substrátovou specifitou pro IMP a GMP.

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Modelovým organismem této diplomové práce byla gram pozitivní bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Tato bakterie má ve svém genomu gen *spr1057* kódující hypotetický protein s neznámou funkcí.

Byly stanoveny tyto cíle:

1. Teoretické zhodnocení necharakterizovaného proteinu Spr1057 *S. pneumoniae* jako hypotetického homologu proteinu YjjG *E. coli*.
2. Studie zaměřená na citlivost mutantu Δ *stkP* *S. pneumoniae* k mutagenním nukleotidům.
3. Exprese, izolace a purifikace rekombinantního proteinu Spr1057.
4. Analýza biochemických vlastností purifikovaného rekombinantního proteinu Spr1057

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 MATERIÁL

5.1.1 Bakteriální kmeny

Streptococcus pneumoniae R6 Sp1 (WT)

Streptococcus pneumoniae R6 Sp10 (Δ stkP)

Kompetentní buňky *E. coli*, kmen JM109 (PROMEGA)

(genotypický popis: *endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_k⁻,m_k⁺), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15]*)

(transformační účinnost $2,5 \times 10^7$ CFU/ μ g DNA)

NEB Turbo Competent *E. coli* (BIOLABS)

(genotypický popis: F' proA+B+ lacI_q Δ lacZ M15/ fhuA2 Δ (lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5)

(transformační účinnost $1 - 3 \times 10^9$ CFU/ μ g DNA)

SURE Competent Cells *E. coli* (STRATAGENE)

(genotypický popis: *e14⁻ (McrA⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]*)

(transformační účinnost $\geq 5,0 \times 10^8$ CFU/ μ g DNA)

SURE Elektroporation - Competent Cells *E. coli* (STRATAGENE)

(genotypický popis: *e14⁻ (McrA⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]*)

(transformační účinnost $\geq 1,0 \times 10^{10}$ CFU/ μ g DNA)

5.1.2 Vektory

pAkCmDK

Nekomerční laboratorně připravený vektor k tvorbě mutanta *S. pneumoniae* R6 v genu *stkP*, díky integraci do *spr0564 - 0565* lokusu chromosomální DNA. Nese rezistenci na chloramfenikol.

pCEP

Nekomerční chromosomální expresní vektor (GUIRAL et al., 2005) o velikosti 9,540 kb, schopen rekombinace do chromosomální DNA *S. pneumoniae*. Exprese cílových genů je pod kontrolou maltosou-inducibilního promotoru. Do vektoru se klonuje přes BamHI a NcoI restriční místa a nese rezistenci ke kanamycinu a spectinomycinu.

pET28b (NOVAGEN)

Komerční expresní vektor o velikosti 5,388 kb. Exprese cílových genů je pod kontrolou T7 IPTG-inducibilního promotoru. Vektor umožňuje fúzi N-konce cílového proteinu s histidinovou kotvou a T7 kotvu. Dále se ve vektoru nachází polyklonovací oblast, T7 terminátor a gen zodpovědný za rezistenci ke kanamycinu.

pJAKO

Nekomerční klonovací vektor o velikosti 2,961 kb. Jedná se o derivát .

pJWV25

Nekomerční expresní vektor (EBERHARDT et al., 2009) o velikosti 8587 bp, schopen rekombinace dvojitým crossing-overem do *bgaA* chromosomu DNA *S. pneumoniae*. Exprese cílových genů je pod kontrolou Zn^{2+} -inducibilního promotoru. Vektor umožňuje fúzi N-konce cílového proteinu s GFP+. Vektor má polyklonovací oblast a nese rezistenci k tetracyklinu.

pTYB2 (BIOLABS)

Komerční expresní vektor o velikosti 7,474 kb. Expresí cílených genů je pod kontrolou T7 IPTG-inducibilního promotoru. Vektor umožňuje fúzi rekombinantního proteinu na C-terminálním konci s inteinem nesoucím Chitin-vazebnou doménu (Chitin-binding domain CBD), jež je extrémě afinní k nosiči s chitinem, čehož se využívá pro izolaci proteinu. K odštěpení inteinu se používá DTT, merkaptoethanol či cystein. Dále se na vektoru nachází polyklonovací oblast a gen odpovědný za rezistenci k ampicilinu.

5.1.3 Oligonukleotidy

CEP-f:	5'-ataagtaacgcaaacgttgcg-3'
CEP-r:	5'-ttttcaattccggtgatattctc-3'
DAM868:	5'-ggggacgcgttgcttaccgttcgtatag-3'
DAM869:	5'-ggggccatggtcgataaccgttcgtataatgt-3'
HADEx-f:	5'-gcgccatattctactactc-3'
HADExf-1infusion:	5'-aaggagatatacatatgatgttctactactc-3'
HADExf-2infusion-short:	5'-aaggagatatacatatgatgaacaaggctctctggaaa-3'
HADEx-r:	5'-gcgcccgggaaatgtgatctttcaagaagaat-3'
HADExr-1infusion:	5'-cttgcaaacacccgggaaatgtgatctttcaagaagaat-3'
HADEx2L-f:	5'-gcgcccattggttctactactc-3'
HADEx2S-f:	5'-gcgcccattggttaacaaggctctctggaaagac-3'
HADEx2-r:	5'-gcgctcgagaaatgtgatctttcaagaagaat-3'
HADIN-CEP-FS:	5'-cgaggtgctaccatgatgaacaaggctctctggaaa-3'
HADIN-CEP-RS:	5'-aaaatcaaacggatccttagtgatggtgatgaaatgtgatctttcaagaagaat-3'
HADIN-CEP-FL:	5'-cgaggtgctaccatggatgttctactactc-3'
HADIN-CEP-RL:	5'-aaaatcaaacggatccttagtgatggtgatgaaatgtgatctttcaagaagaat-3'
Intein reverse primer:	5'-accatgaccttattaccaacctc-3' (BIOLABS)
LN32/C-bga-F:	5'-gcttactagttgattgtca-3'
LN123/JW25-1b:	5'-ttcgctacttgagccactat-3'
LN142/0565-R:	5'-aggacaagagttttcttgg-3'
PB001:	5'-aatgtaagtaaatgattcaaatc-3'
PB002 :	5'-cgcgacggttagaaattgtagaacaattgagg-3'

PB003:	5'-gcgcccatgggttagataaaaaatattcttgaaaagatc-3'	
PB004:	5'-gctacatgatctaggtatatac-3'	
PB005:	5'-tagaaattgtagaacatattgcctcctaagatcc-3'	
PB006:	5'-aaggaggcaaatatgttctacaaatttctactcttc-3'	
PB007:	5'-attagcggccgcttagtgatggtgatggtgatgaaatgtgatctttcaagaatattt-3'	
SP-CEP(amiF):	5'-gaaccaagccgaattagcacg-3'	
SP-CEP(kan):	5'-ccggtgatattctcatttagcc-3'	
SP-CEP(treR):	5'-ttcagttaccgaaagtcgcc-3'	
T7 promotor primer:	5'-taatacgactcactataggg-3'	
T7 terminator primer:	5'-gctagttattgctcagcgg-3'	
T7 universal primer:	5'-taatacgactcactataggg-3'	(BIOLABS)

Oligonukleotidy byly syntetizovány společností East Port Praha s.r.o.

5.1.4 Enzymy modifikující DNA

Alkalická fosfatasa		(BIOLABS)
Benzonasa		(MERCK)
DNasa I		(BOEHRINGER)
T4 DNA ligasa		(FERMENTAS)
Lysozym		(SIGMA)
Polymerasy:	In-Fusion Enzyme – poxvirus DNA polymerasa	(CLONTECH)
	LA DNA Polymerases Mix	(TOP-BIO)
	Pfu Ultra polymerasa	(STRATAGENE)
	Phusion DNA polymerasa	(BIOLABS)
	Taq-Purple DNA polymerasa	(TOP-BIO)
	T4 DNA polymerasa	(BIOLABS)
Restrikční endonukleasy:	BamH I	(BIOLABS)
	EcoR I	(BIOLABS)
	EcoR V	(BIOLABS)
	Hind III	(BIOLABS)
	Nco I	(BIOLABS)
	Nde I	(BIOLABS)
	Pst I	(BIOLABS)

	Pvu I	(BIOLABS)
	Sma I	(BIOLABS)
	Xho I	(BIOLABS)
	Xma I	(BIOLABS)
RNasa A		(PROMEGA)

5.1.5 Protilátky

Anti-Bromdeoxyuridine - myší monoklonální, 1 : 1000	(ROCHE)
Anti-Bromdeoxyuridine-POD - myší monoklonální konjugovaná s peroxidasou, 1 : 1000	(ROCHE)
Anti-CBD-anti-chitin binding domain serum - králičí monoklonální 1 : 5000	(BIOLABS)
Anti-His-POD - monoklonální konjugovaná s peroxidasou, 1 : 10000	(SIGMA)
Anti-Mouse IgG-POD - sekundární konjugovaná s peroxidasou, 1 : 10000	(SIGMA)
Anti-poly-His - myší monoklonální, 1 : 10000	(SIGMA)
Anti-Rabbit IgG-POD - sekundární konjugovaná s peroxidasou, 1 : 10000	(SIGMA)

5.1.6 Standardy

DNA standardy:

1kb Plus DNA Ladder	(FERMENTAS)
1kb DNA Ladder	(BIOTECH)
100bp DNA Ladder	(BIOTECH)

Proteinové standardy:

Prestained Protein Marker (6-176 kDa)	(BIOLABS)
ColorPlus Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	(BIOLABS)

5.1.7 Komerční soupravy

BCA TM Protein Assay Kit	(PIERCE)
- Stanovení koncentrace proteinů	
DNA Purification Kit	(PROMEGA)
- Purifikace DNA	

IMPACT™-CN	(BIOLABS)
- Manipulace s pTYB2	
In-Fusion 2.0 CF Liquid PCR Cloning Kit	(CLONTECH)
- Klonování	
MinElute™ PCR purification Kit (50)	(QIAGEN)
- Purifikace fragmentů DNA po reakci PCR	
MinElute™ Reaction Cleanup Kit (50)	(QIAGEN)
- Purifikace restrikční směsi	
P-nitrophenyl phosphate liquid substrate systém	(SIGMA)
- Stanovení fosfatasové aktivity se substrátem pNPP	
QIAprep® Spin Miniprep Kit	(QIAGEN)
- Izolace plasmidové DNA	
QIAquick® Gel Extraction Kit (250)	(QIAGEN)
- Extrakce DNA z agarosového gelu	
Serine/Threonine Phosphatase Assay System	(PROMEGA)
- Stanovení fosfatasové aktivity	
Super Signal Chemiluminescent Substance	(PIERCE)
- Imunodetekce	
SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate	(THERMOSCIENTIFIC)
- Imunodetekce	
TALONspin Column Kit	(CLONTECH)
- Afinitní chromatografie	

5.1.8 Membrány

Hybond-N ⁺ , nylonová membrána	(AP CZECH)
PVDF, polyvinyliden fluoridová membrána	(MILLIPORE)
Dialysis Tubing, dialyzační střívko	(SERVA)

5.1.9 Filmy

CL-XPosure Film	(THERMOSCIENTIFIC, GENETICA)
-----------------	------------------------------

5.1.10 Kazeta

OKAMOTO PL-B type 13x18

(OKAMOTO)

5.1.11 Chemikálie

Chemikálie	Zkratka	Firma
Acetát draselný	KOAc	LACH-NER
Acetát sodný	NaOAc	LACH-NER
Aceton		LACH-NER
Acetyl fosfát		LACHEMA
Adenin		FLUKA
Adenosin 5'-monofosfát	AMP	SIGMA
Agarosa		SIGMA
Agarosa LE Analytical Grade		PROMEGA
Akrylamid		SIGMA
Albumin Fraction V	BSA	FLUKA
Amoniak		LACHNER
Amonium persulfát	APS	LACHEMA
Ampicilin	amp	USB
Bacto agar		DIFCO
Bacto Brain Heart Infusion		BD
Bacto casiton		BD
Bacto peptone		DIFCO
Bacto Yeast Extrakt		BD
5'-Bromo-2'-deoxyuridin	5-BrdU	SIGMA
Casein		SIGMA
Casiton		BD
Comassie blue R-250		MERCK
Competence Stimulating Peptid	CSP	BIOPHARM
D-Galaktosa		LACHEMA
D-Glukosa		SIGMA
Dihydrogenfosforečnan sodný		LACH-NER
D-Mannitol		LACHEMA

D-Mannosa		LACHEMA
2'-Deoxyadenosin-5'-3P	dATP	PROMEGA
2'-Deoxycytidin-5'-3P	dCTP	PROMEGA
2'-Deoxyguanosin-5'-3P	dGTP	PROMEGA
2'-Deoxythymidin-5'-3P	dTMP	SIGMA
2'-Deoxyuridin-5'-3P	dUMP	PROMEGA
Deoxycholát sodný	DCNa	MERCK
3,3'-Diamino benzidin	DAB	SIGMA
Dihydrogenfosforečnan draselný		LACHEMA
Dihydrogenfosforečnan sodný		LACHEMA
Dihydrogenfosforečnan vápenatý		LACHEMA
Dimethylsulfoxid	DMSO	FLUKA
Dithiotreitol	DTT	INVITROGEN
Dodylsulfát sodný	SDS	SEWA
Dusičnan draselný		LACHEMA
Dusičnan sodný		LACHEMA
5-Fluoro-2'-deoxyuridin 5'-monofosfát	5-FdUMP	SIGMA
Erythromycin	ery	SIGMA
Ethylalkohol	EtOH	P-LAB
Ethidium bromid	EtBr	SIGMA
Fenol		LACH-NER
Foma LP-T (vývojka)		FOMA
		BOHEMIA
Fomafix (ustalovač)		FOMA
		BOHEMIA
Formaldehyd		FLUKA
Fosforečnan sodný		LACHEMA
5'-Fluoro-2'-deoxyuridin	5-FUdR	FLUKA
GelRed		BIOTIUM
Glukosamin-6 fosfát		SIGMA
Glycerol		LACHNER
Glycin		SERVA
Guanosin 5'-monofosfát	GMP	LACHEMA
Hydrogenfosforečnan draselný		LACHEMA

Hydrogenfosforečnan disodný		LACH-NER
Hydrogenuhličitan draselný		LACHEMA
Hydrogenuhličitan sodný		LACHEMA
Hydroxid draselný		LACHEMA
Hydroxid sodný		LACHEMA
Hydroxid vápenatý		LACHEMA
Cholin		SIGMA
Chloramfenikol		SIGMA
Chlorid draselný		LACH-NER
Chlorid hořečnatý		LACH-NER
Chlorid kobaltnatý		LACH-NER
Chlorid manganatý		LACH-NER
Chlorid měďnatý		LACH-NER
Chlorid sodný		LACH-NER
Chlorid vápenatý		LACH-NER
Chlorid zinečnatý		LACH-NER
Chloroform		LACHEMA
Inosin 5'-monofosfát	IMP	LACHEMA
Isopropyl thiogalaktosid	IPTG	SERVA
Izopropanol		LACH-NER
Jodid draselný		LACHEMA
Kanamycin	kan	USSR
dvojsodná sůl kys. ethylenaminotetraoctové	EDTA	SERVA
Kys. octová		MERCK
Kys. 1,4-piperazindiethan-sulfonová	PIPES	SIGMA
Kys. sírová		LACHEMA
Kys. trichloroctová		SIGMA
L-Glutamin		SIMMA
Maltosa		SIGMA
2-Mercaptoethanol		SIGMA
Methanol	MetOH	LACH-NER
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kys.	HEPES	SIGMA
Neopepton		BD
p-nitrofenylfosfát	pNPP	LACHEMA

Peroxosíran amonný	APS	LACHEMA
Pepton		BD
Proteinkinasa K		BOEHRINGER
Rifampicin	rif	SIGMA
Sacharosa	sach	LACHNER
Síran amonný		LACHEMA
Síran draselný		LACHEMA
Síran hořečnatý		LACHEMA
Síran sodný		LACHEMA
Siřičitan sodný		LACHEMA
Sodium dodecyl sulfát		MERCK
Spektinomycin	spc	SIGMA
Streptomycin		USSR
Sulfid sodný		LACHEMA
Thymidin		SIGMA
Thiosíran sodný		LACHEMA
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Trizma base	SERVA
Trizma hydrochlorid		SIGMA
Trypton		BD
Tween 20 (polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)		SIGMA
Uhličitan draselný		LACHEMA
Uhličitan sodný		LACHEMA
Uhličitan vápenatý		LACHEMA
Uridin 5'-monofosfát	UMP	LACHEMA
Voda (destilovaná, sterilní)		

5.1.12 Roztoky a pufry

Barvicí roztok Commasie Blue: 0,5g Commasie blue R250; 450ml MetOH; 100ml
kys.octové; 450ml H₂O

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

Cleavage buffer: 20mM HEPES; 500mM NaCl; 1mM EDTA; 50mM DTT

Column buffer: 20mM HEPES; 500mM NaCl; 0,1% Triton X-100; 1mM EDTA

Dialyzační pufr: 25mM Tris pH 7,5; 100mM NaCl

DNA Loading Dye 6x, vkládací pufr (6x, Fermentas): 0,09% BPB; 0,09 % xylen cyanol
FF; 60 % glycerol; 60mM EDTA)

Eluční pufr: 50mM Tris pH 8,0; 100mM NaCl, 100mM imidazol)

GTE: 50mM glukosa; 25mM Tris-HCl; 10mM EDTA; pH 8,0

LA PCR pufr (10x, Top-Bio)

PII: 0,2M NaOH; 1% SDS

PBS-T: 80mM Na₂HPO₄; 20mM NaH₂PO₄; 100mM NaCl; 0,05% Tween; H₂O do 1l;
pH 7,5

Phusion HF pufr (5x, BioLabs)

Odbarvovací pufr: 10% kys.octová; 20% MetOH

Promývací pufr: 50mM Tris pH 8,0; 100mM NaCl)

Pufry pro restrikční enzymy

NEB pufr 1 (10x, BioLabs)

NEB pufr 2 (10x, BioLabs)

NEB pufr 3 (10x, BioLabs)

NEB pufr 4 (10x, BioLabs)

Pufr pro TAQ polymerasu (10x, Top-Bio)

Pufr pro T4 DNA polymerasu (10x, BioLabs)

Pufr pro T4 DNA ligasu (10x, Fermentas)

Reakční pufr Pfu Ultra (10x, Stratagene)

Running Buffer pro SDS-PAGE: 3g Tris; 14,4g glycin; 1g SDS (na 1litr)

SEDS: DCNa-SDS 0,5% deoxycholát sodný a 0,25% SDS; roztok NaCl a EDTA-150mM
NaCl; 30mM EDTA pH 8; SEDS = 24 vol NaCl, EDTA + 1 vol DCNa, SDS

SDS vzorkový pufr: 0,12M Tris; 4% SDS; 20% glycerol; 10% β-merkptoethanol;
0,02%BPB; pH 6,8

TAE: 40mM Tris; 20mM kys.octová; 2mM EDTA; pH 8,5

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

TB: 10mM PIPES; 15mM CaCl₂; 250mM KCl; sterilizace filtrací; poté přidáme MnCl₂;
(výsledná koncentrace je 55mM); pH 6,7

TBS-T: 2,42g Tris; 8g NaCl pH 7,6 (na 1litr)

5.1.13 Média

Množství jednotlivých složek kultivačních půd je udáváno na 1l půdy.

Média pro aplikace s *Streptococcus pneumoniae*:

BHI medium: 37g bacto brain heart infusion

po sterilizaci přidat 20% cholin; 15mg/ml L-glutamin

CAT medium: 10g casiton; 10g trypton; 1g yeast extract; 5g NaCl

CAT_C medium (kompletní CAT): na 100ml CAT přidáno po sterilizaci

autoklávováním (120°C/2min) 3,4ml 0,5M

K₂HPO₄ a 1ml 20% Glukosy; pH 7,5

CTM: na 100ml CAT_C přidat 0,1ml 0,1M CaCl₂ a 0,25ml 8% BSA

Gelosa G: 1g glukosa; 5g NaCl; 5g neopepton; 1,25g trizma bese; 10g casiton;
1% agar

Gelosa D: dextrosa 1g; NaCl 5 g; neopepton 5 g; Tris 1,25 g; casiton 10g; 1%
agar

Krevní agar KA: na 200 ml gelosy D přidáno (po ochlazení na 50°C) 5 ml beraní
defibrinované krve

Selektivní půdy s antibiotiky: do příslušného media se přidá ATB na finální
koncentraci:

- chloramfenikol 10µg/ml

- kanamycin 50µg/ml

- rifampicin 1µg/ml

- tetracyklin 2,5µg/ml

- erytromycin 0,05µg/ml

Média pro kultivaci *E. coli*:

LB medium tekuté (Lauria – Bretani): 10g trypton; 10g NaCl; 5g yeast extract;
pH 7

LB medium pevné: pevná půda se připraví z tekutého LB přidáním 1,5-2% agaru

SOB medium: 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 0,5% yeast extrakt; 2% bacto trypton;
sterilizovat autoklávem a poté přidat 10mM MgCl₂ a 10mM MgSO₄

SOC medium: SOB medium s 20mM glukosou (10µl 2M na 1ml SOB)

Selektivní půdy s antibiotiky: rozvaří se pevný LB agar a po ochlazení na 50°C se

přidá ATB na finální koncentraci:

- ampicilin 100µg/ml

- kanamycin 50µg/ml

- spectinomycin 100µg/ml

- tetracyklin 10µg/ml

5.1.14 Laboratorní přístroje

Centrifugy

Centrifuge 5417C	(EPPENDORF)
Centrifuge 5424	(EPPENDORF)
Bioguge pico	(HERAEUS INSTRUMENTS)
Microspin 24S	(SORVALL INSTRUMENTS)
Centrifuge RC5C	(SORVALL INSTRUMENTS)
Zentrifugen universal 320R	(HETTICH)

Cykler

Mastercycler gradient	(EPPENDORF)
-----------------------	-------------

Elektroforesa

Thermo-electron corporation EC250-90	(BIOTECH)
Electrophoresis power supply EPS500/400	(PHARMACIA)

Elektroporátor

(BIORAD)

Elisa Plate Readers

(SCHOELLER)

FastPrep FP120

(THERMOSEVANT)

Flow Laboratories BSB 4A

GELAIRE)

French pressure cell press

(SIMOAMINCO)

G:BOX

(SYNGENE)

Chladící a mrazící technika

Microplate Reader

(TECAN)

Míchače, kývače, třepačky, rotátory

MM2A	(LAB. PŘÍSTROJE PRAHA)
------	------------------------

(magnetická míchačka s možným ohřevem)

Rocker 25 (kývač)	(LABNET)
TK3S (vortex)	(KARTELL)
Vortex jn. Mixer	(SCIENTIFIC INTRODUSTRIES)
Vortex mixer VX-200	(LABNET)
Speedvac	
Spektrofotometr	
DU-730 Life Science UV/Vis Spektrometr (190 - 1100 nm, šířka štěrbin < 3 nm)	(BECKMAN COULTER)
Tepelná technika	
The Panther SemiDry Electroblotter	(OWL SCIENTIFIC)
Pipety a dávkovače	
Jednokanálové nastavitelné mechanické pipety	(EPPENDORF, GILSON)
Dávkovače mechanické nastavitelné	(EPPENDORF)
UV Transiluminator	
Váhy	
Sartorius-handy	
Sartorius-laboratory	
Boeco	(BOECO)
Vodní lázeň	
Julabo U3	(JULABO)
Haake D1	

A další běžné laboratorní pomůcky: skleněné a plastové laboratorní sklo, termostat, sterilizátor

5.1.15 Programy a Software

AIDA Image Analyzer 1D Evaluation
- Analýza obrazu
Clone Manager

- Virtuální klonování

CLUSTALW

- Multifunkční využití v genomice a proteomice (<http://align.genome.jp/>)

EPSON Scan Software

- Scanování o velkém rozlišení

Gene Snap

(SYNGENE)

- Snímání obrazu

MultAlin

- Bioinformační platforma (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>)

SecBuilder

(LASERGENE)

- Tvorba genetických map a schémat

Scion Image

- Vyhodnocení snímků z UV Transiluminatoru

SigmaPlot 10.0

- Výpočet konstant v enzymové kinetice

XFluor4 SafireII™

(TECAN)

- Měření absorbance v mikrotitračních destičkách

5.2 METODIKA

5.2.1 Manipulace s bakteriálními buňkami

5.2.1.1 Kultivační metody

5.2.1.1.1 Kultivace *Streptococcus pneumoniae*

Kulturu *S. pneumoniae* jsme kultivovali při 37°C staticky anaerobně v tekutém CATc či BHI médiu, nebo byly použity tuhá média Gelosa G či Krevní agar.

Pro selekci se používala následující antibiotika: chloramfenikol (10µg/ml), kanamycin (50µg/ml), rifampicin (1µg/ml), tetracyklin (2,5µg/ml), erytromycin (0,05µg/ml).

5.2.1.1.2 Kultivace *Escherichia coli*

Bakteriální kultury *E. coli* byly kultivovány v tekutém LB médiu za stálého třepání při 37°C nebo byl použit tuhý LB agar. Pro selekci se používala následující antibiotika: ampicilin (100µg/ml), chloramfenikol, kanamycin (50µg/ml), spectinomycin (100µg/ml), tetracyklin (10µg/ml).

5.2.1.1.3 Tvorba konzerv *S. pneumoniae*

S. pneumoniae byl kultivován v 10ml CATc ve vodní lázni anaerobně při 37°C do $OD_{400nm} = 0,4$. Poté se odebere potřebné množství kultury a přidá se glycerol ke konečné koncentraci 15%. Skladování při -80°C.

5.2.1.1.4 Tvorba konzerv *E. coli*

Tvorba konzerv *E. coli* se provádí stejně jako u *S. pneumoniae*, kultivace probíhá v LB médiu.

5.2.1.1.5 Zjišťování citlivosti *S. pneumoniae* k analogům basí DNA

10ml CATc média s přidavkem analogu báse bylo inokulováno 200 μ l bakteriální kultury *S. pneumoniae*. Kultivace probíhala staticky ve vodní lázni při 37°C. Posléze po zvolených časových intervalech byla měřena absorbance OD_{400nm} a vytvořena růstová křivka.

5.2.1.1.6 Inkorporace analogů basí do DNA *S. pneumoniae* in vivo

CATc médium s přidavkem analogu báse (určeného k inkorporaci) bylo inokulováno bakteriální kulturou *S. pneumoniae*. Kultivace probíhala staticky ve vodní lázni při 37°C. Bakteriální kultury rostly do OD₄₀₀ = 0,5 a následně byla z bakteriální kultury izolována chromosomální DNA za účelem detekce inkorporované látky.

5.2.1.1.7 Mechanická desintegrace buněk

Bakteriální buňky desintegrovány pomocí French pressure cell press (SIMOAMINCO) dle pokynů výrobce či v mikrocentrifugačních zkumavkách se skleněnými kuličkami pomocí FastPrep (THERMOSEVANT) dle pokynů výrobce.

5.2.2 Manipulace s DNA

5.2.2.1 Izolace DNA

Izolace chromosomální DNA *S. pneumoniae*

Kulturou *S. pneumoniae* jsme inokulovali kompletní médium CAT (CATc) a inkubovali do OD₄₀₀ = 0,5 (začátek exponenciální fáze). Po centrifugaci 10min/10000g/4°C jsme buňky promyli fyziologickým roztokem a opět centrifugovali 10min/6500g/4°C. Buňky jsme resuspendovali v roztoku SEDS a inkubovali při 37°C dokud nedošlo k lyzi kultury. Přidali jsme proteinasu K a inkubovali 15 minut při 56°C. Přidali jsme jeden objem TE pufru a následovala extrakce směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol (25 : 24 : 1). Poté jsme centrifugovali 20min/6500g při laboratorní teplotě. Odebrali jsme horní (vodnou) fázi a znovu přidali směs fenol-chloroform-isoamylalkohol.

Počet extrakcí závisel na množství mezifáze. Nakonec jsme extrahovali samotným chloroformem a poté precipitovali chromosomální DNA přidáním 0,6 objemu isopropanolu po předchozím přidání 0,1 objemu 3 M NaOAc (několikanásobná inverze). Chromosomální DNA jsme promyli 80% ethanolem a nechali oschnout na vzduchu. Chromosomální DNA jsme přes noc rozpouštěli v TE pufru.

Izolace plasmidové DNA *E. coli* metodou alkalické lyze

Princip metody spočívá v denuraci DNA alkalickým pH následované rychlou renaturací. Plasmidová ccc-forma DNA (covalently close circle) renaturuje rychle, kdežto chromosomální DNA a proteiny precipitují s SDS, který následně tvoří komplex s draslíkem a je odstraněn centrifugací.

Izolovanou bakteriální kolonií jsme inokulovali 1,5 ml LB média s příslušným antibiotikem a inkubovali jsme přes noc při 37°C. Narostlou kulturu jsme centrifugovali 3 minuty při 13000 g a buňky jsme resuspendovali ve 100µl roztoku PEB1. Přidali jsme 200µl roztoku P2, šetrně promíchali a inkubovali 5 minut při laboratorní teplotě. Dále jsme přidali 150µl 3M acetátu draselného, opět šetrně promíchali a inkubovali 10 minut na ledu. Po centrifugaci 10min/13000g jsme odebrali supernatant obsahující DNA. K supernatantu jsme přidali jeden objem isopropanolu. Sraženinu plasmidové DNA jsme odstředili centrifugací 10min/13000g a promyli 80% ethanolem. Plasmidovou DNA jsme vysušili ve vakuu (SpeedVac) a rozpustili ve 20µl TE pufru s RNasou A (20µg/ml).

Izolace plasmidové DNA *E. coli* pomocí komerční soupravy (QIA prep Spin Miniprep kit, QIAGEN)

Pro přípravu plasmidové DNA určené pro další použití tj. v dostatečné čistotě (pro práci s modifikačními enzymy, pro přípravu konstruktů apod.) jsme používali komerční soupravu QIAprep[®] Spin Miniprep kit (QIAGEN). Při práci jsme dodržovali pokyny výrobce.

5.2.2.2 Precipitace DNA

K roztoku DNA jsme přidali 0,1 objemu 3 M acetátu sodného, pH 5.0 (vysoká iontová síla) a jeden objem isopropanolu. Roztok jsme promíchali (vortex) a centrifugovali 10min/13000g. Supernatant jsme odsáli a sraženinu DNA promyli 200µl 80% ethanolu. Po

centrifugaci 5min/13000g jsme vysráženou DNA vysušili ve vakuu (SpeedVac) a rozpustili v destilované vodě.

5.2.2.3 PCR

Amplifikace částí DNA pomocí PCR

Na ledu v tenkostěných mikrocentrifugačních zkumavkách se připravily reakční směsi složené z: templátové DNA, oligonukleotidů, směsi dNTP, reakčního pufru, H₂O a polymerasy. Používaly se: In-Fusion Enzyme – poxvirus DNA polymerasa (CLONTECH), LA DNA Polymerases Mix (TOP-BIO), Pfu Ultra polymerasa (STRATAGENE), Phusion DNA polymerasa (BIOLABS), Taq-Purple DNA polymerasa (TOP-BIO), T4 DNA polymerasa (BIOLABS). Pro výpočet teploty tání oligonukleotidů (T_m) jsme použili vzorec: $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 5$. Pokud byla templátem chromosomální DNA byly cykly opakovány 35x, pokud plasmidová DNA 25x. Konečné koncentrace jednotlivých složek na PCR reakce byly: 200 μ M dNTP, 25pmol každého oligonukleotidu, 1x ředěný reakční pufr, 100ng templátové DNA.

Rozpis amplifikačních reakcí:

Amplifikace genu *spr1057L* pro klonování do pTYB2

PCR směs: 2 μ l templátu; 2,5 μ l primeru HADEX-f; 2,5 μ l primeru HADEX-r; 5 μ l reakční pufr Pfu Ultra; 1 μ l Pfu Ultra polymerasy, 20 μ l dNTP; 17 μ l H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek

3. hybridizace primerů: 48°C - 30sek

4. elongace: 72°C - 60sek

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ověřovací klonování *spr1057L*

PCR směs: 0,5 μ l templátu; 1,5 μ l primeru HADEX-f; 1,5 μ l primeru HADEX-r; 2,5 μ l 10x LA PCR pufr complete; 0,5 μ l DMSO; 2,5 μ l LA DNA polymerasa, 1,2 μ l dNTP; 17,8 μ l H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 60sek

2. denaturace: 94°C - 15sek
 3. hybridizace primerů: 48°C - 30sek
 4. elongace: 68°C - 60sek
 5. závěrečná elongace: 72°C - 10min
- Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 30krát.

Ampifikace genu *spr1057L* pro infusion klonování do pTYB2

PCR směs: 0,2μl templátu; 2,5μl primeru HADEXf-1infusion; 2,5μl primeru HADEXr-1infusion r; 5μl reakční pufr Pfu Ultra; 1μl Pfu Ultra polymerasy, 20μl dNTP; 18,8μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek
3. hybridizace primerů: 47°C - 30sek
4. elongace: 72°C - 60sek
5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ampifikace genu *spr1057S* pro infusion klonování do pTYB2

PCR směs: 0,2μl templátu; 2,5μl primeru HADEXf-2infusion-short; 2,5μl primeru HADEXr-1infusion r; 5μl reakční pufr Pfu Ultra; 1μl Pfu Ultra polymerasy, 20μl dNTP; 18,8μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek
3. hybridizace primerů: 47°C - 30sek
4. elongace: 72°C - 60sek
5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ampifikace genu *spr1057L* pro infusion klonování do pET28b

PCR směs: 2μl templátu; 2,5μl primeru HADEX2L-f; 2,5μl primeru HADEX2-r; 5μl reakční pufr Pfu Ultra; 1μl Pfu Ultra polymerasy, 20μl dNTP; 17μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek
3. hybridizace primerů: 47°C - 30sek
4. elongace: 72°C - 60sek

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ampifikace genu *spr1057S* pro infusion klonování do pET28b

PCR směs: 2μl templátu; 2,5μl primeru HADEX2S-f; 2,5μl primeru HADEX2-r; 5μl reakční pufr Pfu Ultra; 1μl Pfu Ultra polymerasy, 20μl dNTP; 17μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek

3. hybridizace primerů: 47°C - 30sek

4. elongace: 72°C - 60sek

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ampifikace genu *spr1057L* pro infusion klonování do pCEP

PCR směs: 2μl templátu; 2,5μl primeru HADIN-CEP-FL; 2,5μl primeru HADIN-CEP-RL; 5μl reakční pufr Pfu Ultra; 1μl Pfu Ultra polymerasy, 20μl dNTP; 17μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek

3. hybridizace primerů: 47°C - 30sek

4. elongace: 72°C - 60sek

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ampifikace genu *spr1057S* pro infusion klonování do pCEP

PCR směs: 2μl templátu; 2,5μl primeru HADIN-CEP-FS; 2,5μl primeru HADIN-CEP-FR; 5μl reakční pufr Pfu Ultra; 1μl Pfu Ultra polymerasy, 20μl dNTP; 17μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 30sek

2. denaturace: 94°C - 30sek

3. hybridizace primerů: 47°C - 30sek

4. elongace: 72°C - 60sek

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ověřování integrace komplementačního konstruktu pCEP + spr1057 do chromosomu *S. pneumoniae*

PCR směs: 2μl templátu; 1μl primeru SP-CEP(amiF); 1μl primeru SP-CEP (kan); 5μl reakční pufr LA polymerasy; 0,5μl LA polymerasy, 2,5μl dNTP; 37μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 60sek

2. denaturace: 94°C - 15sek

3. hybridizace primerů: 52°C - 30sek

4. elongace: 58°C - 2min

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ověřování integrace komplementačního konstruktu pCEP + spr1057 do chromosomu *S. pneumoniae*

PCR směs: 2μl templátu; 1μl primeru SP-CEP(amiF); 1μl primeru SP-CEP (treR); 5μl reakční pufr LA polymerasy; 0,5μl LA polymerasy, 2,5μl dNTP; 37μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 60sek

2. denaturace: 94°C - 15sek

3. hybridizace primerů: 52°C - 30sek

4. elongace: 58°C - 2min

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 35krát.

Ověření integrace komplementačního konstruktu pJWHAD do bgaA (spr0565) chromosomálního lokusu *S. pneumoniae*

PCR směs: 2μl templátu; 1μl primeru LN32/C-bga-F; 1μl primeru HADEXr-1infusion; 5μl reakční pufr LA polymerasy; 0,5μl LA polymerasy, 2,5μl dNTP; 37μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 60sek

2. denaturace: 94°C - 15sek

3. hybridizace primerů: 52°C - 30sek

4. elongace: 68°C - 4min

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 30krát.

Ověření integrace komplementačního konstruktu pJWHAD do spr0564-0565 lokusu na chromosomu *S. pneumoniae*

PCR směs: 2μl templátu; 1μl primeru LN142/0565-R; 1μl primeru HADEXf-1infusion; 5μl reakční pufr LA polymerasy; 0,5μl LA polymerasy, 2,5μl dNTP; 37μl H₂O

Amplifikační cyklus: 1. počáteční denaturace: 94°C - 60sek

2. denaturace: 94°C - 15sek

3. hybridizace primerů: 52°C - 30sek

4. elongace: 68°C - 4min

5. závěrečná elongace: 72°C - 10min

Cyklus kroků 2 - 4 proběhl 30krát.

Koloniová PCR

Jako zdroj templátové DNA se používaly bakteriální kolonie. Provedení shodné z výše uvedeným postupem PCR, pouze byl navíc přidáván Tween 20 (polyoxyethylene - sorbitanmonolaurate), jež rozruší buněčné stěny a z bakteriálních buněk se uvolní DNA.

Purifikace PCR směsi

Po PCR reakci byly vzorky pro potřeby následné manipulace s amplifikovaným fragmentem purifikovány. Při práci se soupravou PCR Purification Spin Kit (GENOMED), jsme dodržovali pokyny výrobce.

5.2.2.4 Elektroforesa DNA

A Dělení molekul DNA podle velikosti je založené na jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli.

Analytická DNA elektroforesa

Pro analýsu DNA jsme používali horizontální agarosovou elektroforesu v pufru TAE. Hustota agarosového gelu závisela na velikosti dělených fragmentů a do gelu jsme přidávali ethidium bromid (interkalační činidlo) či netoxický GelRed (BIOTIUM) pro zviditelnění DNA v UV záření. DNA vzorky jsme nanášeli rozpuštěné v pufru 6x Loading

Dye Solution (0,09% BPB; 0,09% xylen cyanol FF; 60% glycerol; 60mM EDTA).
Fragmenty jsme separovali při napětí 5 V/cm a jejich velikost odečítali podle standardu.

Preparativní DNA elektroforesa

Fragmenty separované v agarosovém gelu jsme izolovali pomocí komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (JET QUICK) dle návodu výrobce.

5.2.2.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleas

Ke štěpení DNA jsme používaly široké spektrum restrikčních endonukleas. Při použití restrikčních endonukleas jsme se řídili pokyny výrobce, používali doporučené pufrы a dodržovali reakční podmínky. Pokud jsme při štěpení DNA dvěma různými enzymy nemohli použít stejný pufr, tak jsme mezi těmito kroky precipitovali DNA isopropanolem.

Purifikace restrikční směsi

V případě potřeby byly restrikční směsi purifikovány pomocí komerční soupravy MinElute kit (QIAGEN) postupem podle pokynů výrobce.

5.2.2.6 Ligace molekul DNA

Ligace molekul DNA

Ligaci molekul DNA jsme prováděli ve 20 μ l a snažili se dodržet molární poměr mezi vektorem a fragmentem 1 : 2. Používali jsme 1U ligasy a odpovídající ligační pufr (FERMENTAS; 40mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂; 10mM DTT; 0,5mM ATP; pH 7.8). Reakční směs jsme inkubovali přes noc při laboratorní teplotě.

Ligace pomocí In-fusion systému

In-Fusion 2.0 CF Liquid PCR Cloning Kit (CLONTECH) byl využíván ke klonování některých PCR produktů do vektorů pomocí virové polymerasy s 3'-5' exonukleasovou aktivitou (Polymerasa odštěpí přebytečné nukleotidy a následně pomocí nekovalentních vazeb spojí fragment který má na obou koncích naamplifikované 15 bp úseky pro připojení k vektoru. Finální kovalentní spojení se vytvoří až v *E. coli*.) (HAMILTON et al., 2007). Postup byl dodržován dle pokynů výrobce.

5.2.2.7 Transformace

Příprava kompetentních buněk *E. coli* JM109

Kompetentní buňky jsme připravovali metodou podle INOUE et al., (1990). 100 ml pŕdy SOB jsme inokulovali bakteriální kulturou ve stacionární fázi (0,4 ml) a kultivovali při teplotě 20°C za intenzivního třepání (250 ot/min). Jakmile kultura dosáhla $OD_{600} = 0,6$, kultivace byla přerušena a buňky jsme ochladili 10 minut na ledu. Po centrifugaci 10min/2500g/4°C jsme buňky resuspendovali v 32ml ledového pufru TB. Suspenzi jsme ochladili 10 minut na ledu a centrifugovali za stejných podmínek. Buňky jsme resuspendovali v 8ml pufru TB a následně jsme přidávali DMSO do konečné koncentrace 7%. Poté jsme buňky rozdělili do alikvótů a uchovávali při -70°C.

Příprava jednorázových kompetentních buněk *E. coli* BL21

10ml LB média jsme inokulovali bakteriální kulturou kompetentních buněk *E. coli* BL21. Kultivace probíhala při 37°C do $OD_{600} = 0,5$. Následně byl odebrán aliquot 1,5ml kultury a centrifugován při 3000g/5min. Peleta buněk se dvakrát promývala 1ml 100mM $CaCl_2$ a resuspendovala ve 100μl 100mM $CaCl_2$. Buňky se uchovávají na ledu a transformují teplotním šokem.

Transformace kompetentních buněk *E. coli* (JM109, BL21) plasmidovou DNA teplotním šokem

Metoda je založena na teplotním šoku, který usnadní průchod plasmidové DNA bakteriální buněčnou stěnou.

Kompetentní buňky jsme rozmrazili na ledu a přidali k nim 1/10 objemu ligační směsi. Opatrně jsme promíchali a nechali inkubovat 30 minut na ledu. Následoval teplotní šok 1,5 minuty při 42°C a rychlé ochlazení 1,5 minuty na ledu. K buněčné suspenzi jsme přidali čtyři objemy přehřátého LB média a kultivovali 1 hodinu při 37°C ve vodní lázni (inkubace zabezpečí plnou expresi rezistence k antibiotiku). Suspenzi jsme po inkubaci vyseli na plotnu s LB půdou obsahující příslušné antibiotikum.

Transformace SURE Elektroporation - Competent *E. coli* plasmidovou DNA elektroporací

Transformace SURE Elektroporation - Competent *E. coli* (STRATAGENE) plasmidovou DNA byla prováděna elektroporací dle pokynů výrobce. Elektroporace byla prováděna ve vychlazených elaktroporačních kyvetách (vzdálenost elektrod 2mm), na elektroporátoru (BIORAD) pulsem: kapacitance 25μF, napětí 2,5kV, odpor 200Ω.

Transformace *S. pneumoniae*

Tato metoda nevyužívá přirozené kompetence *S. pneumoniae*, ale stav kompetence je indukován přidáním feromonu CSP.

Kulturu jsme zaočkovali do CTM média a staticky kultivovali při 37°C do OD₄₀₀ = 0,1-0,12. Suspenzi jsme naředili a 10μl naředěných buněk (ředění 10⁻¹ - 10⁻⁵) jsme přidali ke směsi: 1ml CTM, 1ml směsi CTM + agar (1:1), 500μg CSP, 2μg linearizovaného plazmidu (základ druhé vrstvy, přehřátý na 48°C) a vyseli na misky. Po 4 hodinové inkubaci při 37°C jsme misky převrstvili gelosou G s příslušným antibiotikem. Z gelosy byly jednotlivé kolonie přeočkovány na krevní agar s příslušným antibiotikem.

5.2.2.8 Imunodetekce

Imunodetekce za účelem sledování inkorporace BrdU do chromosomální DNA *S. pneumoniae* byly prováděny pomocí protilátek: Anti-Bromdeoxyuridine - myší monoklonální (ROCHE) spolu s Anti-Mouse IgG-POD - sekundární konjugovaná s peroxidasou (SIGMA) či Anti-Bromdeoxyuridine-POD - myší monoklonální (ROCHE). Vzorky byly naneseny na Hybond-N⁺, nylonovou membránu (AP CZECH) a fixovány 3 minuty UV světlem. Membrána byla inkubována 30 minut v PBS-T s 5% BSA a 3x po 10

minutách promyta v PBS-T s 1% BSA. Následovala inkubace přes noc při 4°C v PBS-T s 5% BSA s primární protilátkou Anti-Bromdeoxyuridine ředěnou 1:1000 či Anti-Bromdeoxyuridine-peroxidasa ředěnou 1:1000. Membrána byla promyta PBS-T s 1% BSA 3x po 10 minutách. Při použití primární protilátky Anti-Bromdeoxyuridine následovala inkubace 1 hodinu v PBS-T se sekundární protilátkou Anti-Mouse IgG-POD ředěnou 1:10000 a opět trojnásobné 10 minutové promytí PBS-T. Detekci jsme prováděli pomocí chemiluminiscence (ECL-enhanced chemiluminiscence). Roztoky komerční soupravy Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce) jsme smíchali 1 : 1 a pipetovali na membránu tak, aby byl pokryt celý povrch. Po 5 minutovém působení jsme membránu opláchli destilovanou vodou, zatavili do fólie a založili do kazety s RX filmem a následně jsme film vyvolali.

5.2.3 Manipulace s proteiny

5.2.3.1 Indukce a proteinová exprese

Indukce a proteinová exprese v *E. coli* pomocí IPTG

Buňky *E. coli* BL21 obsahující rekombinantní expresní vektory (pTYB2) jsme kultivovali v LB médiu se selekčním antibiotikem za stálého třepání při 37°C do dosažení $OD_{600} = 0,6$. Ke kultuře jsme přidali IPTG do konečné koncentrace 0,5mM. Po následné kultivaci probíhající 16 hodin při 15°C a za stálého třepání byly proteiny frakcionovány a použity pro analýzu pomocí SDS-PAGE elektroforesy.

Před přidáním IPTG, 3 hodiny po přidání a 16 hodin po přidání jsme odebírali časové odběry bakteriální kultury pro sledování průběhu proteinové exprese.

Indukce a proteinová exprese v *S. pneumoniae* pomocí maltosy

Pro proces indukce a exprese proteinů v buňkách *S. pneumoniae* obsahujících rekombinantní expresní vektory (pCEP) bylo použito stejné provedení jako výše popsáný postup pouze s malými modifikacemi. K indukci jsme používali 20% maltosu o finální koncentraci 0,2mM a kultivace probíhá staticky ve vodní lázni při 37°C. Po kultivaci byly bakteriální kultury denaturovány při 100°C 10 minut a použity pro analýzu pomocí SDS-PAGE elektroforesy.

Indukce a proteinová exprese v *S. pneumoniae* pomocí Zn^{2+}

Pro proces indukce a exprese proteinů v buňkách *S. pneumoniae* obsahujících rekombinantní expresní vektory (pWV25) bylo použito stejné provedení jako výše popsany postup pouze s malými modifikacemi. K indukci jsme používali $ZnCl_2^{2+}$ o finální koncentraci 0,05 - 0,15 mM a kultivace probíhá staticky ve vodní lázni při 37°C. Po kultivaci byly bakteriální kultury dezintegrovány pomocí skleněných kuliček ve FastPrepu (THERMOSEVANT) dle pokynů výrobce a byly použity pro analýsu pomocí SDS-PAGE elektroforesy.

5.2.3.2 Frakcionace proteinů

Bakteriální kulturu jsme pěstovali v 50 ml kompletního média CAT do $OD_{400} = 1$ a poté centrifugovali 10min/10000g. Buňky jsme promyli ve 20ml pufru (10mM Tris) a znovu centrifugovali. Následně jsme buňky promyli 1ml pufru PSB (50mM Tris, pH 7.5; 100mM NaCl; 0.5mM EDTA; 1mM DDT; 10% glycerol) (10min/6000g) a nakonec resuspendovali v 0,5ml tohoto pufru. Buňky jsme dezintegrovali a nerozbité buňky jsme odstředili (10min/6000g). Ze supernatantu jsme odebrali 100 μ l a uschovali v -20°C (celkový lyzát). Zbylých 400 μ l jsme frakcionovali centrifugací 20min/100000g/4°C, abychom získali membránovou frakci. Supernatant představující cytoplasmatickou frakci jsme odebrali a uchovávali v -20°C, a pelet představující frakci membránovou jsme rozpouštěli ve 100 μ l PSB a také uchovávali v -20°C.

5.2.3.3 SDS-PAGE elektroforesa

K analýze proteinů jsme využívali vertikální SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (SDS-PAGE). Probíhá v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS). Proteiny poté mají v gelu uniformní záporný náboj, pro separaci je důležitá jen jejich velikost. Vzorek proteinu se smísí s tzv. vzorkovým pufrem, který mimo SDS obsahuje i redukční činidlo dithiothreitol nebo β -merkapt ethanol. Působením těchto látek dojde k rozrušení kvarterní, terciární a do značné míry i sekundární struktury.

Analyzovaný vzorek jsme před nanesením inkubovali s SDS vzorkovým pufrem 10 minut při 100°C. Elektroforéza probíhala v SDS elektrodovém pufru (6g Tris; 26g glycin; 1g SDS (na 1l)) při napětí 10V/cm² v zaostřovacím gelu a při napětí 15V/cm²

v gelu separačním. Používali jsme 10% či 12% separační gel a 4% zaostřovací gel, které byly připraveny následujícím způsobem:

	12% separační gel	14% separační gel	4% zaostřovací gel
30% akrylamid	5,6ml	6,5ml	530ul
1,5M Tris pH 8,8	3,5ml	3,5ml	-
0,5M Tris pH 6,8	-	-	1ml
10% SDS	140ul	140ul	40ul
voda	4,7ml	3,8ml	2,6ml
TEMED	14ul	14ul	5ul
10% APS	140ul	140ul	40ul

Tab. 5. 1. : Složení proteinových gelů

5.2.3.4 Barvení proteinového gelu Coomassie Blue

Proteiny jsme obarvili pomocí Coomassie Brilliant Blue (G-250) následujícím způsobem. Proteiny byly fixovány 50% kyselinou trichloroctovou 30 minut. Promyty 3x po 5 minutách odbarvovacím roztokem Page Washem (20% methanol, 10% kyselina octová). Barvení gelu roztokem Coomassie blue (45% methanol, 10% kyselina octová, 0,1% Coomassie blue R-250) 20 minut. Odbarvení gelu odbarvovacím roztokem. Gely byly uchovávány v elektronické podobě.

5.2.3.5 Přenos proteinů na membránu (Western přenos)

K přenesení proteinů rozdělených pomocí SDS-PAGE z gelu na PVDF membránu (MILLIPORE) jsme použili přístroj The Panther Semi-Dry Electroblotter (OWL SCIENTIFIC). Při sestavování aparatury jsme se řídili pokyny výrobce. Membránu jsme nejprve smočili v methanolu a poté ekvilibrovali v přenosovém pufru (39mM glycin; 48mM Tris; 0,0375% SDS; 20% methanol). Přenos probíhal 2 hodiny za podmínek stanovených výrobcem (0,8 A/cm² membrány).

Na membráně jsme proteiny následně detekovali pomocí imunodetekce.

5.2.3.6 Imunodetekce

K Imunodetekcím imobilizovaných proteinů na PVDF membráně byly používány protilátky: Anti-CBD-anti-chitin binding domain serum, králičí monoklonální (BIOLABS) a Anti-Rabbit IgG-POD - sekundární konjugovaná s peroxidasou (SIGMA) či Anti -His-POD - monoklonální konjugovaná s peroxidasou (SIGMA).

Při použití primární monoklonální protilátky Anti-CBD-anti-chitin binding domain serum a sekundární protilátky Anti-Rabbit IgG-POD - sekundární konjugovaná s peroxidasou, byly imobilizované proteiny na PDF membráně blokovány 1 hodinu v TBS-T s 3% BSA. Membránu jsme promyli 3x po 10 minutách v TBS-T. Inkubovali v TBS-T s 1% BSA a primární protilátkou ředěnou 1 : 5000 ve 4°C. Trojnásobné promytí membrány v TBS-T po 10 minutách. Inkubace v TBS-T se sekundární protilátkou ředěnou 1 : 10000 1 hodinu. Promytí membrány v TBS-T 3x po 10 minutách. Detekci jsme prováděli pomocí chemiluminiscence (ECL - *enhanced chemiluminiscence*). Roztoky komerční soupravy Super Signal Chemiluminescent Substrate (PIERCE) jsme smíchali 1 : 1 a pipetovali na membránu tak, aby byl pokryt celý povrch. Po 5 minutovém působení jsme membránu opláchli destilovanou vodou, zatavili do fólie a založili do kazety s RX filmem a poté jsme film vyvolali.

Při použití protilátky Anti -His-POD - monoklonální konjugovaná s peroxidasou byly imobilizované proteiny na PDF membráně blokovány 1 hodinu v TBS-T s 3% BSA. Membránu jsme 3x promyli po 10 minutách v TBS-T. Inkubovali v TBS-T s 1% BSA a protilátkou ředěnou 1 : 10000 1hod. Třikrát promyli v TBS-T po 10 minutách a prováděli detekci ECL.

5.2.3.7 Izolace a purifikace proteinů

Purifikace a izolace proteinů s chitinovou kotvou

Proteiny fúzované s inteinem nesoucí chitinovou kotvou jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie za použití komerční soupravy IMPACTTM-CN (BIOLABS). Při purifikaci jsme postupovali podle návodu výrobce.

Izolace proteinů s histidinovou kotvou

Proteiny fúzované s histidinovou kotvou jsme izolovali pomocí afinitní chromatografie za použití komerční soupravy TALONspin Column Kit (Clontech). Při purifikaci jsme postupovali podle návodu výrobce.

5.2.3.7 Dialýza proteinů

Dialýzu proteinů jsme prováděli v příslušném dialyzačním pufru (25mM Tris pH 7,5; 100mM NaCl) vychlazeném na 4°C 16 hodin. Objemu pufru byl používán minimálně 1000x větší, než byl objem dialyzovaného vzorku. Dialýza probíhala přes noc při 4°C za stálého míchání dialyzačního pufru v němž byl umístěn proteinový vzorek uvnitř dialyzačního střívka (Dialysis Tubing, SERVA). Během dialýzy se pufr ideálně třikrát mění, nejprve po 1,5 hodině dialýzy, po 16 hodinách a následně po 1,5 hodině. Po skončení dialýzy byl vzorek uchováván při -20°C.

5.2.3.8 Měření koncentrace proteinu

Množství proteinů jsme stanovovali podle SMITH *et al.* (1985) pomocí komerční soupravy (BCA Protein Assay Reagent). Jedná se o metodu, která umožní kolometricky stanovit koncentraci proteinů. Roztoky A a B jsme smíchali podle instrukcí výrobce. K 5 μ l každého vzorku jsme přidali 1ml této směsi a inkubovali 30 minut při 37°C. Pro vytvoření kalibrační křivky jsme použili zásobní roztok BSA (2mg/ml), z něž jsme připravili ředící řadu, která obsahovala 0, 20, 40, 60, 80 a 100 μ g proteinu. Vzorky ředící řady jsme inkubovali obdobným způsobem. Míru vzniklého modrofialového zbarvení jsme měřili jako absorbanci při vlnové délce 562nm. Ze získaných dat pro koncentrační řadu standardu jsme sestrojili graf závislosti absorbance na koncentraci proteinů a pomocí rovnice regrese vypočítali koncentraci proteinů ve vzorcích.

5.2.3.9 Koncentrování proteinů

Proteiny byly koncentrovány pomocí centrifugace na kolonkách CENTRICON (MILLIPORE) dle pokynů výrobce.

5.2.3.10 Fosfatasová reakce

Pro stanovení fosfatasové aktivity proteinů byla používána komerční souprava Serine/Threonine Phosphatase Assay System (PROMEGA) či P-nitrophenyl phosphate liquid substrate systém (SIGMA) dle pokynů výrobce (BAVKOV et. al., 1988). Pro stanovení optimálních koncentrací esenciálních dvoumocných iontů jsme měnili jejich koncentrace a pro stanovení optimální reakční teploty a pH jsme měnili i tyto parametry. Při stanovení afinity enzymu k jednotlivým substrátům jsme měnily typy substrátů.

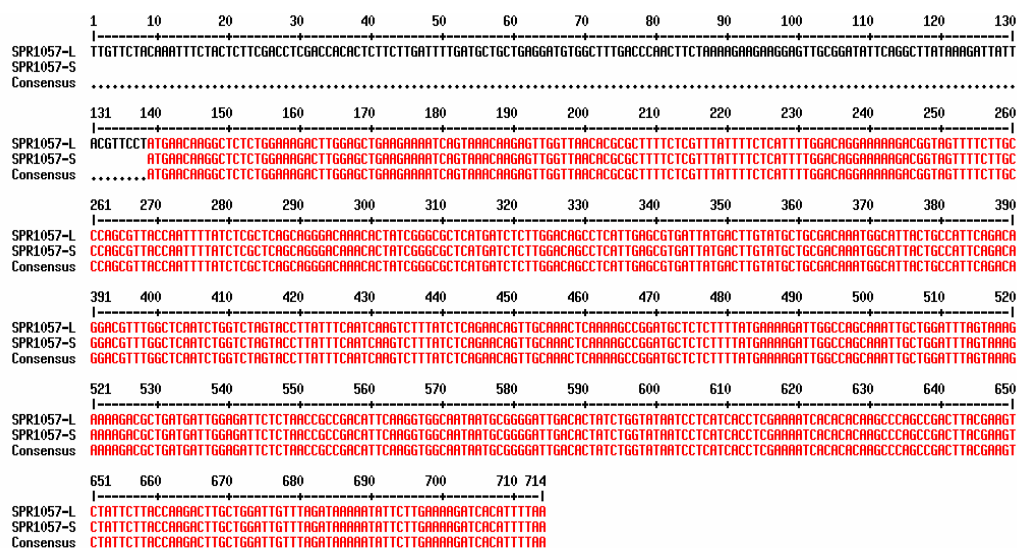
Reakce jsme analyzovali pomocí spektrofotometru Microplate Readeru XFluor4 SafireII™ (TECAN). Měřili jsme absorbanci při 600nm a pomocí kalibrační přímky vypočítané z absorbance standardu jsme vypočítali množství uvolněného fosfátu v reakci.

6 VÝSLEDKY

6.1 Analýza sekvence proteinu Spr1057 *S. pneumoniae* jako možného homologa proteinu YjjG *E. coli*

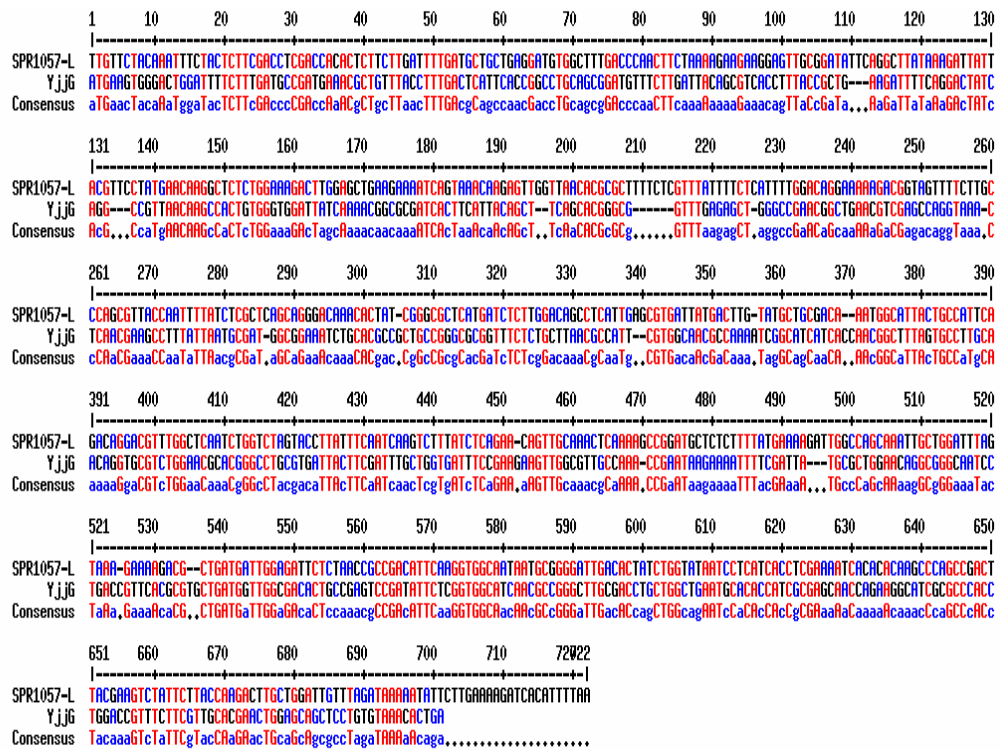
Spr1057 je konzervovaný hypotetický protein *S. pneumoniae* o neznámé biologické funkci z rodiny HAD hydrolas. Předpokládali jsme, že by se mohlo jednat o „house-cleaning“ nukleotidfosfatasu se substrátovou specifitou k modifikovaným nukleobasím.

Protein Spr1057 *S. pneumoniae* je kódován genem *spr1057* o délce 714 bp s poměrem zastoupení GC párů 41.21%. Gen *spr1057* byl anotován v databázích ve dvou formách, v původní variantě delší *spr1057L* (714 bp) a možné druhé kratší *spr1057S* (514 bp). Pro delší variantu genu svědčí skutečnost, že v tomto případě lze jednoznačně před iniciačním kodónem identifikovat přítomnost ribosom-vázebného místa, zatímco před kratší verzí nikoliv. Přesto jsme v počáteční fázi diplomové práce připravili obě varianty (expresní a komplementační konstrukty), abychom vyloučili možnost omylu.



Obr. 6. 1. : Nukleotidové sekvence variant genu *spr1057* - *spr1057L* a *spr1057S* *S. pneumoniae*

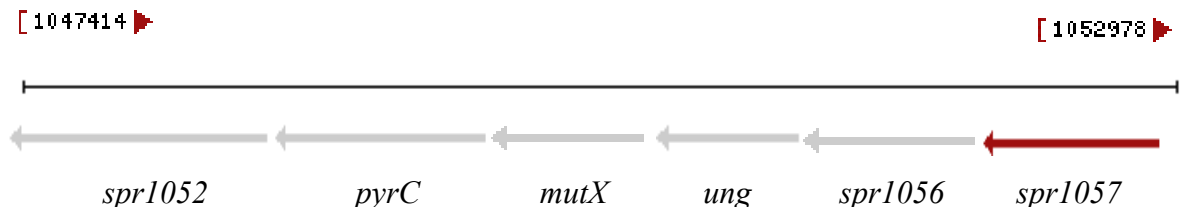
(zpracováno v programu multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)



Obr. 6. 2. : Srovnání nukleotidových sekvencí genů *spr1057L* a *yjjG*

(zpracováno v programu multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

Gen *spr1057* je prvním genem v operonu *spr1052 - spr1057* jehož součástí jsou kromě *spr1057* ještě geny *spr1052*, *pyrC*, *ung*, *spr1056* a *mutX*. Gen *spr1052* kódující protein Spr1052 patří do MATE effluxní skupiny proteinů. Gen *pyrC* kóduje protein PyrC, dihydroorotasu. Gen *mutX* kóduje protein MutX což je 8-oxo-dGTP nukleosid-trifosfataza. Jedná se o homolog MutT proteinu *E. coli*, hydrolyzující 8-oxo-dGTP na 8-oxo-dGMP a tak chrání buňku před inkorporací chybného nukleotidu do DNA. Gen *ung* kóduje DNA-uracil glykosylasu, enzym účastnící se opravných mechanismů DNA. Gen *spr1056* kóduje protein s neznámou funkcí.



Obr. 6. 3. : Operon *spr1052 - spr1057* *S. pneumoniae*

Hypotetický protein Spr1057 se skládá z 237 aminokyselin s molekulovou hmotností 18,02 KDa. Protein Spr1057 *S. pneumoniae* je s proteinem YjjG *E. coli* z 32% identický, přičemž jsou konzervovány všechny aminokyseliny katalytických domén.

YjjG *E. coli* (225 aa)

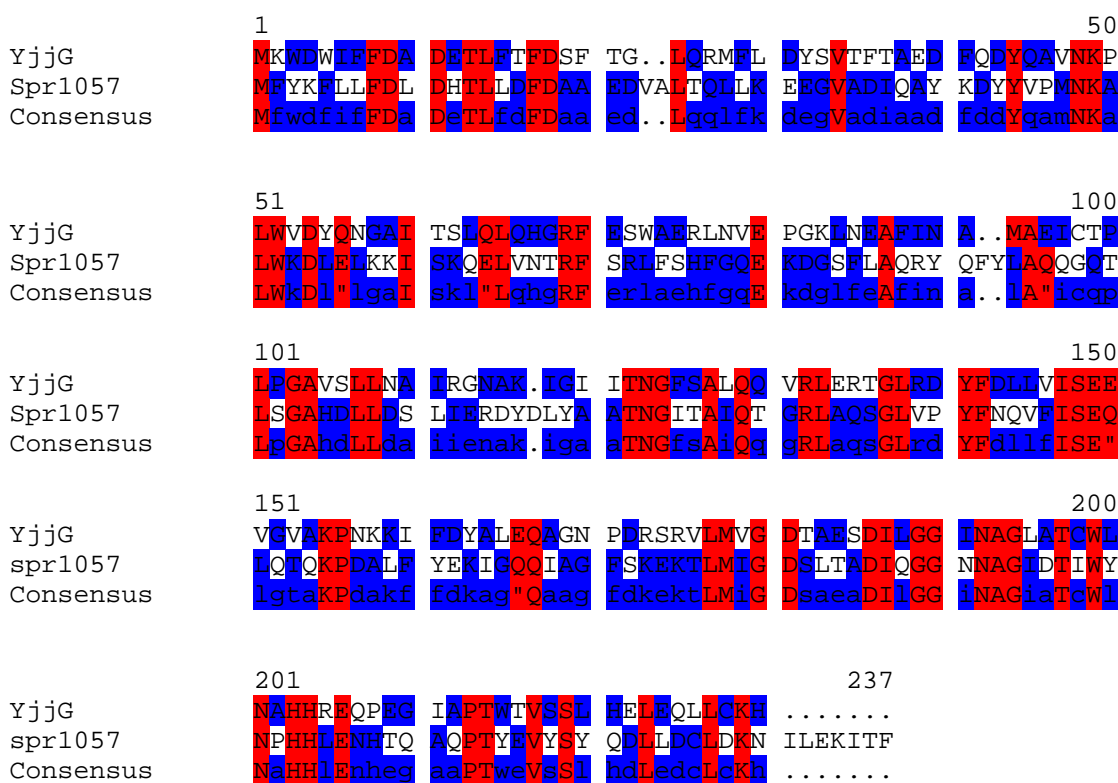
1 mkwdwiffda detlftfdfs tglqrmfldy svtftaedfq dyqavnkplw vdyqngaits
 61 lqlqhgrfes waerlnvepg klneafinam aeictplpga vsllnairgn akigiitngf
 121 salqqvrler tglrdyfdll viseevgvak pnkkifdyal eqagnpdrsr vlmvgdtaes
 181 dilgginagl atcwnlahhr eqpegiaptw tvsslheleg llckh

Spr1057 *S. pneumoniae* (237 aa)

1 mfykflldl dhtllfdaa edvaltqllk eegvadiqay kdyvvpnmka lwkdlelkki
 61 skqelvntrf srlfshfgqe kdgsflaqry qfylaqqgqt lsgahdlds lierdydlya
 121 atngitaiqt grlaqsglvp yfnqvfiSEQ lqtqkpdalf yekigqqiag fskektlmig
 181 dsltadiqgg nnagidtiwy nphhlenhtq aqptyevvysy qdlldcldkn ilekitf

Obr. 6. 4. : Aminokyselinová sekvence proteinů YjjG *E. coli* a Spr1057 *S. pneumoniae*

(NCBI)



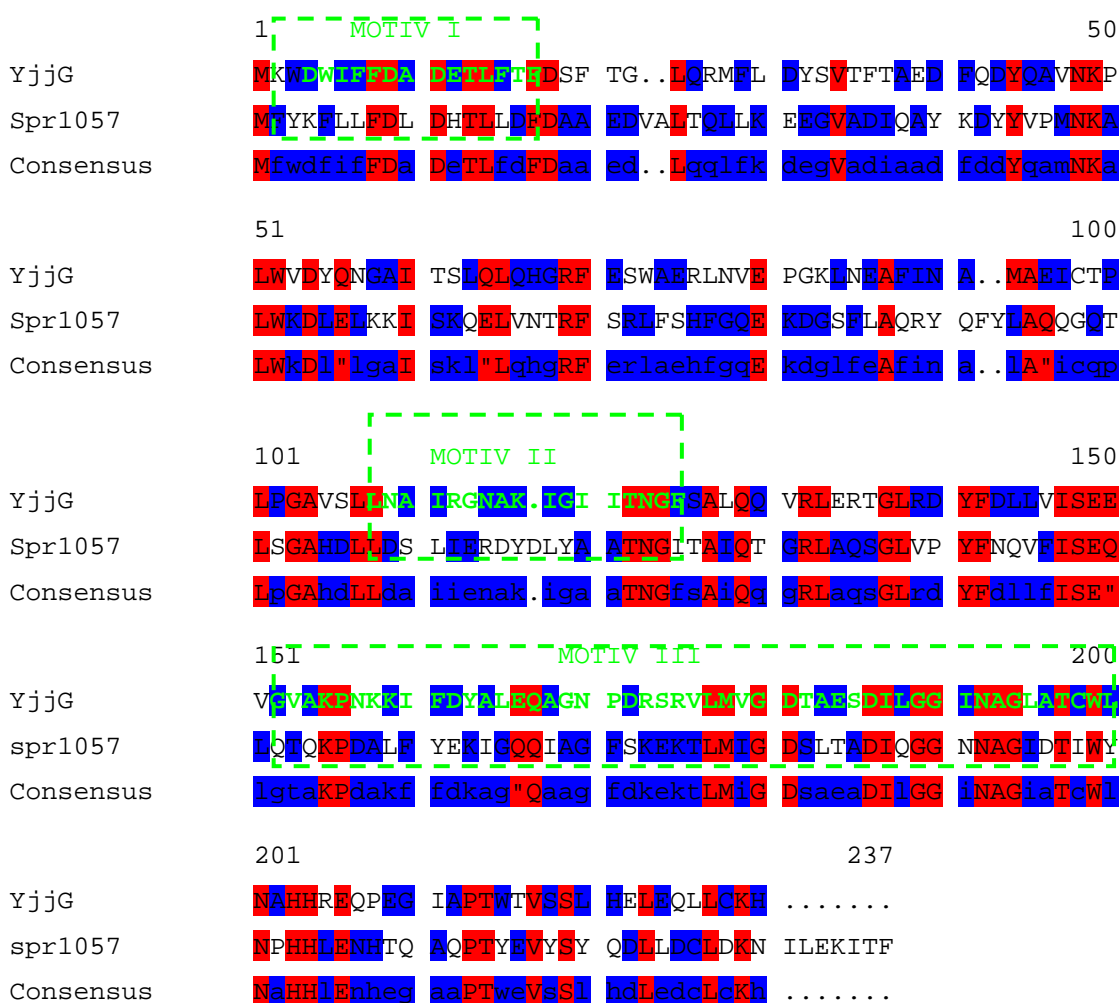
Obr. 6. 5. : Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinů YjjG a Spr1057

(zpracováno v programu multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

Proteiny rodiny HAD hydrolas mají celkově nízkou sekvenční podobnost (< 29%) soustředěnou do 3 krátkých katalytických motivů, jež lze u proteinu Spr1057 také jednoznačně identifikovat..

	MOTIF I	MOTIF II	MOTIF III	
YJGB (10)	SALTFDDDDTLIDYN (97)	LKOLAKKWPVAITNGN (21)	GRSKPFSDFYFLAAEKLNVPIGE - - - I LHYGDDDLTTDVGGAIRSGMOACWI (31)	
YJG (3)	DWTFDDADDTLFTF (86)	LNAIRGNAGKGITNGF (26)	GVAKPNKKFDYALEQAGNPDRSR - - - VLMVGDTAESDILGGINAGLATCWL (30)	
YFBT (3)	KGFLFDADGTLVDS (75)	SHEENKAGIPWAVTNGS (25)	KRKGPEPDAYLLGAQLLGLAPOE - - - CVVVDHAPAGVLSGLAAGCHIVAV (35)	
GPH (7)	RGVAFDDGTLVDS (99)	GALQAKGLPGLVNTKP (26)	QNKPKHPDPLLVAERMGIAPQO - - - LFVGDSDRN-DLDAQAAGCPSVGL (42)	
YNIC (7)	LAAIFDDMDGTLIDS (80)	ALCKEQGLLVGASASP (26)	PYSKPHPOYFLDCAAKLGVDPDLT - - - CVALHDSRN-GMIASKAARMRSIVV (31)	
YCJU (3)	QGVIFDDGTLTDT (85)	ADLRAQOISVGVASVSL (24)	KNSKPDPEYFLAACAGLVVPPQA - - - CIGLHDSVA-GAOSGIDAGMEVFFV (29)	
YOAB (5)	AGLIFDDMDGTLIDT (76)	VQSWHGRRPMAVGTGSE (26)	KHKKPADPTFLLCARMGVQPTQ - - - CVVFFHDAFGIQAARAAGMDAVDV (3)	
YIEH (4)	EAVFFDDGTLVDS (76)	ALLSAITAPGVVSSNGP (27)	QRWKPDPAFMHAAKAMNVNVEN - - - CILVDDSSVA-GAOSGIDAGMEVFFV (36)	
YIHX (7)	GNVIFDDENRVLG (72)	HKLREOGHRVVLSSNTN (27)	GMRKPEARVYOHVLOAEGFSPSD - - - TVFFDDNAD-NIEGANQLGITSIIV (30)	
YRFG (10)	DTVLFDDMDGTLIDL (78)	EALKASGKQRIELTNAH (26)	GYPKPDQRVHVAVAEATGKAEK - - - TLFIDDSEA-ILDAAAQFIRYCEG (30)	
SERB (110)	GLLVFDDMDGTLATQI (86)	LKLETLGWKVAIVASGGF (38)	AQYKAKT - - - TRL-AQEYELPLAQ - - - TVAIGDGAN-DLPMIKAAGLGIAYH (30)	
NAGB (3)	KNVIFDDGTLVMDH (11)	HGIMDKGLPVELTNY (127)	YVGRKSPWVIRAAALNKMQAHSEE - - - TVIVGDNLRITDLAGFQAGLETIV (30)	
YEDP (7)	LLVFSDDGTLIDS (12)	TRLEARNVPIVICSSTK (134)	SAGKDOAANWIIATYQQLSGKRPT - - - TGLGDDGPN-DAPLLEVMDYAVIVK (39)	
OTSB (14)	YAWFFDDGTLAEI (18)	LLATASDGAALISGRS (108)	GTSKGEA - - - AAFMQEAPFVIGRT - - - PVFLGDDLT-DESGFAVVRNLGGMS (50)	
COF (2)	RLAAFDMDGTLVMD (12)	ARLRERDITTFATGRH (140)	GCNKGA - - - TVL-TQHLGELSLRD - - - CMAFGDAMN-DREMLVSVSGFIMG (42)	
YIGL (2)	QVVASDDGTLVMD (12)	KLLTARGINEVFATGRH (142)	GYSKGAH - - - EAV-AKKLGYSLKD - - - CMAFGDAMN-DAEMLSMAGKCGIMG (34)	
BHA (3)	RVVAFDDGTLVMD (12)	ARAREAGYQIVTGRH (149)	GNSKGR - - - TKW-VEAQQWSMEN - - - VVAFGDNFN-DISMLEAAGTVGAMG (31)	
YIDA (3)	KLVAFDDGTLVMD (12)	AAARARGVNVVTTGR (147)	RVNKGTV - - - KSL-ADVLTGKPEE - - - IMAFGDQEN-DEMIAYAGVGMAD (32)	
YBIV (3)	KVIVFDDMDGTLVMD (13)	QELKKRGIKVFVASGNQ (141)	GLBKANG - - - SRL-LKRWDLSPON - - - VVAFGDSGN-DAEMLKMARYSFAMG (38)	
YBHI (3)	KLVAFDDGTLVMD (12)	QOMKAQGIREFVASGNQ (141)	GVBKANG - - - RQL-QKLWGDIDSE - - - VVAFGDDGN-DEMIERQAGFSFAME (38)	
YRBI (26)	RLLIFDDMDGTLVMD (22)	RCALTSDFEIVATIGRK (19)	OSNKLIA - - - FSDLLEKLAIPEN - - - VVAFVYDGLL-DWVPMKVKGLSVAVA (45)	
YAEI (3)	PAVFLDRDGTINVD (20)	RELKMGFAVAVVITNQS (31)	DNKPHPG - - - LLSARDYLHIDMAA - - - SYMVGDKLE-DMQAQVAANVGTKVL (37)	
HISB (3)	KYVFLDRDGTINVD (23)	LKLOKAGYKIVVITNOD (100)	INVKGDLY - - - DDHHTVEDTGLALGEALK - - - IALGDKRGCIFGFVLPMDDECLAR (87)	

Obr. 6. 6. : Konzervované katalytické motivy HAD hydrolas (KUZNETSOVA et. al., 2006)



Obr. 6. 7. : Porovnání aminokyselinových sekvencí proteinů YjjG a Spr1057 se zakreslenými konzervovanými katalytickými motivy HAD hydrolas

(zpracováno v programu multalin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

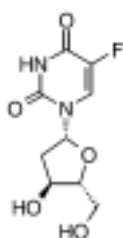
Na základě zjištěných skutečností, tj. podobností sekvencí na úrovni jak aminokyselinové tak nukleotidové a přítomnosti konzervovaných katalytických motivů společných nadčeledi HAD hydrolas jsme formulovali hypotese, že protein Spr1057 *S. pneumoniae* by mohl být funkčním homologem proteinu YjjG *E. coli*.

6.2 Testování citlivosti *S. pneumoniae* k analogům basí

Pomocí této metody, založené na sledování růstu v přítomnosti analogů basí jsme testovali citlivost *S. pneumoniae* k analogům nukleových basí 5-FUdR a 5-BrdU.

Pokusy byly inspirovány a navrhovány podle experimentů provedených u *E. coli* vedoucích ke stanovení funkce YjjG (TITZ B. et al 2007). Zde byla citlivost testována s pyrimidinovým derivátem 5-fluoro-2'-deoxyuridinem (5-FUdR) a potenciálním mutagenním nukleotidem 5-bromo-2'-deoxyuridinem (5-BrdU) a to jednak u *E. coli* (WT) a u mutantu *E. coli* ($\Delta yjjG$).

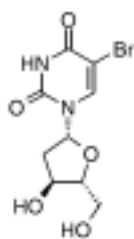
Obr. 6. 8. : 5-fluoro-2'-deoxyuridin (5-FUdR)



5-FUdR je o toxický modifikovaný nukleotid. Jedná se o pyrimidinový derivát. Tento derivát je buď jednou fosforylací thymidinkinasou přeměněn na 5-fluoro-dUMP (O'DONOVAN & NEUHARD, 1970) či štěpen thymidinphosphorylasou na 5-fluorouracyl. 5-fluoro-dUMP inhibuje syntesu thymidinu a tak blokuje syntesu DNA (COHEN et al., 1958; SANTI et al., 1974). 5-fluorouracyl se může inkorporovat do RNA, blokovat translaci proteinů (WILKINSON & CRUMLEY, 1977; KUFE, 1981), či eventuálně může dojít k jeho začlenění do DNA a interferenci s DNA metabolismem (HERRICK et al., 1982; MAJOR et al., 1982).

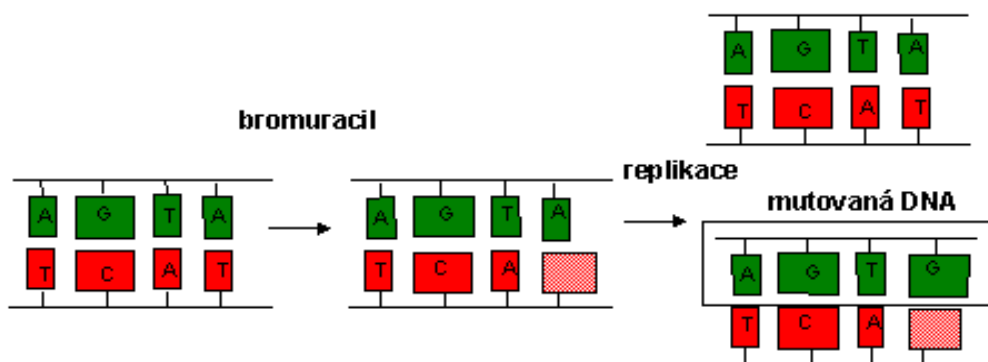
Průkaz senzitivity k 5-FUdR: U mutantu *E. coli* ($\Delta yjjG$) se ukázala vysoká citlivost k 5-FdUR (i jiné fluoropyrimidinové deriváty). Růst mutantu byl kompletně inhibován při 1 μ M koncentraci 5-FUdR. Expres YjjG z plasmidu umožní reverzi fenotypu mutantu. (TITZ et al., 2006).

Obr. 6. 9. : 5-bromo-2'-deoxyuridin (5-BrdU)



BrdU je potenciálně mutagenní nukleotid. Jedná se o syntetický purinový derivát, představující analog thyminu. Tento derivát je schopen inkorporace do chromosomální DNA. Během probíhající replikace DNA (v S fázi buněčného cyklu) je schopen se inkorporovat do DNA místo thyminu, kde se běžně jako ketoforma může párovat s adeninem a nebo, díky tautomerii basi v enolformě párovat s guaninem, což je příčinou mutací.

Průkaz senzitivity k 5-BrdU: U mutanta *E. coli* (Δyjg) se ukázala vysoká míra inkorporace 5-BrdU do chromosomální DNA (TITZ et al., 2006). Expresse YjjG z plasmidu umožní reverzi fenotypu mutanta.

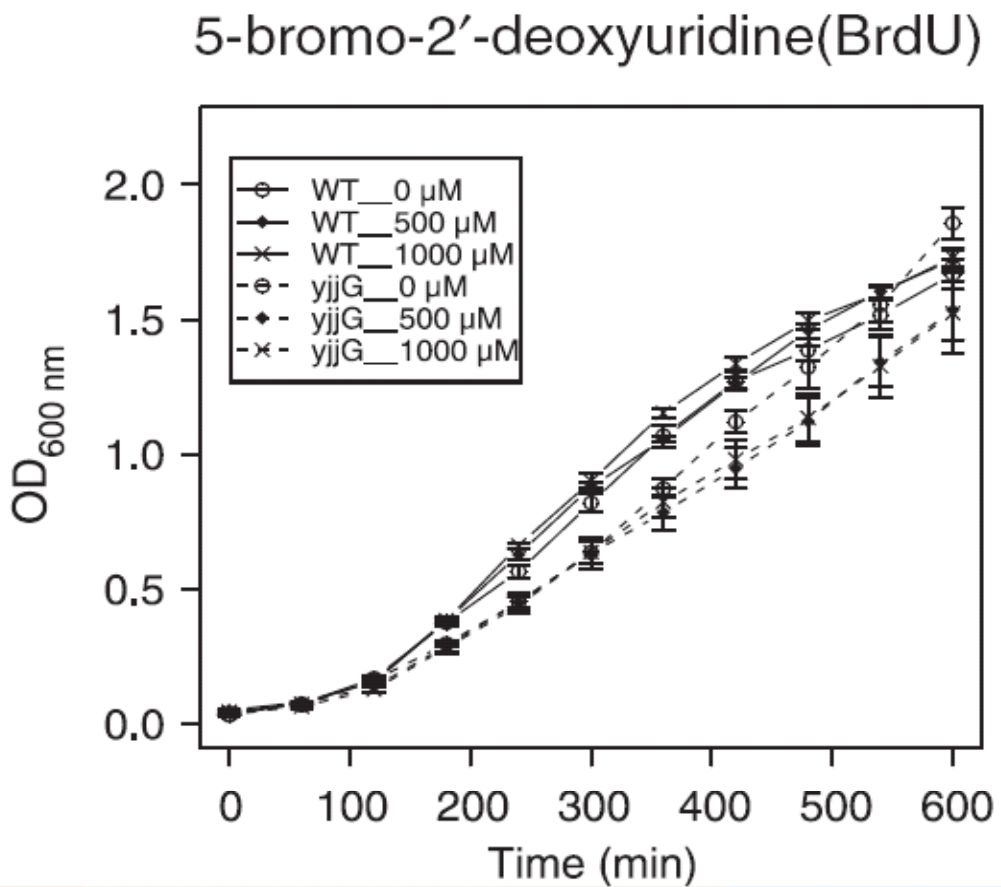
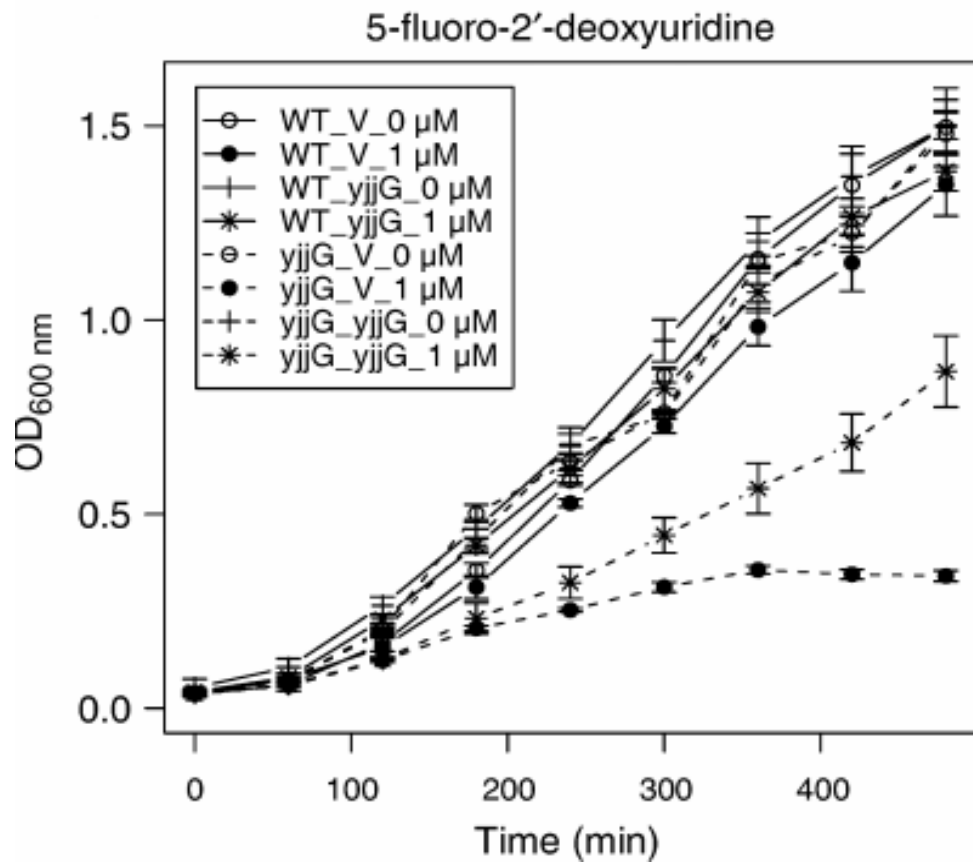


Obr. 6. 10. : Schéma Inkorporace BrdU do DNA

(<http://orion.chemi.muni.cz/>)

Další modifikované nukleobase jsou uvedeny v příloze (viz. kapitola Přílohy: Příloha číslo 3.) (KUZNETSONOVA et. al., 2006; BEAN and TOMASZ 1971; HARTMAN and HEIDELBERGER 1961

Výsledky těchto experimentů jsou znázorněny grafy popisující zvýšenou citlivost mutanta *E. coli* (Δyjg), tzn. sníženou růstovou rychlost v přítomnosti analogů. Větší citlivost byla prokázána u 5-FUdR.



Obr. 6. 11. : Citlivost *E. coli* k 5-FUdR a 5-BrdU (TITZ B. et al 2007)

K testování citlivosti byly zvoleny shodné deriváty 5-fluoro-2'-deoxyuridin (5-FUdR) a 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU). Testy se prováděly na kulturách *S. pneumoniae* Sp1 (WT) a *S. pneumoniae* Sp10 (Δ stkP).

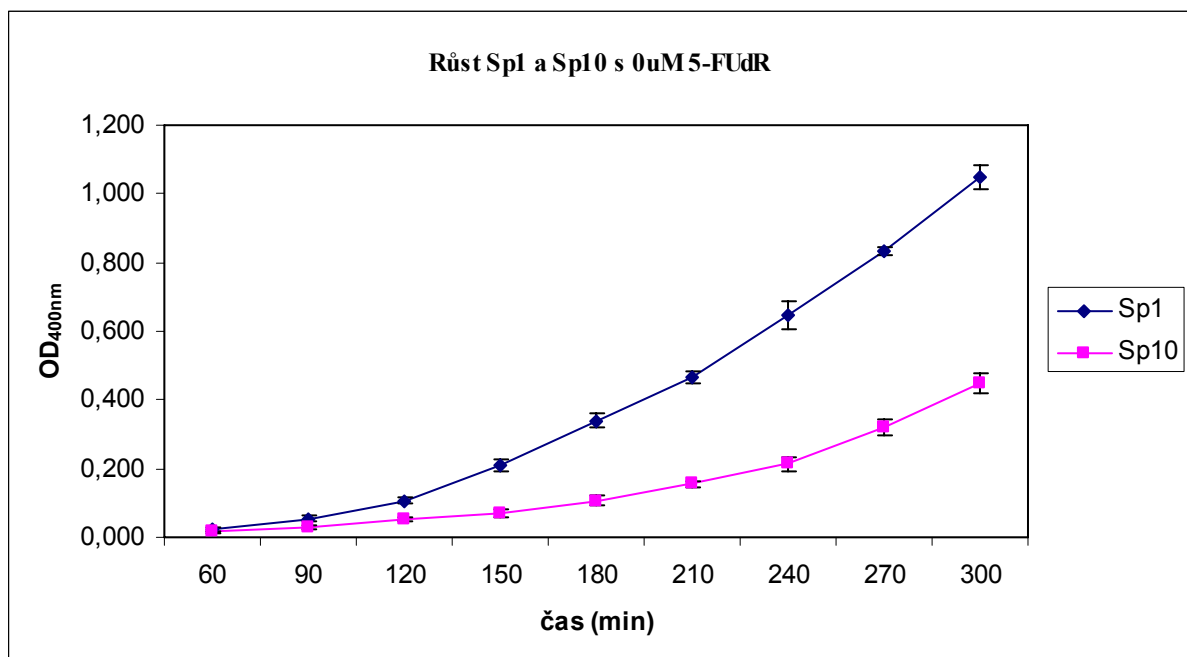
Kultury *S. pneumoniae* Sp1 a Sp10 byly kultivovány staticky v CATc médiu ve vodní lázni při 37°C anaerobně. K jednotlivým kulturám byly v obou případech přidány analogy bází. 5-FUdR v koncentracích 0 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, a 10 μ M a BrdU 0 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M. V časových intervalech byly odebírány vzorky u nichž se měřila optická densita OD_{400nm} a na základě získaných hodnot se sestrojila růstová křivka. Všechna měření byla provedena v triplicátech.

Sp1 (WT)					
čas (min)	0 μ M 5-FUdR	1 μ M 5-FUdR	2 μ M 5-FUdR	5 μ M 5-FUdR	10 μ M 5-FUdR
60	0,023 \pm 0,007	0,019 \pm 0,003	0,029 \pm 0,009	0,033 \pm 0,008	0,021 \pm 0,006
90	0,055 \pm 0,007	0,060 \pm 0,007	0,059 \pm 0,009	0,051 \pm 0,004	0,041 \pm 0,008
120	0,107 \pm 0,007	0,110 \pm 0,004	0,113 \pm 0,007	0,095 \pm 0,003	0,092 \pm 0,011
150	0,210 \pm 0,015	0,204 \pm 0,007	0,202 \pm 0,007	0,182 \pm 0,012	0,177 \pm 0,025
180	0,341 \pm 0,019	0,335 \pm 0,017	0,333 \pm 0,016	0,319 \pm 0,023	0,313 \pm 0,022
210	0,466 \pm 0,019	0,465 \pm 0,015	0,464 \pm 0,010	0,438 \pm 0,031	0,439 \pm 0,027
240	0,647 \pm 0,042	0,639 \pm 0,040	0,644 \pm 0,024	0,601 \pm 0,053	0,616 \pm 0,028
270	0,833 \pm 0,013	0,795 \pm 0,006	0,804 \pm 0,008	0,771 \pm 0,020	0,777 \pm 0,012
300	1,048 \pm 0,037	0,957 \pm 0,032	1,050 \pm 0,043	0,981 \pm 0,033	0,985 \pm 0,052

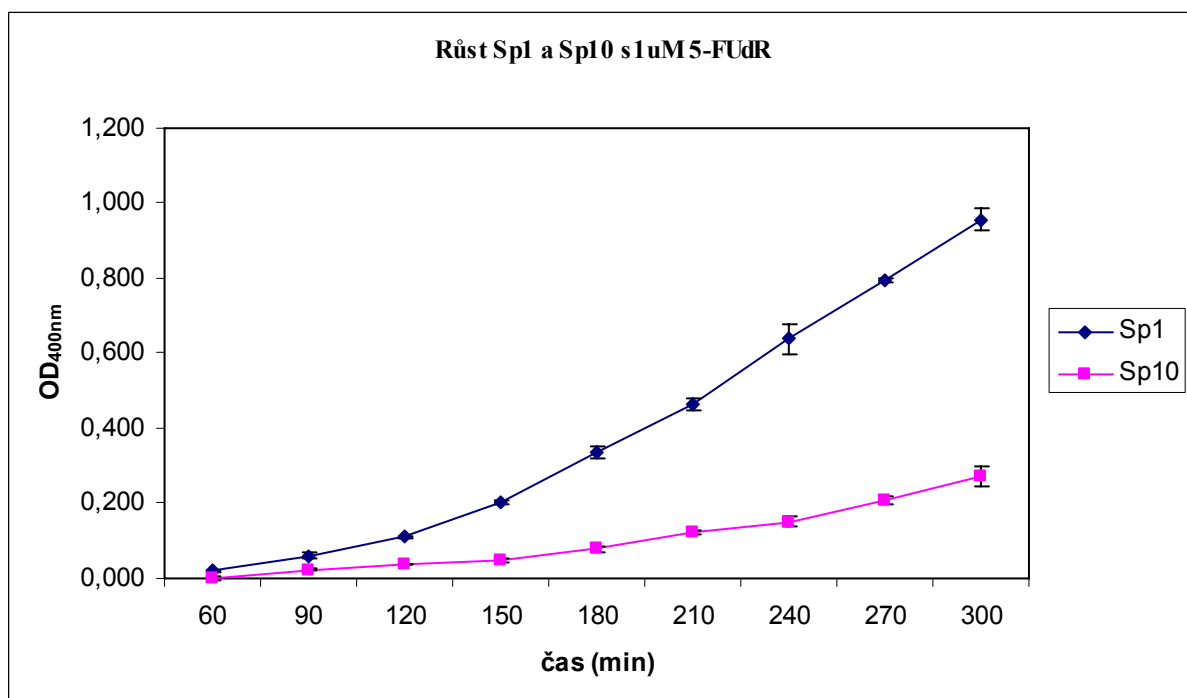
Tab. 6. 1. : Průměrné hodnoty OD_{400nm} pro kmen Sp1 během růstu v přítomnosti 5-FUdR

Sp10 (Δ stkP)					
čas (min)	0 μ M 5-FUdR	1 μ M 5-FUdR	2 μ M 5-FUdR	5 μ M 5-FUdR	10 μ M 5-FUdR
60	0,015 \pm 0,005	0,002 \pm 0,005	0,004 \pm 0,003	0,004 \pm 0,001	0,005 \pm 0,002
90	0,028 \pm 0,004	0,022 \pm 0,003	0,015 \pm 0,003	0,014 \pm 0,004	0,009 \pm 0,004
120	0,055 \pm 0,006	0,037 \pm 0,001	0,029 \pm 0,005	0,029 \pm 0,004	0,027 \pm 0,008
150	0,068 \pm 0,012	0,050 \pm 0,005	0,045 \pm 0,005	0,034 \pm 0,002	0,030 \pm 0,007
180	0,105 \pm 0,014	0,078 \pm 0,007	0,069 \pm 0,005	0,057 \pm 0,003	0,031 \pm 0,009
210	0,155 \pm 0,007	0,123 \pm 0,004	0,111 \pm 0,008	0,087 \pm 0,006	0,044 \pm 0,012
240	0,213 \pm 0,020	0,152 \pm 0,014	0,147 \pm 0,007	0,111 \pm 0,022	0,064 \pm 0,017
270	0,320 \pm 0,025	0,207 \pm 0,011	0,184 \pm 0,021	0,125 \pm 0,008	0,067 \pm 0,011
300	0,451 \pm 0,028	0,271 \pm 0,028	0,245 \pm 0,047	0,163 \pm 0,028	0,073 \pm 0,010

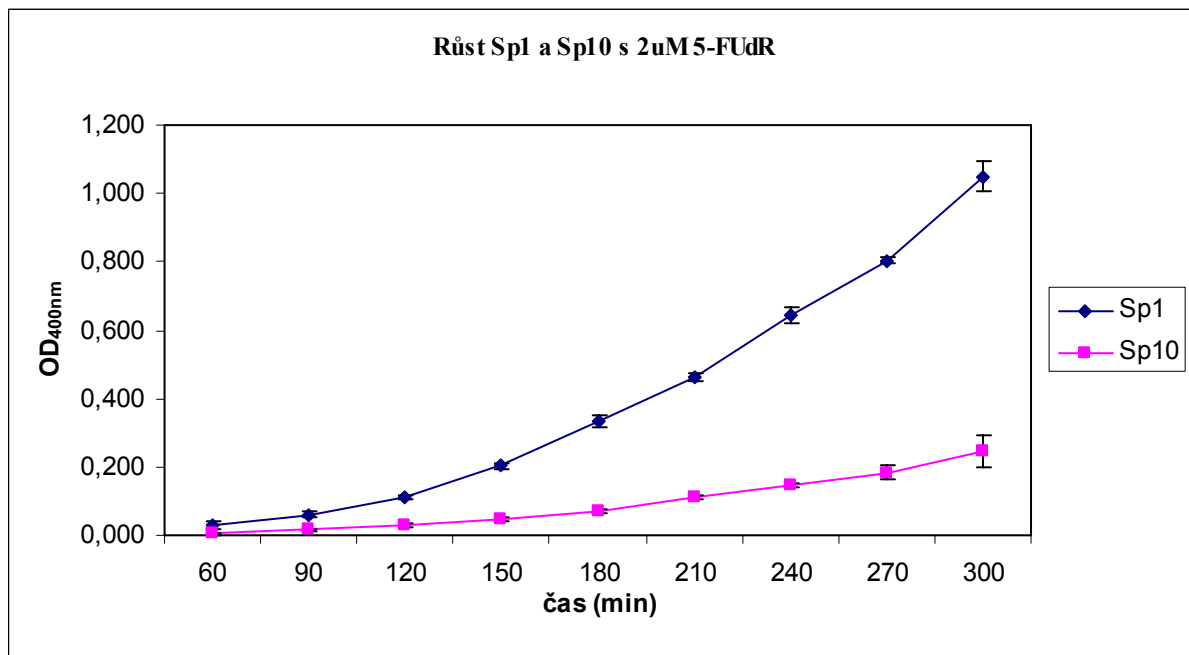
Tab. 6. 2. : Průměrné hodnoty OD_{400nm} pro kmen Sp10 během růstu v přítomnosti 5-FUdR



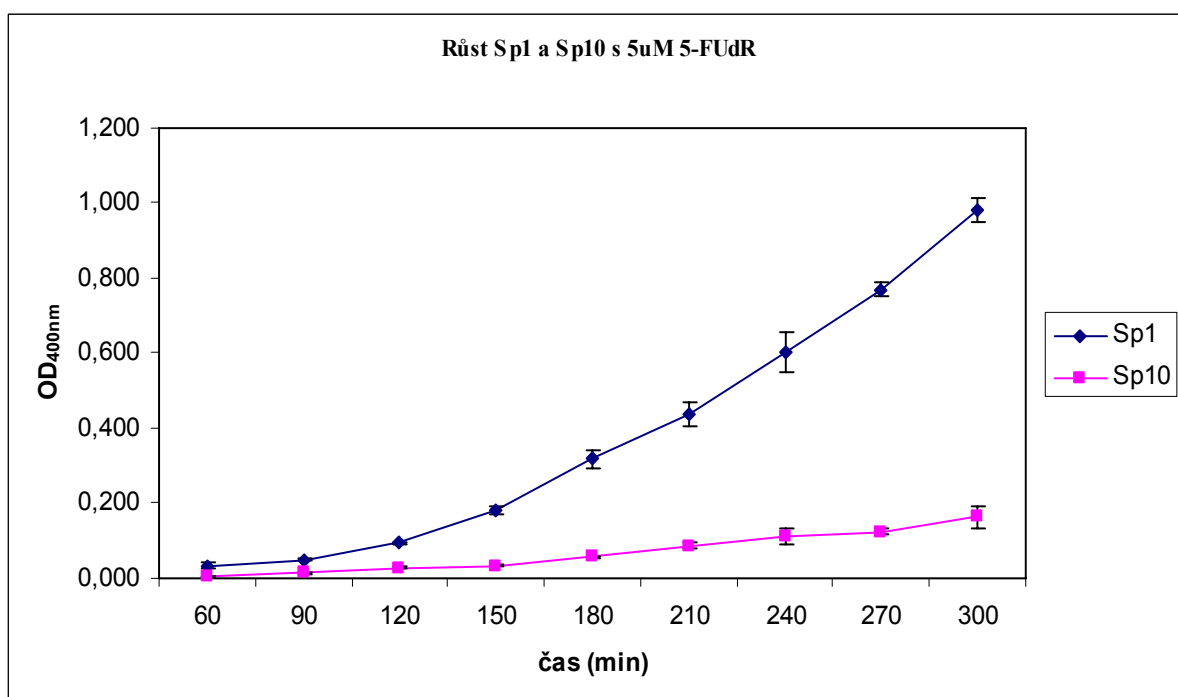
Graf. 6. 1. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 bez přidavku 5-FuDR (negativní kontrola)



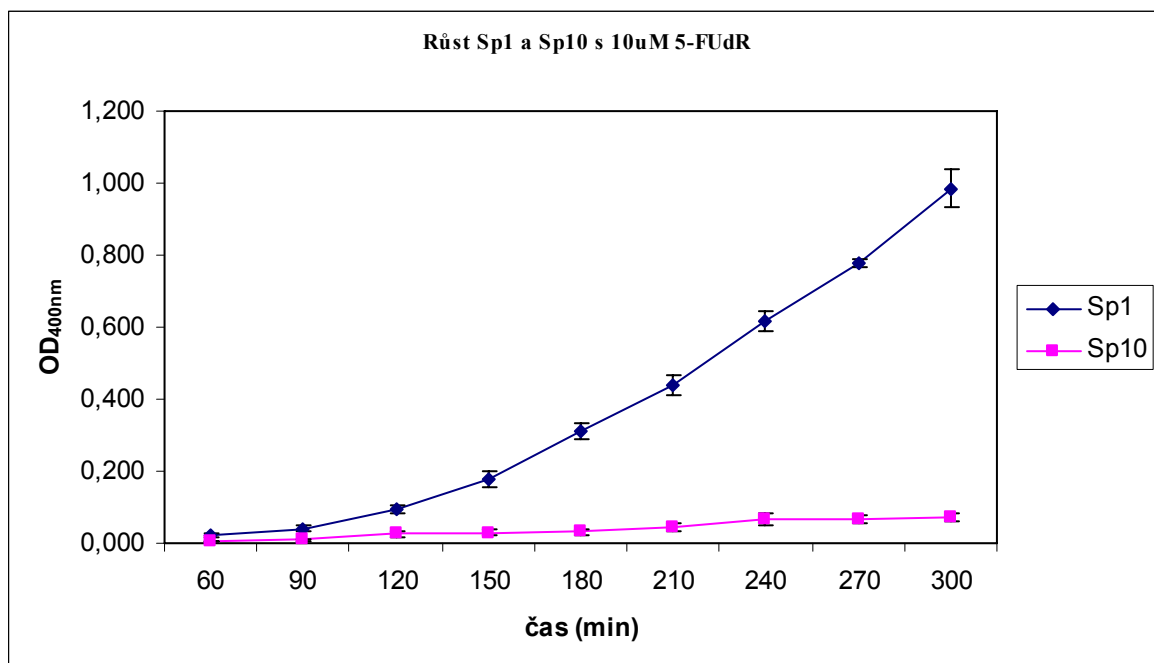
Graf. 6. 2. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 s přidavkem 1 μ M 5-FuDR



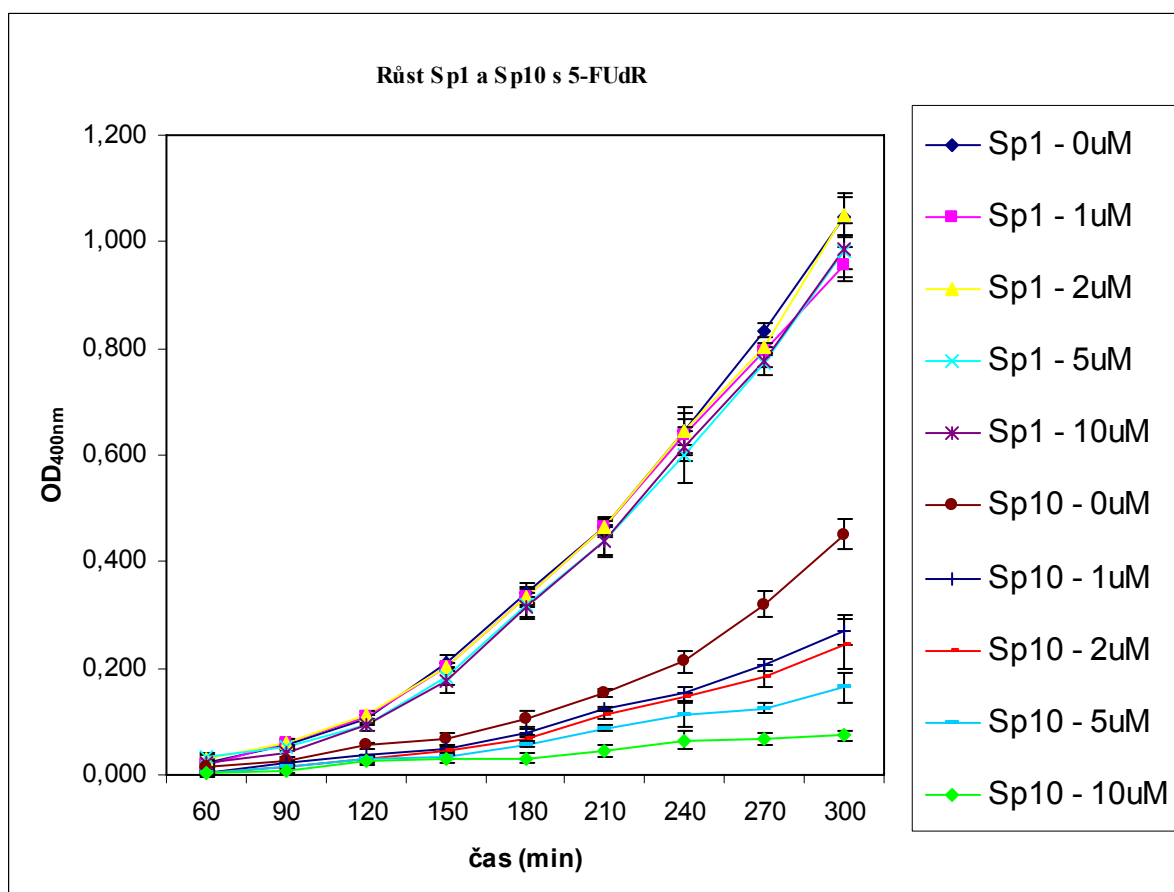
Graf. 6. 3. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 s přidavkem 2 μ M 5-FudR



Graf. 6. 4. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 s přidavkem 5 μ M 5-FudR



Graf. 6. 5. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 s přidavkem 10 μ M 5-FuDR



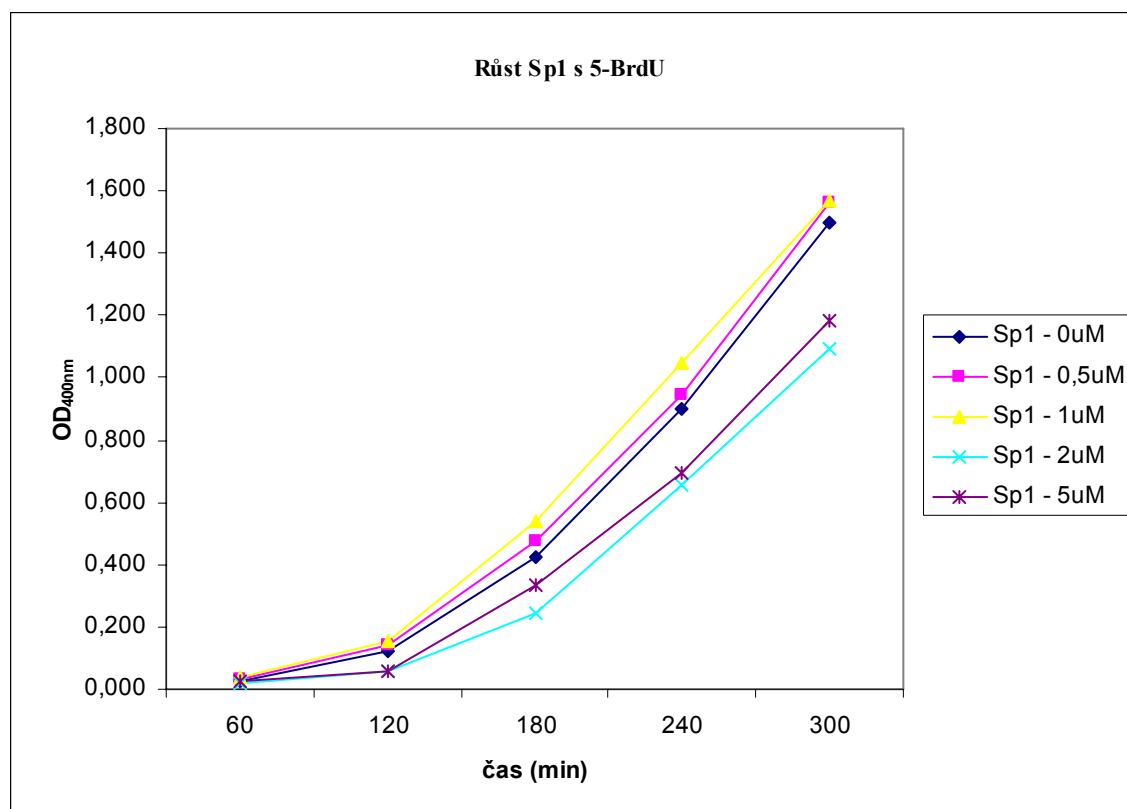
Graf. 6. 6. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 s různými koncentracemi 5-FuDR v kultivačním médiu

Sp1 (WT)					
čas (min)	0 μ M 5-BrdU	0,5 μ M 5-BrdU	1 μ M 5-BrdU	2 μ M 5-BrdU	5 μ M 5-BrdU
60	0,027 \pm 0,001	0,032 \pm 0,005	0,039 \pm 0,004	0,021 \pm 0,000	0,025 \pm 0,001
120	0,124 \pm 0,003	0,140 \pm 0,001	0,153 \pm 0,009	0,061 \pm 0,001	0,059 \pm 0,013
180	0,427 \pm 0,002	0,477 \pm 0,001	0,538 \pm 0,009	0,247 \pm 0,010	0,333 \pm 0,008
240	0,900 \pm 0,004	0,946 \pm 0,004	1,050 \pm 0,010	0,653 \pm 0,016	0,692 \pm 0,011
300	1,500 \pm 0,001	1,564 \pm 0,004	1,570 \pm 0,037	1,090 \pm 0,050	1,186 \pm 0,001

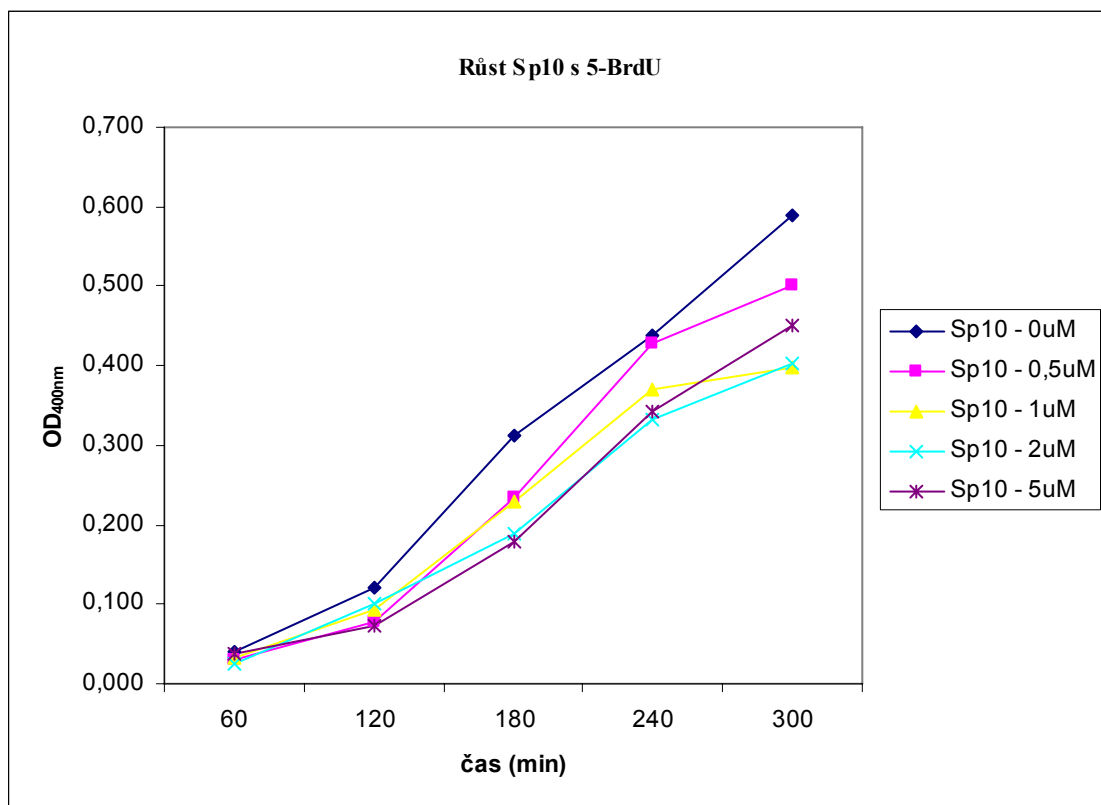
Tab. 6. 3. : Průměrné hodnoty OD_{400nm} pro kmen Sp1 během růstu v přítomnosti 5-BrdU

Sp10 (Δ stkP)					
čas (min)	0 μ M 5-BrdU	0,5 μ M 5-BrdU	1 μ M 5-BrdU	2 μ M 5-BrdU	5 μ M 5-BrdU
60	0,041 \pm 0,000	0,031 \pm 0,005	0,032 \pm 0,002	0,025 \pm 0,005	0,039 \pm 0,001
120	0,120 \pm 0,009	0,077 \pm 0,010	0,092 \pm 0,009	0,100 \pm 0,015	0,074 \pm 0,005
180	0,313 \pm 0,019	0,233 \pm 0,012	0,228 \pm 0,032	0,190 \pm 0,013	0,178 \pm 0,011
240	0,437 \pm 0,017	0,428 \pm 0,005	0,370 \pm 0,010	0,332 \pm 0,014	0,342 \pm 0,016
300	0,589 \pm 0,013	0,500 \pm 0,002	0,399 \pm 0,004	0,404 \pm 0,032	0,450 \pm 0,002

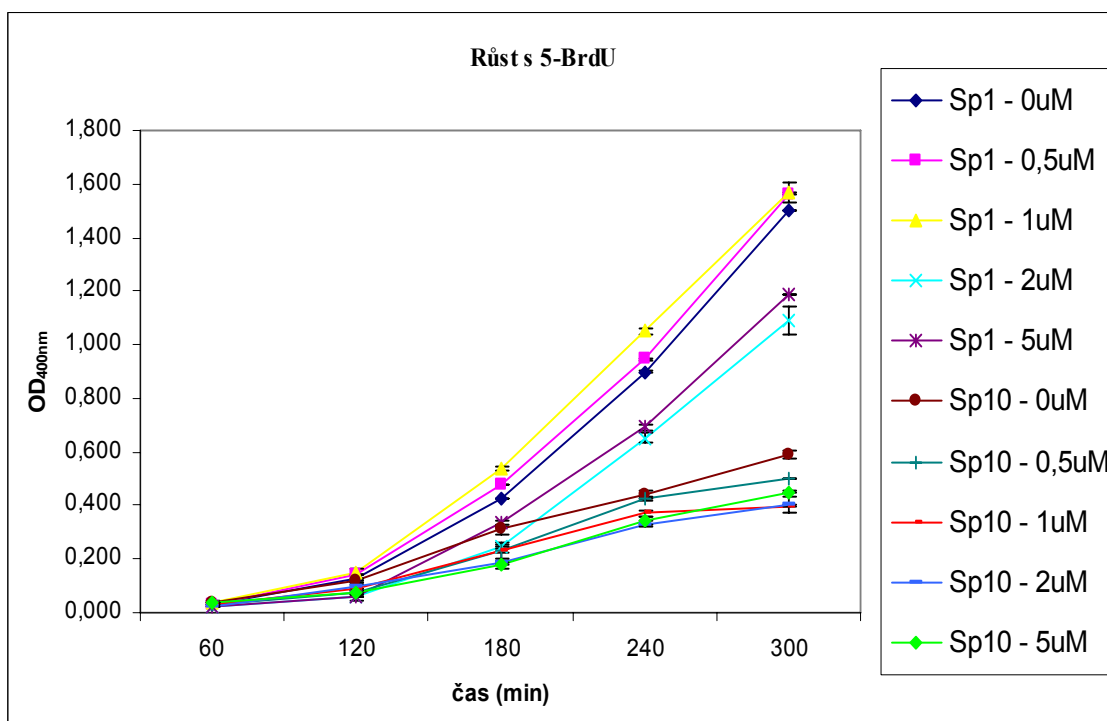
Tab. 6. 4. : Průměrné hodnoty OD_{400nm} pro kmen Sp10 během růstu v přítomnosti 5-BrdU



Graf. 6. 7. : Růstové křivky kultury Sp1 s různou koncentrací 5-BrdU v kultivačním médiu



Graf. 6. 8. : Růstové křivky kultury Sp10 s různou koncentrací 5-BrdU v kultivačním médiu



Graf. 6. 9. : Růstové křivky kmenů Sp1 a Sp10 s různými koncentracemi 5-BrdU v kultivačním médiu

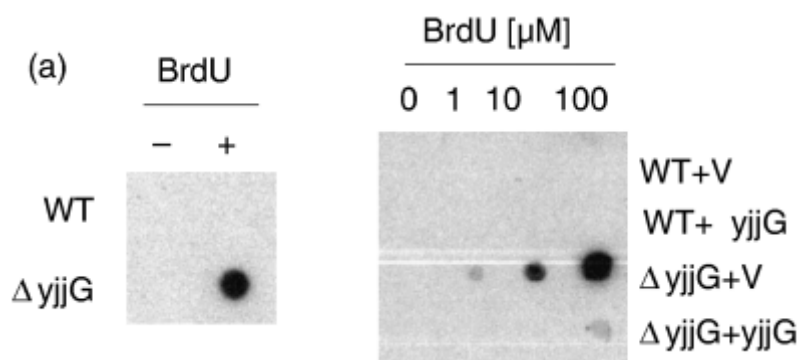
Z výsledků experimentů lze usuzovat, že deficience proteinu Spr1057 má analogicky jako v případě *E. coli* přítomnou souvislost s citlivostí k analogům basí, které mají vliv na metabolismus DNA, RNA a potažmo i translaci. U *S. pneumoniae* Sp10 (Δ stkP), kde je exprese *spr1057* snížena o 59x, se jednoznačně prokázala zvýšená citlivost k 5-FUdR resp. snížená rychlost růstu v přítomnosti tohoto pyrimidinového derivátu oproti *S. pneumoniae* Sp1 (WT). Snížená růstová rychlost je přímo úměrná koncentraci 5-FUdR (čím vyšší koncentrace 5-FUdR, tím větší inhibice růstu). U mutanta se prokázala inhibice růstu již při velmi nízkých koncentracích 5-FUdR, a to 1 μ M, zatímco růst divokého kmene nebyl ovlivněn ani při 10 μ M koncentraci. Zvýšená citlivost tohoto mutanta se prokázala i k potenciálnímu mutagennímu nukleosidu 5-BrdU.

Tyto výsledky podporují hypotézu, že protein Spr1057 *S. pneumoniae* je funkčním homologem proteinu YjjG *E. coli*.

6.3 Inkorporace analogů bází do DNA *S. pneumoniae* in vivo

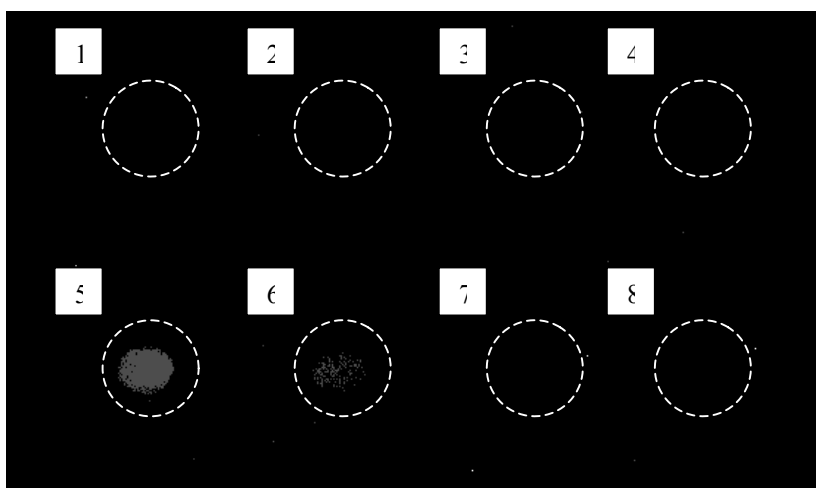
Do bakteriální chromosomální DNA lze cíleně inkorporovat různé nukleové báze nebo jejich analogy (např. 5-BrdU). K inkorporaci dochází během růstu bakterie v mediu obsahujícím příslušnou látku.

Pokusy byly inspirovány a navrhovány podle experimentů provedených u *E. coli* vedoucích ke stanovení funkce YjjG (TITZ B. et al 2007). U mutanta (Δ yjjG) byla jednoznačně prokázána inkorporace 5-BrdU do chromosomální DNA, zatímco u divokého kmene inkorporace nebyla detekována. U koplementačního kmene (Δ yjjG + Δ yjjG) došlo téměř k úplné reverzi fenotypu, tj. minimální inkorporaci 5-BrdU do chromosomální DNA.



Obr. 6. 12. : Inkorporace 5-BrdU do chromosomální DNA *E. coli* (TITZ B. et al 2007)

Kultury *S. pneumoniae* Sp1 (WT) a Sp10 (Δ stkP) byly zaočkovány do 10ml média CATc, k nimž byl přidán 5-BrdU do finálních koncentrací 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M. Kultivace probíhala ve vodní lázni při 37°C staticky anaerobně. Bakteriální kultury byly vypěstovány do OD_{400nm} = 0,5, byly centrifugovány a z peletů byla izolována chromosomální DNA. Byla stanovena koncentrace izolované DNA a byla naředěna tak, aby u všech vzorků byla shodná. Poté byly vzorky naneseny na nylonovou membránu Hybond-N⁺, fixována 2 minuty UV zářením pomocí transiluminátoru a pomocí protilátek provedena imunodetekce inkorporovaného 5-BrdU v chromosomální DNA *S. pneumoniae*. Používala se Anti-Bromdeoxyuridine (ředění: 1:1000) myší monoklonální protilátka jako primární a Anti-Mouse IgG-POD (ředění: 1:10000) jako sekundární protilátku konjugovanou s peroxidasou. Pro detekci signálu byla použita CCD kamera.



Obr. 6. 13. : Inkorporace 5-BrdU do chromosomální DNA *S. pneumoniae* kmenů Sp1 a Sp10 s expozicí chemiluminiscenční frakce CCD kamerou

Na Hybond-N⁺ membránu bylo naneseno 2,5 μ g chromosomální DNA (Místa nanesení vzorků jsou vyznačené kroužky) *S. pneumoniae* kmenů Sp1 (WT) a Sp10 (Δ stkP) izolovaná po kultivaci bakteriálních kultur s přidavkem 5-BrdU do finálních koncentrací 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M.

1. Chromosomální DNA kmene Sp1 pěstovaného v médiu se 100 μ M 5-BrdU
2. Chromosomální DNA kmene Sp1 pěstovaného v médiu s 10 μ M 5-BrdU
3. Chromosomální DNA kmene Sp1 pěstovaného v médiu s 1 μ M 5-BrdU
4. Chromosomální DNA kmene Sp1 pěstovaného v médiu bez přidavku 5-BrdU
5. Chromosomální DNA kmene Sp10 pěstovaného v médiu se 100 μ M 5-BrdU
6. Chromosomální DNA kmene Sp10 pěstovaného v médiu s 10 μ M 5-BrdU
7. Chromosomální DNA kmene Sp10 pěstovaného v médiu s 1 μ M 5-BrdU
8. Chromosomální DNA kmene Sp10 pěstovaného v médiu bez přidavku 5-BrdU

Získané výsledky dokazují inkorporaci 5-BrdU do chromosomální DNA *S. pneumoniae* kmene Sp1 (Δ stkP), zejména při nejvyšší testované koncentraci 5-BrdU (100 μ M). Inkorporace modifikované base do DNA *S. pneumoniae* kmene Sp10 (WT) nebyla detekována.

6.4 Manipulace s genem *spr1057 S. pneumoniae*

6.4.1 Amplifikace genu *spr1057 L a S*

K amplifikaci genu *spr1057 L a S* byly navrženy oligonukleotidy obsahující restriční místa NdeI, SmaI. Po amplifikaci (viz. kapitola Materiál a Metodika: 5.2.2.3 PCR) byly reakční směsi purifikovány soupravou PCR purification Spin Kit (GENOMED). Výsledek reakce byl vizualizován jednorozměrnou agarosovou elektroforesou. Z gelu byl fragment DNA extrahován pomocí soupravy QIAquick[®] Gel Extraction Kitem (QIAGEN).

oligonukleotidy:

HADEX-f 5'- gcgccatattgttctacaaatttctactc - 3'

HADEX-r 5'- gcgcccgggaaatgtgatctttcaagaagaat - 3'

pro klonování do pTYB2

HADEXf-1infusion 5'- aaggagatatacatatgatgttctacaaatttctactc - 3'

HADEXf-2infusion-short 5'- aaggagatatacatatgatgaacaaggctctctggaaa - 3

HADEXr-1infusion 5'- cttggcaaagcacccgggaaatgtgatctttcaagaat - 3'

pro in-fusion klonování do pTYB2

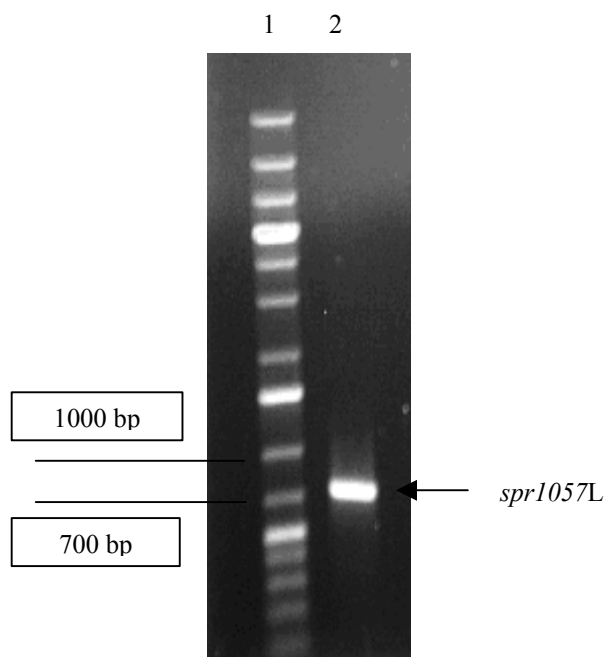
HADEX2L-f 5'- gcgccatggctttgttctacaaatttctactc - 3'

HADEX2S-f 5'- gcgccatggctaacaaggctctctggaaagac - 3'

HADEX2-r 5'- gcgctcgagaaatgtgatctttcaagaat - 3'

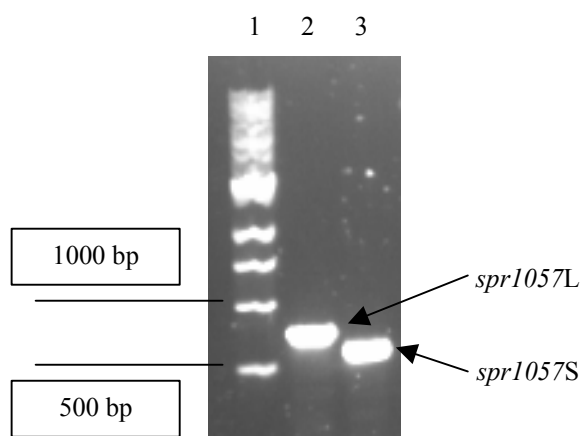
pro in-fusion klonování do pET28b

Vzhledem ke vzniklým problémům s klonováním genu, byly zkoušeny dva druhy vektorů (pTYB2, pET28b) a dvě techniky klonování (běžná ligační reakce, in-fusion reakce) (viz. kapitola Materiál a Metodika: 5.2.2.6 Ligace molekul DNA).



Obr. 6. 14. : Elektroforetogram: PCR amplifikace *spr1057L* pomocí oligonukleotidů HADEX-f, HADEX-r

1. DNA standard (1 kb plus DNA, FERMENTAS)
2. Amplifikace genu *spr1057L* pomocí oligonukleotidů HADEX-f, HADEX-r; očekávaný fragment: 714 bp



Obr. 6. 15. : Elektroforetogram: PCR amplifikace *spr1057 L a S* pomocí oligonukleotidů HADEXf-1infusion, HADEXf-2infusion-short, HADEXr-1infusion

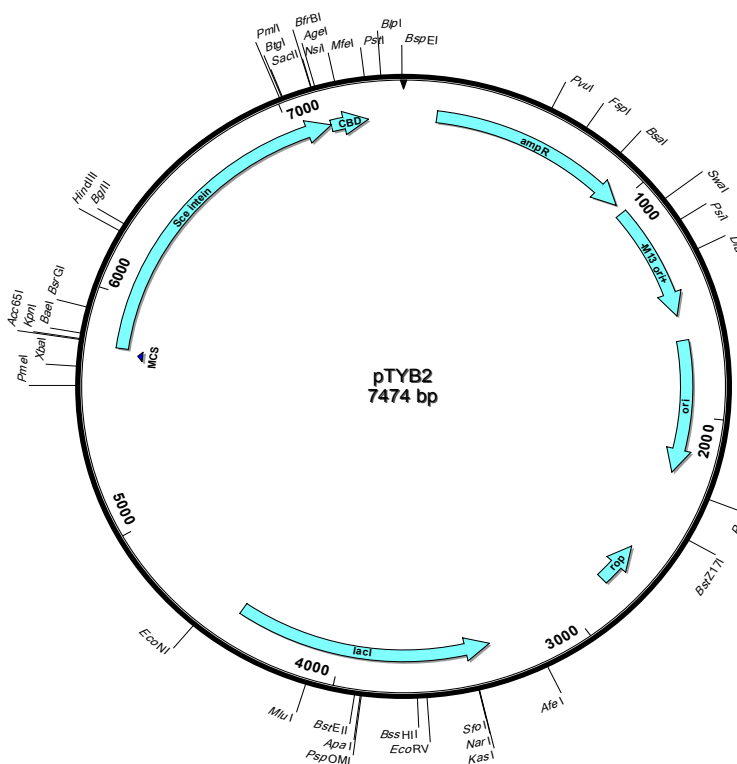
1. DNA standard (1 kb DNA, BIOLABS)
2. Amplifikace *spr1057L* pomocí oligonukleotidů HADEXf-1infusion a HADEXr-1infusion; očekávaný fragment: 744 bp
3. Amplifikace *spr1057S* pomocí oligonukleotidů HADEXf-2infusion-short a HADEXr-1infusion; očekávaný fragment: 600 bp

6.4.2 Klonování genu *spr1057 L* do vektoru

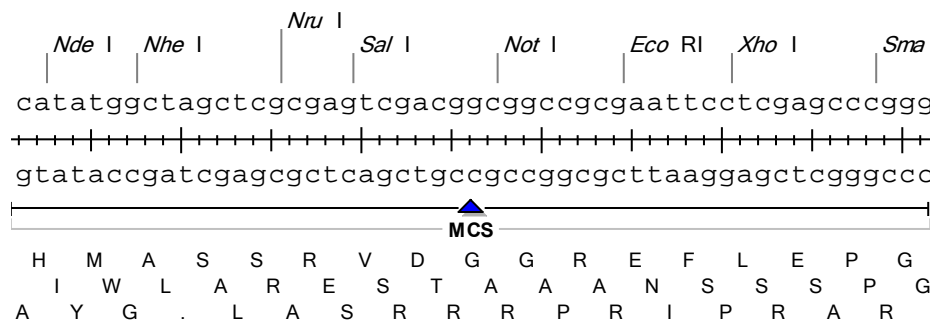
Jako expresní vektor byl zvolen plasmid pTYB2 a jako druhá alternativa plasmid pET28b.

Plasmid pTYB2 (BIOLABS) se užívá jako a expresní vektor. Jeho velikost je 7474 bp a jako selekční znak nese ampicilinovou rezistenci. Rekombinantní proteiny exprimované z tohoto vektoru mají na svém C-terminálním konci fúzi s inteinem o velikosti 55 KDa jež je afinní svou chitin vázající doménou k nosiči s navázaným chitinem, čehož se využívá při izolaci proteinu. Vektor pTYB2 jsme pomocí restrikčních endonukleas NdeI a SmaI rozštěpili. Tyto dvě restrikční místa leží na okrajích polyklonovacího místa tohoto vektoru. Po restrikci se pomocí soupravy MinElute™ Reaction Cleanup Kitem (QIAGEN) odstranily přebytečné sole a enzymy.

Stejnými restrikčními nukleasami (NdeI, SmaI) byl štěpen fragment PCR získaný pomocí oligonukleotidů HADEX-f a HADEX-r a z reakční směsi byly odstraněny enzymy a sole.

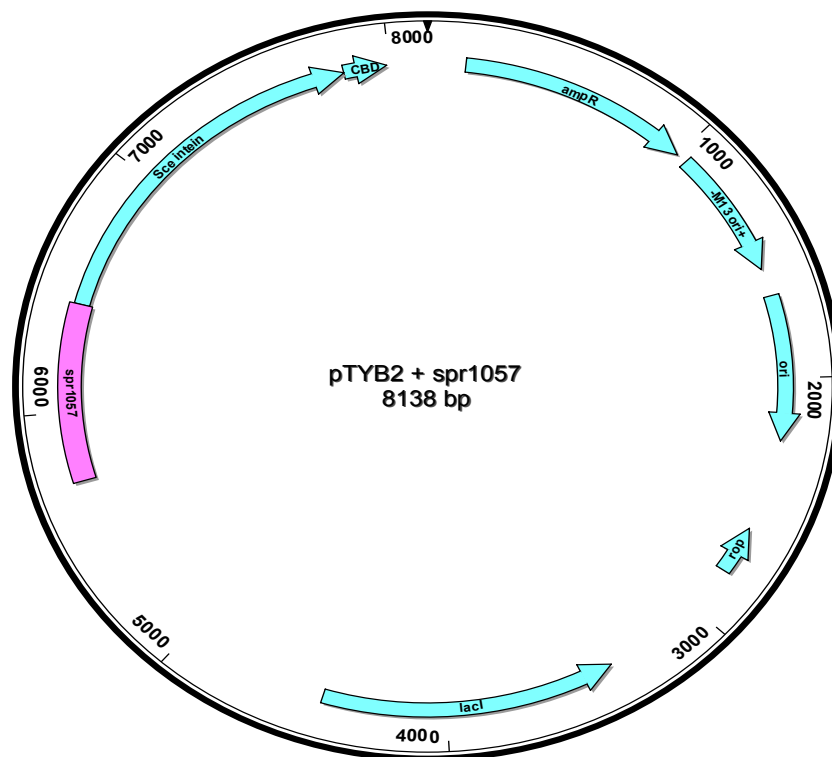


Obr. 6. 16. : Plasmid pTYB2



Obr. 6. 17. : MCS (Multiple cloning sites) - polyklonovací místo vektoru pTYB2

Restrikcí linearizovaný vektor pTYB2 byl posléze ligován pomocí enzymu T4 DNA ligasy se získaným fragmentem *spr1057L*. Také byl používán systém in-fusion ligace.



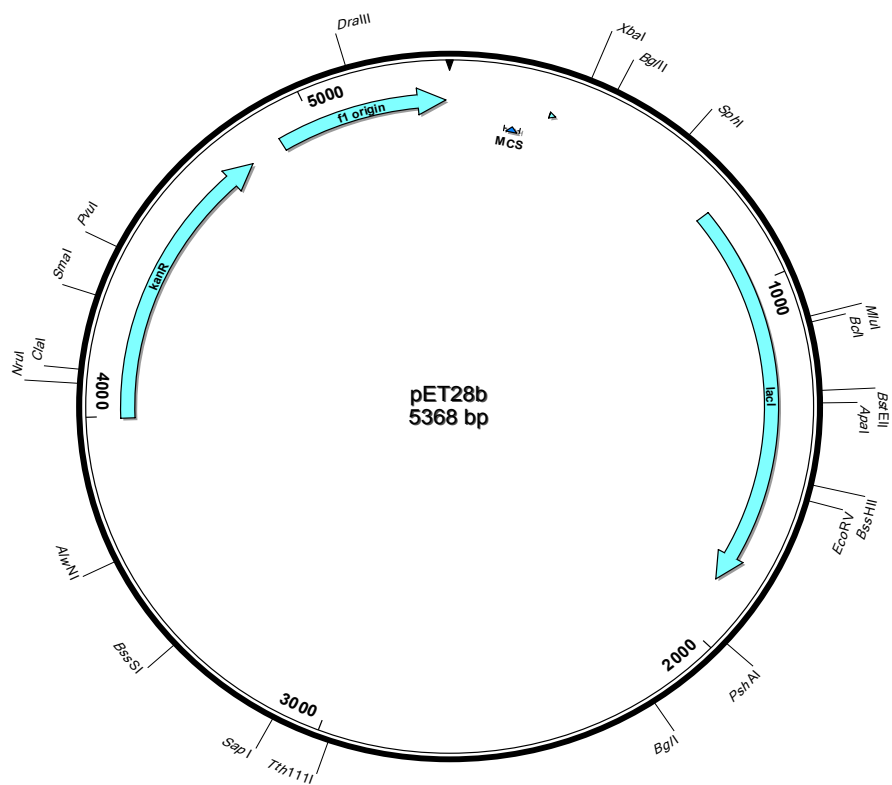
Obr. 6. 18. : Rekombinantní plasmid pTYB2*spr1057L*

Ligační směs byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* JM109 a transformanty jsme selektovali pomocí ampicilinové rezistence plasmidu. Z narostlých transformantů byla izolována plasmidová DNA alkalickou lyzí (viz. kapitola Materiál a Metodika: 5.2.2.1 Izolace plasmidové DNA *E. coli* metodou alkalické lyze). Pomocí restrikčních reakcí a PCR byla testována správnost konstruktů (viz. kapitola Materiál a Metodika: 5.2.2.3 PCR - Rozpis amplifikačních reakcí: Ověřovací klonování *spr1057L*).

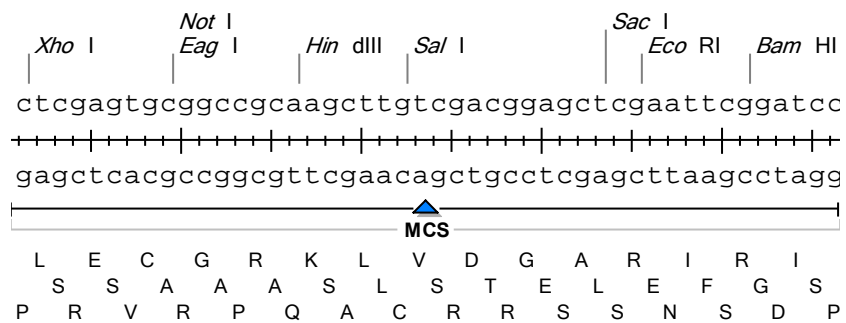
Výše uvedeným postupem se nepodařilo připravit požadované rekombinantní plasmidy.

Jako alternativní expresní vektor jsme použili pET28b (NOVAGEN). Velikost plasmidu je 5368 bp a jako selekční znak nese kanamycinovou rezistenci. Při vhodném použití restrikčních mají exprimované proteiny na svém C-terminálním konci histidinovou kotvu. Vektor pET28b jsme pomocí restrikčních endonukleas NcoI a XhoI rozštěpili. Tyto dvě restrikční místa leží na okrajích polyklonovacího místa tohoto vektoru. Po restrikci se pomocí soupravy MinEluteTM Reaction Cleanup Kitem (QIAQEN) odstranily přebytečné sole a enzymy. Spojení vektoru s fragmentem *spr1057L* bylo prováděno pomocí in-fusin ligace. Následně byl produkt ligace transformován do kompetentních buněk *E. coli* JM109 a transformanty byly selektovány pomocí kanamycinové rezistence plasmidu. Z narostlých kultur byla izolována plasmidová DNA metodou alkalické lyze a pomocí restrikčních reakcí a PCR byla testována správnost konstruktů.

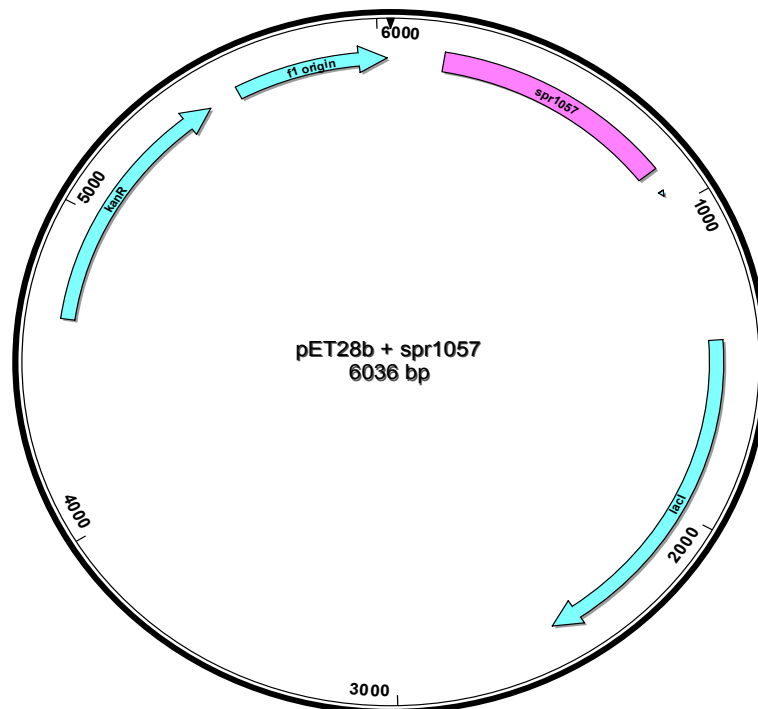
Ani tímto modifikovaným postupem se nepodařilo připravit požadované rekombinantní plasmidy.



Obr. 6. 19. : Plasmid pET28b

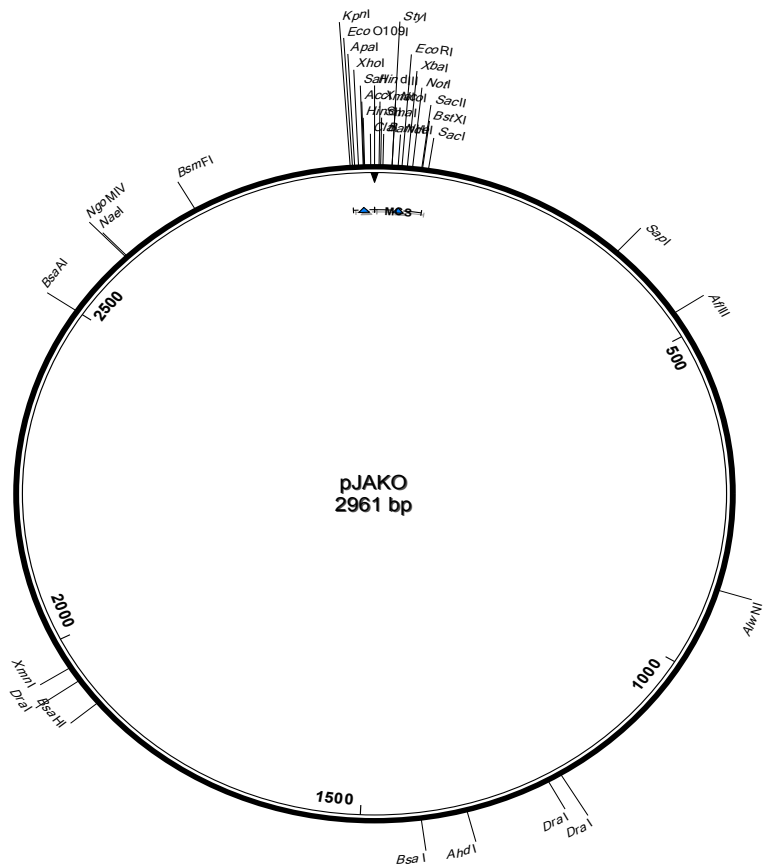


Obr. 6. 20. : MCS (Multiple cloning sites) - polyklonovací místo vektoru pET28b

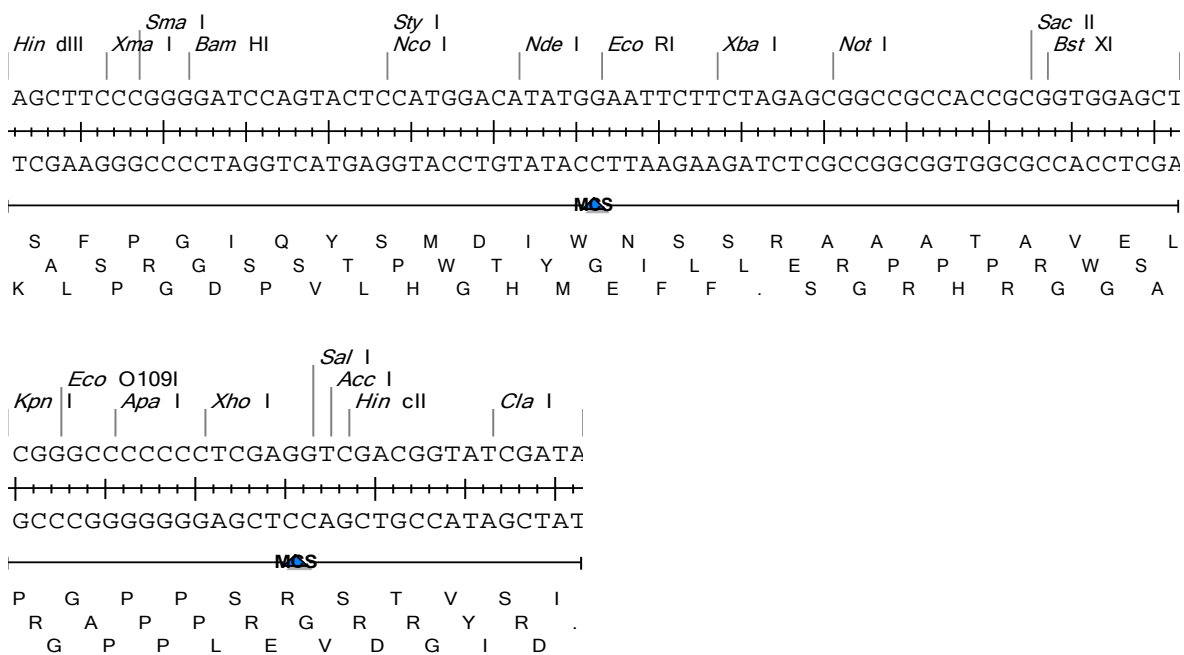


Obr. 6. 21. : Rekombinantní plasmid pET28bspr105L

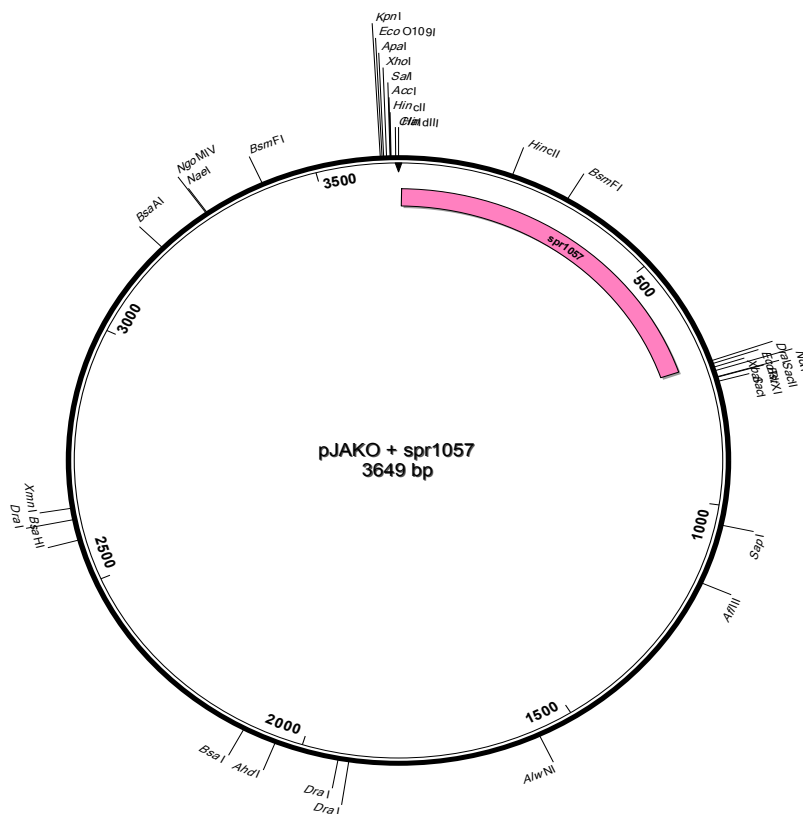
Postup klonování genu *spr1057* jsme v dalších pokusech modifikovali subklonováním fragmentu PCR do alternativního vektoru. Amplifikovaný gen *spr1057L* jsme nejprve klonovali pomocí restrikčních enzymů XmaI a NdeI do vektoru pJAKO1, což je modifikovaný plasmid na bázi pBluescriptuII obsahující rozšířené polyklonovací místo místo vzniklé ligací punkeru obsahujícího mimo jiné restrikční místa NcoI a NdeI.



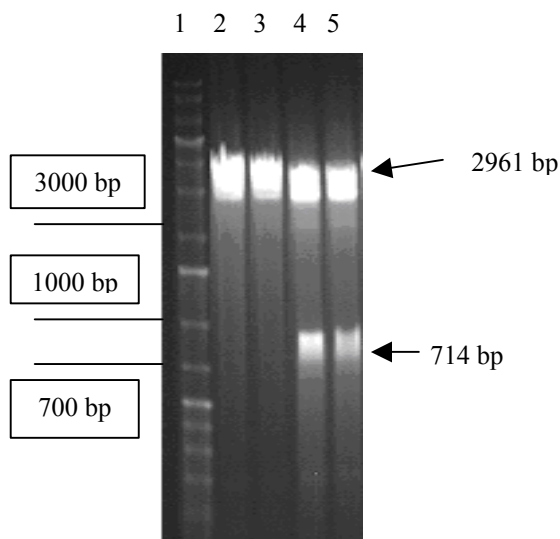
Obr. 6. 22. : Plasmid pJAKO1



Obr. 6. 23. : MCS (Multiple cloning sites) - polyklonovací místa vektoru pJAKO1

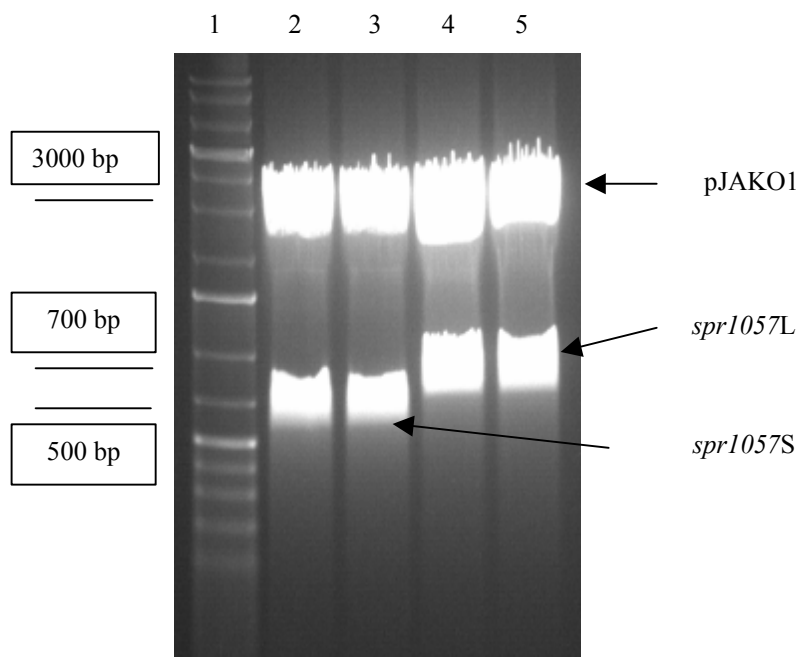


Obr. 6. 24. : Rekombinantní plasmid pJAKO1spr1057L



Obr. 6. 25. : Elektroforetogram: plasmid pJAKO a rekombinantní plasmid pJAKO1spr1057L štěpene XmaI a NdeI

1. DNA standard (1 kb plus DNA, FERMENTAS)
2. , 3. Plasmid pJAKO1 štěpený NdeI, XmaI (negativní kontrola); očekávaný fragment: 2961 bp (pJAKO)
- 4., 5. Rekombinantní plasmid pJAKO1spr1057L štěpený NdeI, XmaI; očekávaný fragment: 714 pb (*spr1057L*) a 2961 bp (pJAKO1)



Obr. 6. 26. : Elektroforetogram: rekombinantní plasmidy pJAKO1spr105S a pJAKO1spr1057L štěpené XmaI a NdeI

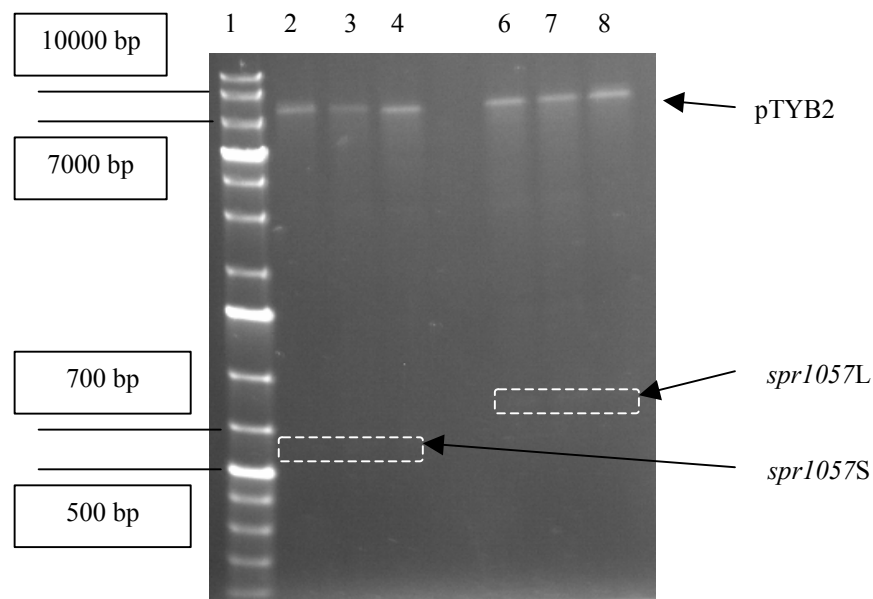
1. DNA standard (1 kp DNA plus, FERMENTAS)

2., 3. Rekombinantní plasmid pJAKO1spr1057S štípaný XmaI, NdeI; očekávaný fragment: 576 bp (*spr1057S*) a 2961 bp (pJAKO1)

4., 5. Rekombinantní plasmid pJAKO1spr1057L štípaný XmaI, NdeI; očekávaný fragment: 714 bp (*spr1057L*) a 2961 bp (pJAKO1)

Po úspěšném klonování genu *spr1057L* do vektoru pJAKO1 byl tento fragment opětovně vyštěpen restrikními enzymy XmaI, NdeI a za použití stejných restriktáz klonován do vektoru pTYB2.

Tímto postupem se nám podařilo připravit požadované rekombinantní plasmidy, které jsme si pojmenovali: pJAKO1spr1057L a pJAKO1spr1057S.



Obr. 6. 27. : Elektroforetogram: rekombinantní plasmidy pTYB2spr1057S a pTYB2spr1057L štěpeny XmaI a NdeI

1. DNA standard (1 kp DNA plus, FERMENTAS)

2., 3., 4. rekombinantní plasmidy pTYB2spr1057S štěpeny XmaI, NdeI; očekávaný fragment: 576 bp (*spr1057S*) a 7474 bp (pTYB2)

6., 7., 8. rekombinantní plasmidy pTYB2spr1057L štěpeny XmaI, NdeI; očekávaný fragment: 714 bp (*spr1057L*) a 7474 bp (pTYB2)

(V rámečku jsou znázorněny vyštěpené fragmenty *spr1057 S* a *L* , hůře viditelné)

6.4.3 Transformace expresního plasmidu do buněk *E. coli* BL21

Do kompetentních buněk *E. coli* BL21 jsme transformovali připravené rekombinantní plasmidy pTYB2spr1057S a pTYB2spr1057L teplotním šokem. Z narostlých transformantů na selekční půdě (s ampicilinem) byly připraveny kultury a vyrobeny konzervy s glycerolem pro pozdější použití.

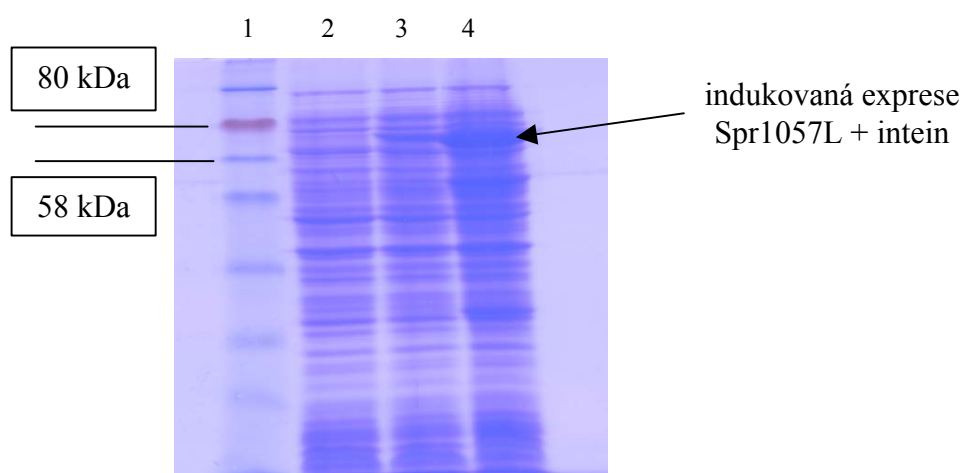
6.5 Manipulace s proteinem Spr1057 L a S *S. pneumoniae*

6.5.1 Exprese proteinu Spr1057 L a S

Expresa obou forem rekombinantního proteinu Spr1057 L a S z plasmidu pTYB2 byla indukovaná pomocí IPTG při 15°C a probíhala 16 hodin (viz. kapitola: Materiál a Metodika: 5.2.3.1 Indukce proteinové exprese v *E. coli* pomocí IPTG). Expresa za nízké

teploty byla aplikována s cílem získat co nejvíce proteinu v rozpustné frakci, která je snáze použitelná pro další použití. Pro zhodnocení exprese studovaného proteinu jsme odebírali alikvóty indukované kultury pro následné vyhodnocení SDS-PAGE elektroforesou. Vzorky byly odebírány v následujících časových bodech kultivace: z rostoucí kultury 3 hodiny před indukcí exprese, 3 hodiny po indukcí a 16 hodin po indukcí. Bakteriální kultury byly centrifugovány a mechanicky desintegrovány, následně byly proteiny rozděleny centrifugací na rozpustnou a nerozpustnou frakci (viz. kapitola Materiál a Metodika: 5.2.3.2 Frakcionace proteinů). Po přidání inhibitorů proteas lze vzorky skladovat ve 4°C.

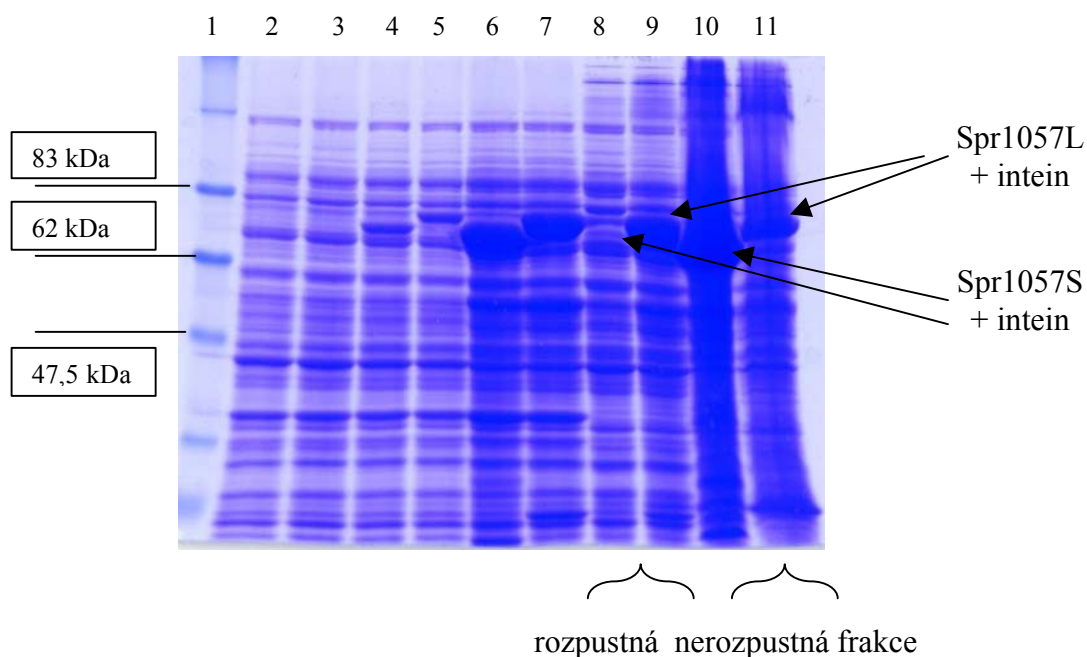
Expese proteinu Spr1057 byla následně sledována vertikální SDS-PAGE elektroforesou. Po elektroforese byly proteiny barveny Coomassie Blue.



Obr. 6. 28. : Proteinový elektroforetogram: Závislost exprese fúzního proteinu Spr1057L s inteinem pomocí IPTG na době indukce

Na SDS-PAGE (obarveno Coomassie blue R-250) bylo naneseno 30µg celkových proteinů Spr1057L s inteinem. Vzorky byly odebírány v časových intervalech: 3 hodiny před indukcí, 3 hodiny po indukcí, 16 hodin po indukcí.

1. Proteinový standard (ColorPlus Prestained Protein Marker, BIOLABS)
2. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 3 hodiny před indukcí proteinové exprese; očekávaný výsledek: žádná indukce exprese fúzního proteinu
3. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 3 hodiny po indukcí proteinové exprese; očekávaný výsledek: zvýšená exprese fúzního proteinu
4. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 16 hodin po indukcí proteinové exprese; očekávaný výsledek: vysoká exprese fúzního proteinu

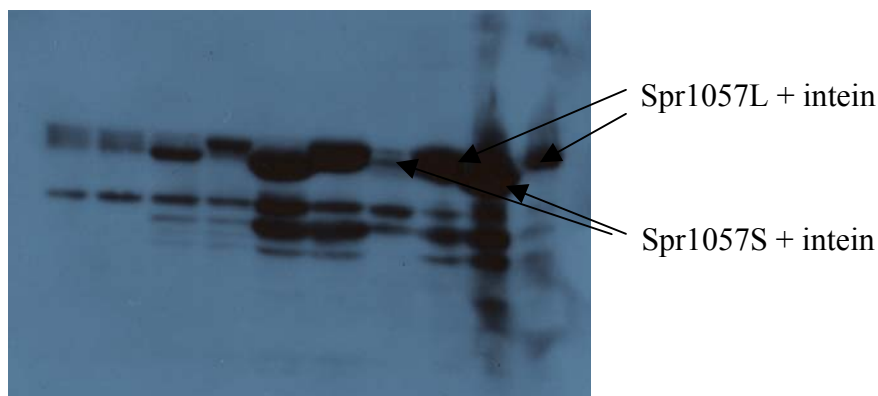


Obr. 6. 29. : Proteinový elektroforetogram: exprese proteinu Spr1057 S a L s inteinem pomocí IPTG

Na SDS-PAGE (obarveno Coomassie blue R-250) bylo naneseno 30 μ g celkových nebo frakcionovaných proteinů Spr1057 S a L s inteinem. Velikost fúzního proteinu Spr1057L s inteinem je 76 kDa (21 kDa Spr1057L + 55 kDa intein), fúzní protein Spr1057S s inteinem je menší. Vzorky byly odebrány v časových intervalech: 3 hodiny před indukci, 3 hodiny po indukci, 16 hodin po indukci. Po expresi byly bakteriální buňky desintegrovány a proteiny rozděleny na jednotlivé frakce: rozpustnou a nerozpustnou.

1. Proteinový standard (Prestained Protein Marker, BIOLABS)
2. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 3 hodiny před indukci proteinové exprese Spr1057S; očekávaný výsledek: žádná indukce exprese fúzního proteinu
3. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 3 hodiny před indukci proteinové exprese Spr1057L; očekávaný výsledek: žádná exprese fúzního proteinu
4. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 3 hodiny po indukci proteinové exprese Spr1057S; očekávaný výsledek: zvýšená exprese fúzního proteinu
5. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 3 hodiny po indukci proteinové exprese Spr1057L; očekávaný výsledek: zvýšená indukce exprese fúzního proteinu
6. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 16 hodin po indukci proteinové exprese Spr1057S; očekávaný výsledek: vysoká exprese fúzního proteinu
7. Proteinový vzorek odebraný z bakteriální kultury 16 hodin po indukci proteinové exprese Spr1057L; očekávaný výsledek: vysoká exprese fúzního proteinu
8. Rozpustná proteinová frakce obsahující Spr1057S
9. Rozpustná proteinová frakce obsahující Spr1057L
10. Nerozpustná proteinová frakce obsahující Spr1057S
11. Nerozpustná proteinová frakce obsahující Spr1057L

Pomocí Westernova přenosu byly proteiny separované SDS-PAGE elektroforeou přeneseny na PVDF membránu a imunodetekovány pomocí protilátky. Použita byla primární monoklonální protilátka Anti-CBD (anti-chitin binding domain serum) (ředění: 1 : 10000) a sekundární protilátka Anti-Rabbit IgG-POD - sekundární protilátka konjugovaná s peroxidasou (ředění: 1 : 10000).



Obr. 6. 30. : Imunodetekce na proteinovém elektroforetogramu: exprese proteinu Spr1057 S a L s inteinem

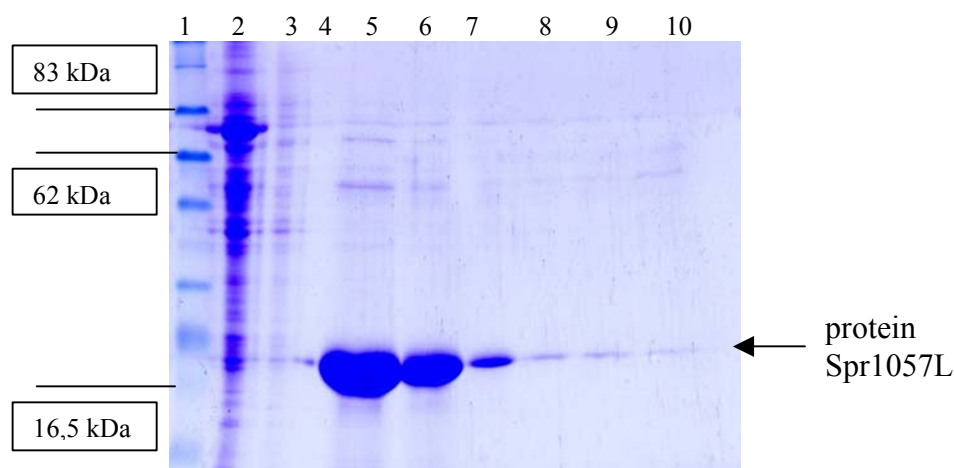
Proteiny byly Westernovým přenosem přeneseny na PVDF membránu a imunodetekovány pomocí primární protilátky Anti-CBD a sekundární protilátky Anti-Rabbit IgG-POD. Po dvouminutové expozici byl výsledek chemiluminiscenční reakce exponován na fotografický film. Vzorok jsou shodné s výše uvedeným proteinovým gelem (viz. kapitola Výsledky: Obr. 6. 29. : Proteinový elektroforetogram: exprese proteinu Spr1057 S a L s inteinem pomocí IPTG).

U obou proteinů Spr1057L i Spr1057S se zdařila indukce a exprese, což je vidět na proteinových gelech i na PVDF membráně po imunodetekci. Velikostně proteiny odpovídají tomu, že jsou fúzovány s inteinem. Spr1057L je v rozpustné i nerozpustné frakci, přičemž v rozpustné frakci se nachází větší množství. Spr1057S je v rozpustné frakci pouze v zanedbatelném množství, většina proteinu je v nerozpustné frakci. Z tohoto důvodu byly další experimenty prováděny s rozpustnou variantou proteinu Spr1057L.

6.5.2 Izolace a purifikace proteinu Spr1057L

Pro izolaci rekombinantního proteinu fúzovaného s inteinem jsme používali metodu imobilizované afinitní chromatografie pomocí komerční soupravy IMPACTTM-CN (BIOLABS). Ke štěpení byl použit Cleavage pufr s 50mM DTT (viz. Materiál a Metodika: 5.1.1.2 Roztoky a pufr). Vzorek proteinu byl inkubován při 4°C 16 hodin a následně

eluován elučním pufrem (viz. Materiál a Metodika: 5.1.1.2 Roztoky a pufry). Vzorky z jednotlivých eluátů byly naneseny na SDS-PAGE elektroforesu a obarveny Commasie Blue pro zhodnocení čistoty a množství vzorku.



Obr. 6. 31. : Proteinový elektroforetogram: izolace a purifikace Spr1057

Protein Spr1057L byl izolován a purifikován z rozpustné proteinové frakce. Izolace byla provedena imobilizovanou afinní chromatografi za použití nosiče s chitinem. Odštěpení inteinu bylo realizováno 50mM DTT obsaženým v Cleavage pufre. Vzorek proteinu byl pětkrát eluován elučním pufrem.

1. Proteinový standard (Prestained Protein Marker, BIOLABS)
2. Rozpustná proteinová frakce obsahující fúzní protein Spr1057L s inteinem; očekávaná velikost proteinu je 21 kDa
- 3., 4. Promývání nosiče
- 5., 6., 7., 8., 9. Eluáty proteinu Spr1057L po odštěpení inteinu
10. Promytí rezidua na koloně

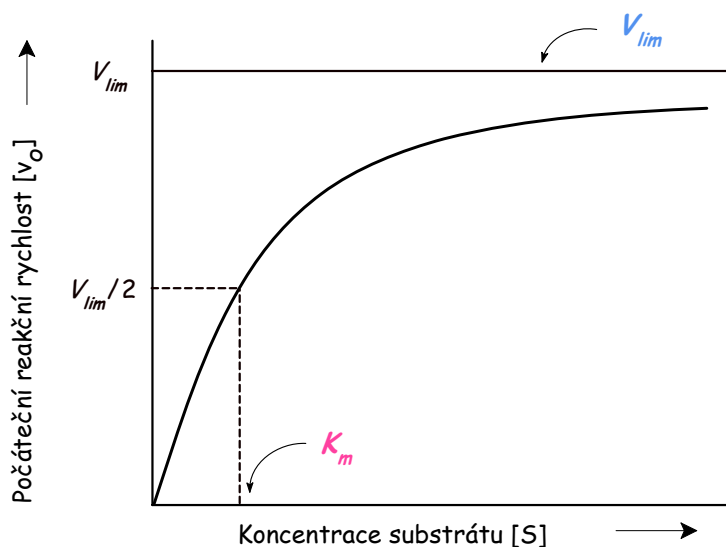
Odštěpení proteinu Spr1057 od inteinu pomocí DTT bylo úspěšné a s vysokým výtěžkem proteinu 4,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Z jedné izolace bylo celkem získáno 12 mg proteinu.

6.6 Testování aktivity proteinu Spr1057L *S. pneumoniae*

Obecně je enzymová aktivita ovlivňována mnoha faktory:

- 1) koncentrace substrátu (K_m , V_{max}) - vliv až do nasycení enzymu
- 2) teplota - urychlení reakce, nebezpečí tepelné denaturace
- 3) pH - aktivita enzymů v úzkém rozmezí = pH optimum
- 4) iontová síla - ionty kovů ovlivňují aktivitu enzymu
- 5) aktivátory a inhibitory enzymů

Z hlediska enzymatické kinetiky je velmi důležitá závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu jenž znázorňuje hyperbola.



Graf. 6. 10. : Závislost počáteční rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu

$V_{lim(max)}$ = maximální rychlost reakce

- Jedná se o maximální (limitní možnou rychlost enzymatické reakce).

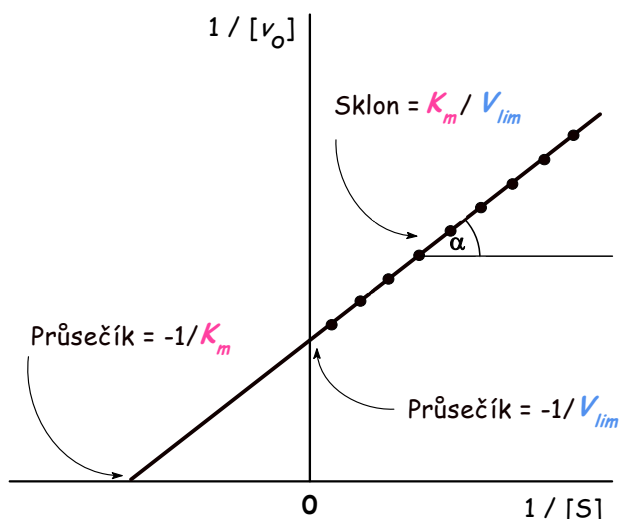
K_m = Michaelisova konstanta

- Jedná se o takovou koncentraci substrátu, při které je počáteční rychlost enzymatické reakce rovna jedné polovině maximální možné rychlosti enzymatické reakce při dané koncentraci enzymu.

- Závisí na typu substrátu a podmínkách, jako jsou pH, teplota a iontová síla roztoku.

- Vysoké hodnoty K_m ukazují na nízkou afinitu substrátu k enzymu, a naopak nízké hodnoty na afinitu vysokou.

Dvojnásobné reciproké vynesení $1 / v_{max}$ proti $1 / [S]$ dle Lineweaver a Burka umožňuje vypočítat hodnoty $V_{lim(max)}$ a K_m .



Graf. 6. 11. : Dvojnásobné reciproké vynesení $1 / v_{\max}$ proti $1 / [S]$

Vzhledem k předkládané fosfatasové aktivitě proteinu Spr1057 byla aktivita enzymu testována pomocí komerčních souprav Serine/Threonine Phosphatase Assay System (PROMEGA), případně P-nitrophenyl phosphate liquid substrate systém (SIGMA) dle pokynů výrobců. Principem metody je měření optické density molybdate:malachitegreen:phosphate komplexu vznikajícího z uvolněného fosfátu.

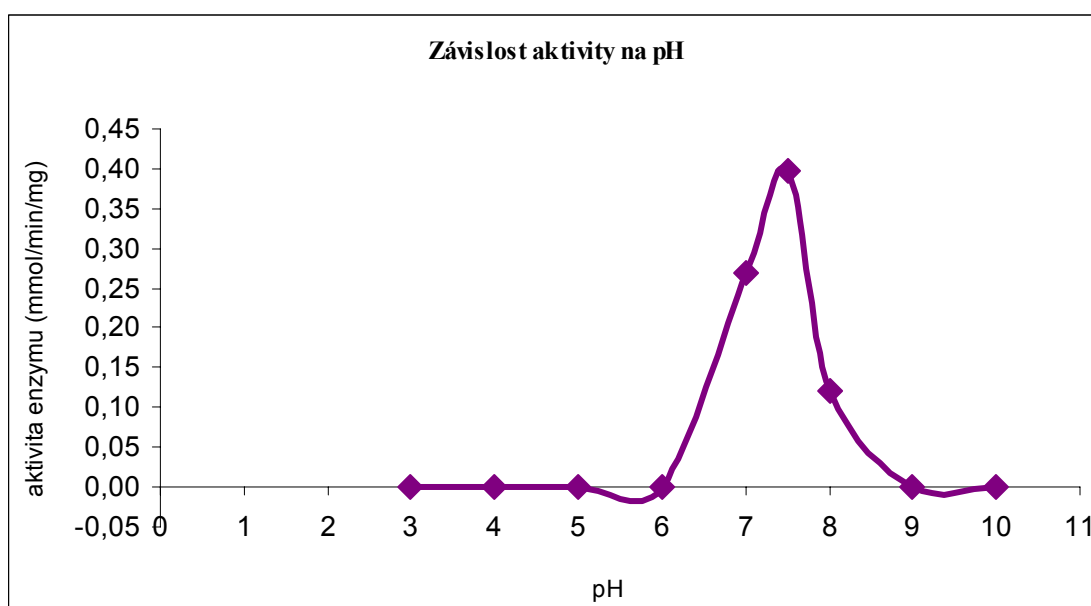
Všechna měření se prováděla v triplicátech. Složení reakční směsi bylo následující: 10 μ l 50mM Trisu s 5mM Mg²⁺ a 1,5mM Mn²⁺; 1 μ l proteinu Spr1057L (0,1 μ g); substrát dle požadované koncentrace a doplnění H₂O (bez fosfátů) do 50 μ l. Inkubace probíhala 5min při 37°C a měřili jsme optickou densitu OD_{600nm} na Microplate Reader (TECAN) - XFluor4 SafireII.

Reakční podmínky (pH, teplota, osmolarita, substráty a jejich koncentrace, koncentrace proteinu, čas probíhající reakce) byly na základě měření optimalizovány a byly použity pro všechny měření shodné - teplota: 37°C; doba inkubace: 5min; pufr: 50mM Tris; ionty: 5mM Mg²⁺ a 1,5mM Mn²⁺; množství enzymu: 0,1 μ g; koncentrace substrátů: 0,05mM - 5mM. Reakční podmínky byly charakterizovány dle výsledků měření linearit enzymové reakce v čase a testování saturevané koncentrace proteinu (data neuvedena).

6.6.1 Závislost aktivity proteinu Spr1057L na pH

pH							
3	4	5	6	7	7,5	8	9
enzymatická aktivita mmol substrátu/min/mg proteinu							
0	0	0	0,068	0,243	0,451	0,112	0
0	0	0	0,033	0,361	0,221	0,081	0
0	0	0	0,086	0,199	0,521	0,096	0

Tab. 6. 5. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na pH



Graf. 6. 12. : Závislost aktivity Spr1057L na pH

Grafické vynesení zobrazuje závislost aktivity Spr1057L na pH. Měření bylo prováděno v triplikátech, zde jsou vyneseny průměrné hodnoty: pH3 0; pH4 0; pH5 0; pH6 0,062; pH7 0,268; pH8 0,398; pH9 0,120 a pH10 0.

Hodnota pH evidentně enzymu Spr1057L, stejně jako i jiných enzymů, velmi výrazně ovlivňuje. Neoptimálnější pro tento enzym je pH 7,5.

6.6.2 Závislost aktivity proteinu Spr1057L na teplotě

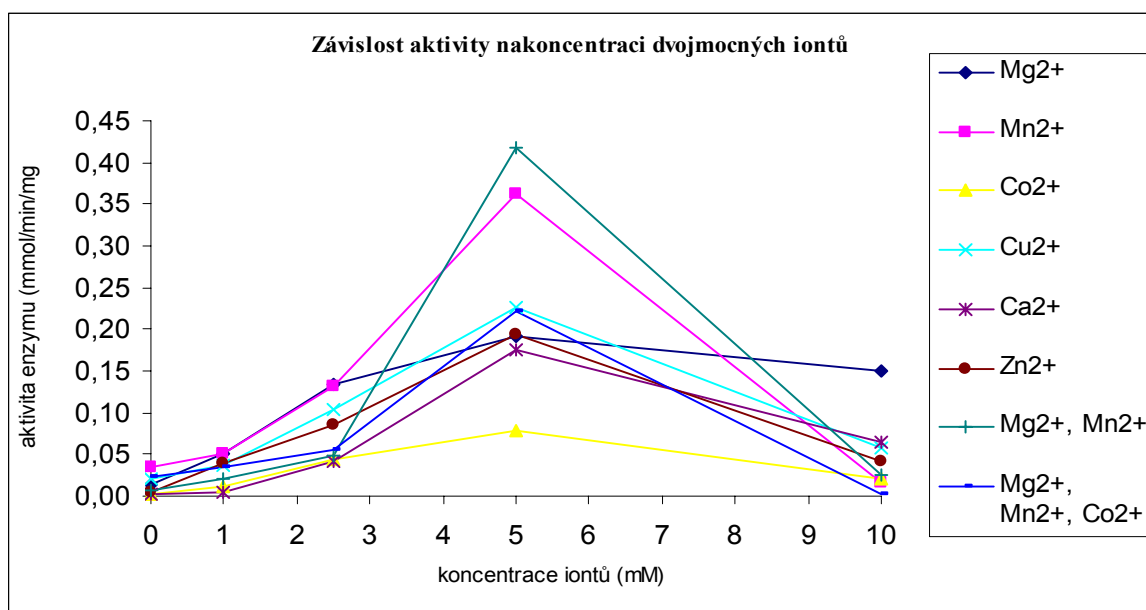
Teplotní optimum Spr1057L bylo stanoveno na 37°C (data neuvedena).

Dále byl testován vliv teploty skladování enzymu na jeho aktivitu. Zjistili jsme, že enzym Spr1057 L je aktivní i po několikadenním uskladnění při 4°C, a že nedochází k poklesu aktivity po zamrazení na -80°C a následném rozmrazení (data neuvedena).

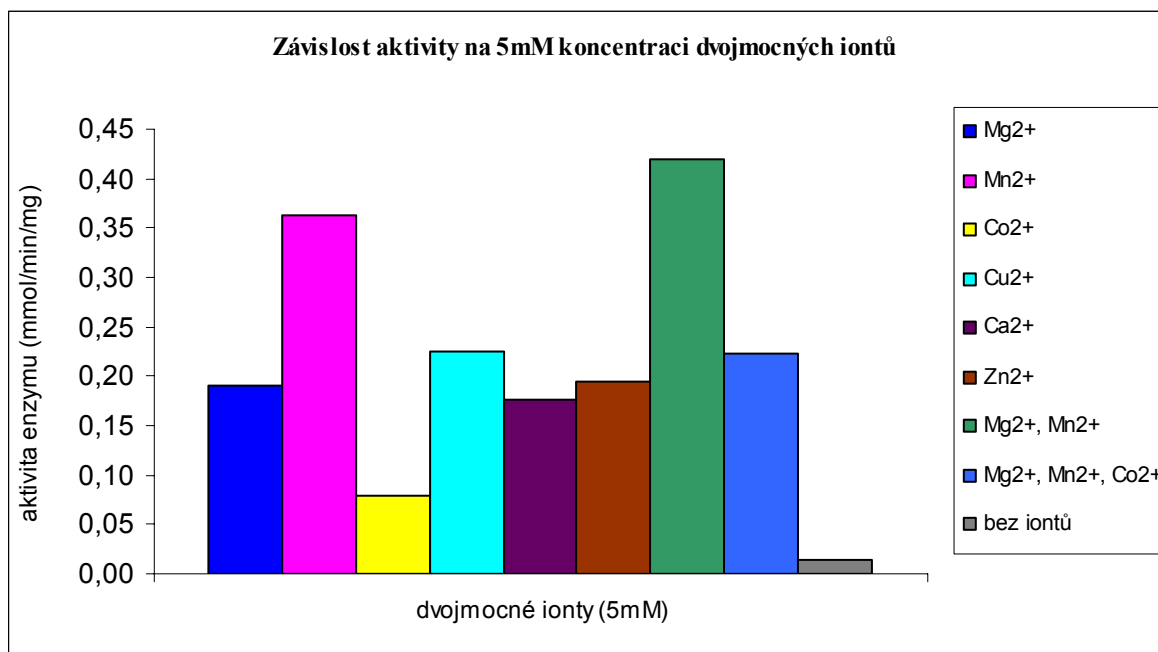
6.6.3 Závislost aktivity proteinu Spr1057L na iontech

koncentrace iontů (mM)	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺
	enzymatická aktivita mmol substrátu/min/mg proteinu							
0	0,014	0,034	0,002	0,020	0,002	0,005	0,006	0,023
1	0,051	0,050	0,011	0,036	0,005	0,039	0,022	0,034
2,5	0,134	0,132	0,044	0,104	0,040	0,086	0,048	0,054
5	0,191	0,363	0,079	0,226	0,176	0,195	0,419	0,223
10	0,149	0,017	0,022	0,058	0,064	0,040	0,025	0,002
enzymatická aktivita bez přidání iontů 0,013 (mmol/min/mg)								

Tab. 6. 6. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na iontech



Tab. 6. 7. : Závislost aktivity Spr1057L na koncentraci dvojmocných iontů



Tab. 6. 8. : Závislost aktivity Spr1057L na 5mM koncentraci dvojmocných iontů

Na základě provedených experimentů jsme zjistili, že přítomnost dvojmocných iontů je pro aktivitu enzymu Spr1057 L nezbytná. Z testovaných iontů je největší aktivita enzymu prokázána při použití kombinace Mg²⁺ s Mn²⁺ při 5mM koncentraci. Podstatný vliv na aktivitu mají i Mn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ a Ca²⁺. S maximem aktivity při koncentraci 5mM.

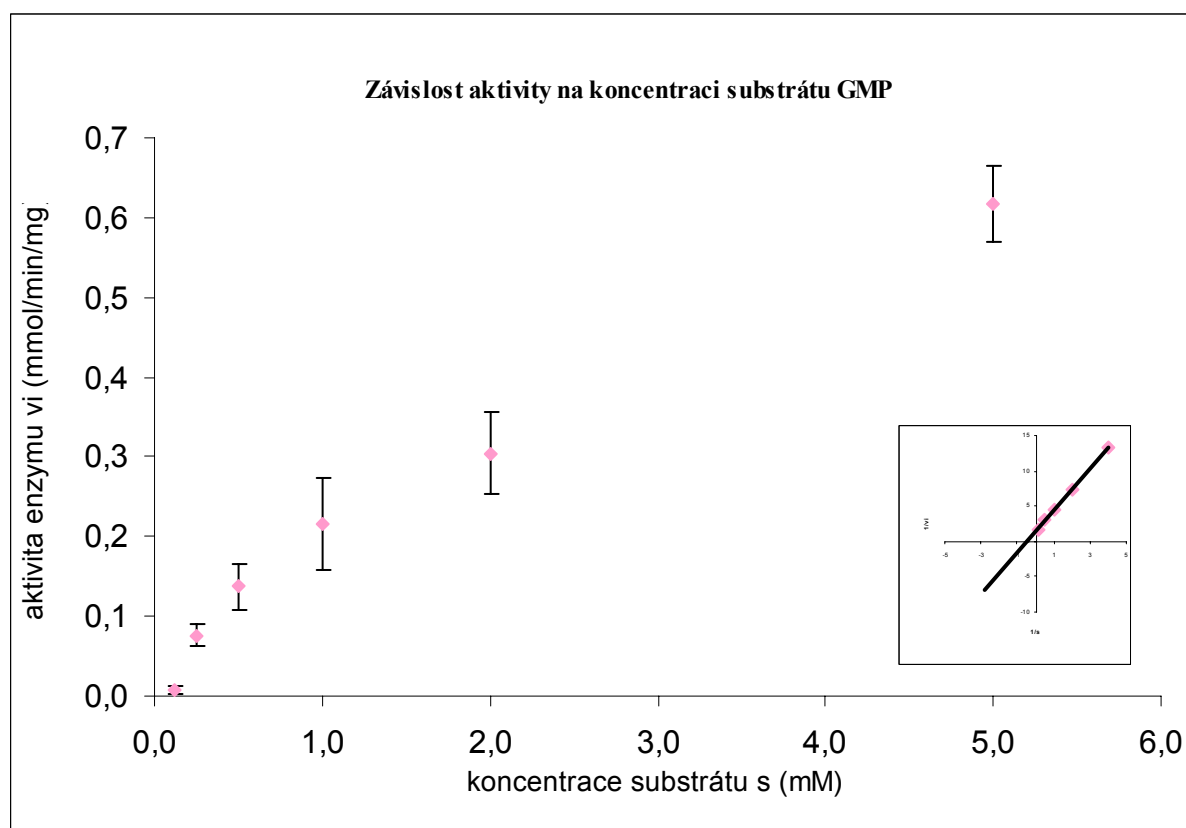
6.6.4 Substrátová specifita proteinu Spr1057L

Testované substráty byly vybrány vzhledem k předpokládané substrátové specifitě Spr1057L a byla brána v úvahu substrátová specifita YjjG a obdobných proteinů. Byly zvoleny následující substráty: GMP, dGMP, UMP, dUMP, dTMP, 5-FdUMP, AMP, IMP, pNPP, acetylfosfát a glukosamin-6 fosfát.

6.6.4.1 GMP

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,004	0,076	0,095	0,132	0,307	0,626
	0,008	0,091	0,157	0,241	0,400	0,562
	0,009	0,082	0,131	0,303	0,311	0,601
	0,015	0,069	0,178	0,204	0,275	0,705
	0,001	0,087	0,143	0,189	0,272	0,598
	0,007	0,053	0,123	0,227	0,263	0,612
průměr	0,007	0,076	0,138	0,216	0,305	0,617
směrodatné odchylky	0,005	0,014	0,029	0,057	0,051	0,048
1/s	8	4	2	1	0,5	0,2
1/vi	142,9	13,2	7,2	4,6	3,2	1,6

Tab. 6. 9. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu GMP



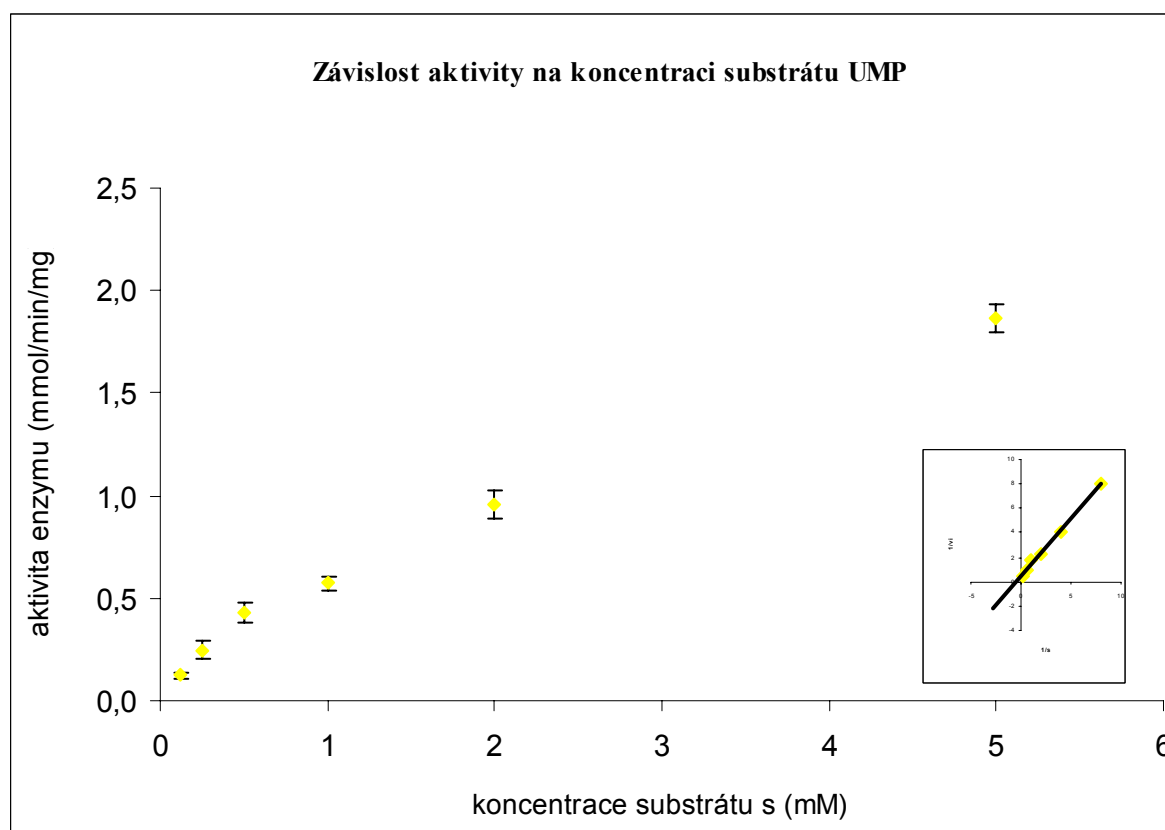
Graf. 6. 13.: Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu GMP

K_m **5,386 mM**
 V_{max} **1,263 mmol/min/mg**

6.6.4.3 UMP

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,102	0,324	0,400	0,605	0,869	1,762
	0,124	0,200	0,448	0,572	0,975	1,813
	0,129	0,258	0,443	0,592	1,024	1,949
	0,111	0,224	0,497	0,593	0,908	1,924
	0,146	0,259	0,361	0,551	0,929	1,856
	0,133	0,213	0,432	0,520	1,035	1,898
průměr	0,124	0,246	0,430	0,572	0,957	1,867
směrodatné odchylky	0,016	0,045	0,046	0,032	0,066	0,071
1/s	8	4	2	1	0,5	0,2
1/vi	8,1	4,1	2,3	1,7	1	0,5

Tab. 6. 11. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu UMP



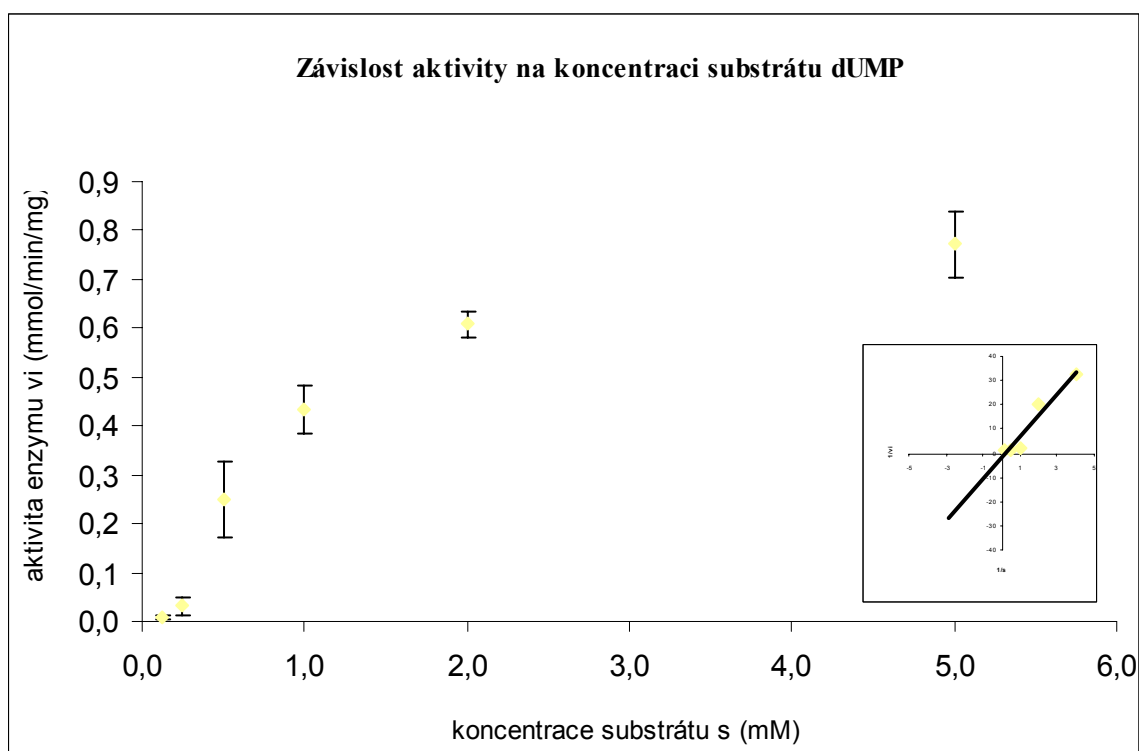
Graf. 6. 15. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu UMP

K_m 1,710 mM
V_{max} 1,733 mmol/min/mg

6.6.4.4 dUMP

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,002	0,016	0,379	0,444	0,573	0,696
	0,009	0,018	0,259	0,368	0,649	0,760
	0,012	0,069	0,154	0,413	0,601	0,884
	0,008	0,034	0,282	0,500	0,612	0,809
	0,004	0,027	0,226	0,477	0,599	0,729
	0,006	0,022	0,199	0,402	0,613	0,752
průměr	0,007	0,031	0,250	0,434	0,608	0,772
směrodatné odchylky	0,004	0,020	0,078	0,049	0,025	0,067
1/s	8	4	2	1	0,5	0,2
1/vi	142,9	32,3	20,4	2,3	1,6	1,3

Tab. 6. 12. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu dUMP



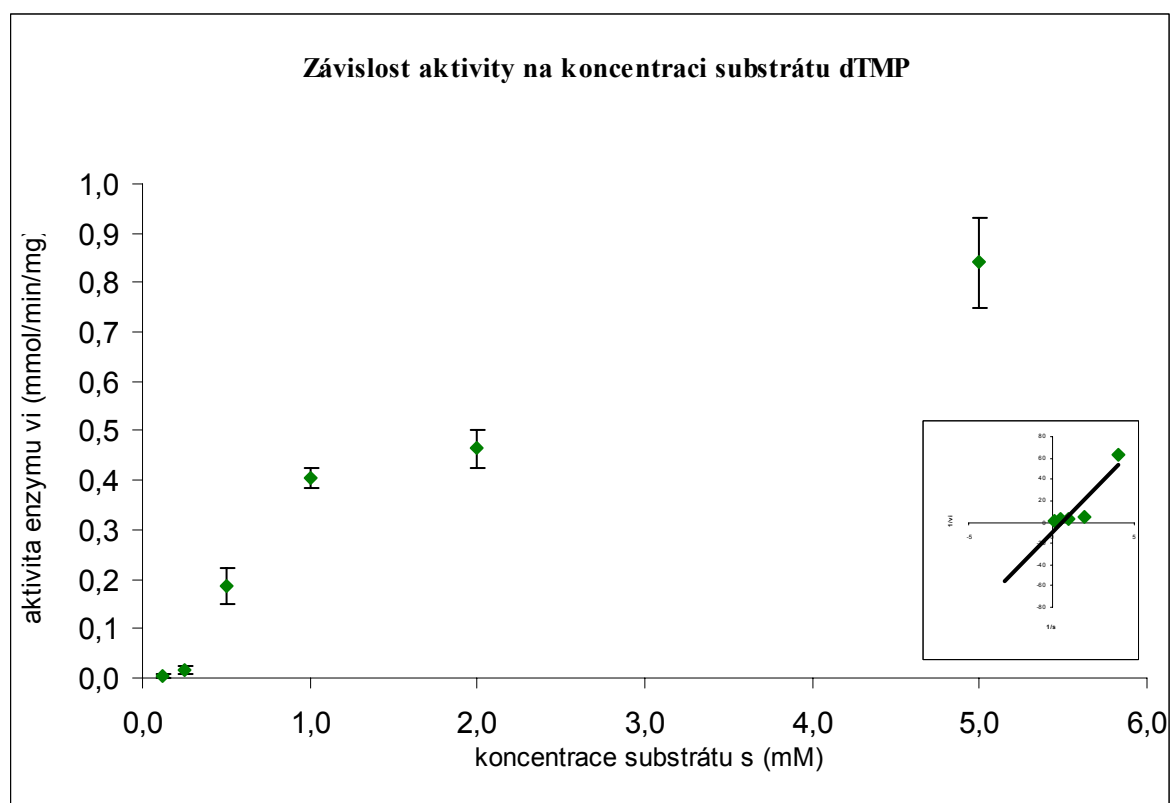
Graf. 6. 16. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu dUMP

K_m **1,752 mM**
 V_{max} **1,077 mmol/min/mg**

6.6.4.5 dTMP

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita v_i (mmol/min/mg)	0,002	0,021	0,136	0,429	0,442	0,756
	0,009	0,011	0,248	0,368	0,487	0,984
	0,003	0,027	0,176	0,408	0,464	0,780
	0,005	0,019	0,18	0,405	0,4	0,915
	0,007	0,003	0,196	0,412	0,5	0,845
	0,002	0,016	0,186	0,398	0,489	0,763
průměr	0,005	0,016	0,187	0,403	0,464	0,840
směrodatné odchytky	0,003	0,008	0,036	0,020	0,038	0,093
1/s	8	4	1	2	0,5	0,2
1/v_i	200	62,5	5,3	2,5	2,2	1,2

Tab. 6. 13. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu dTMP



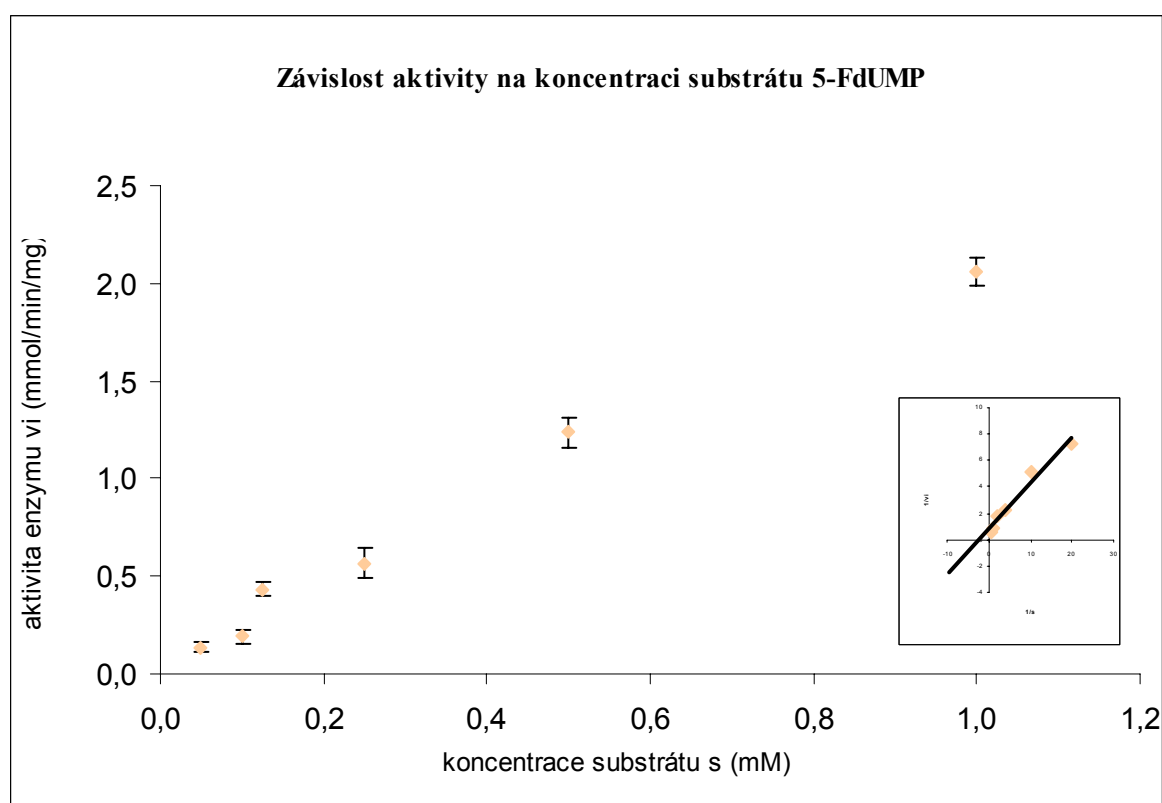
Graf. 6. 17. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu dTMP

K_m **2,410 mM**
 V_{max} **1,090 mmol/min/mg**

6.6.4.6 5-FdUMP

koncentrace substrátu s (mM)	0,050	0,100	0,250	0,500	1	2
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,166	0,179	0,394	0,505	1,197	2,046
	0,108	0,171	0,427	0,519	1,213	2,051
	0,167	0,165	0,475	0,647	1,296	2,070
	0,182	0,169	0,465	0,545	1,212	2,171
	0,124	0,223	0,445	0,679	1,136	1,953
	0,159	0,247	0,385	0,506	1,356	2,079
průměr	0,137	0,192	0,432	0,567	1,235	2,062
směrodatné odchylky	0,029	0,034	0,037	0,077	0,078	0,070
1/s	20	10	4	2	1	0,5
1/vi	7,3	5,2	2,3	1,8	0,8	0,5

Tab. 6. 14. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu 5-FdUMP



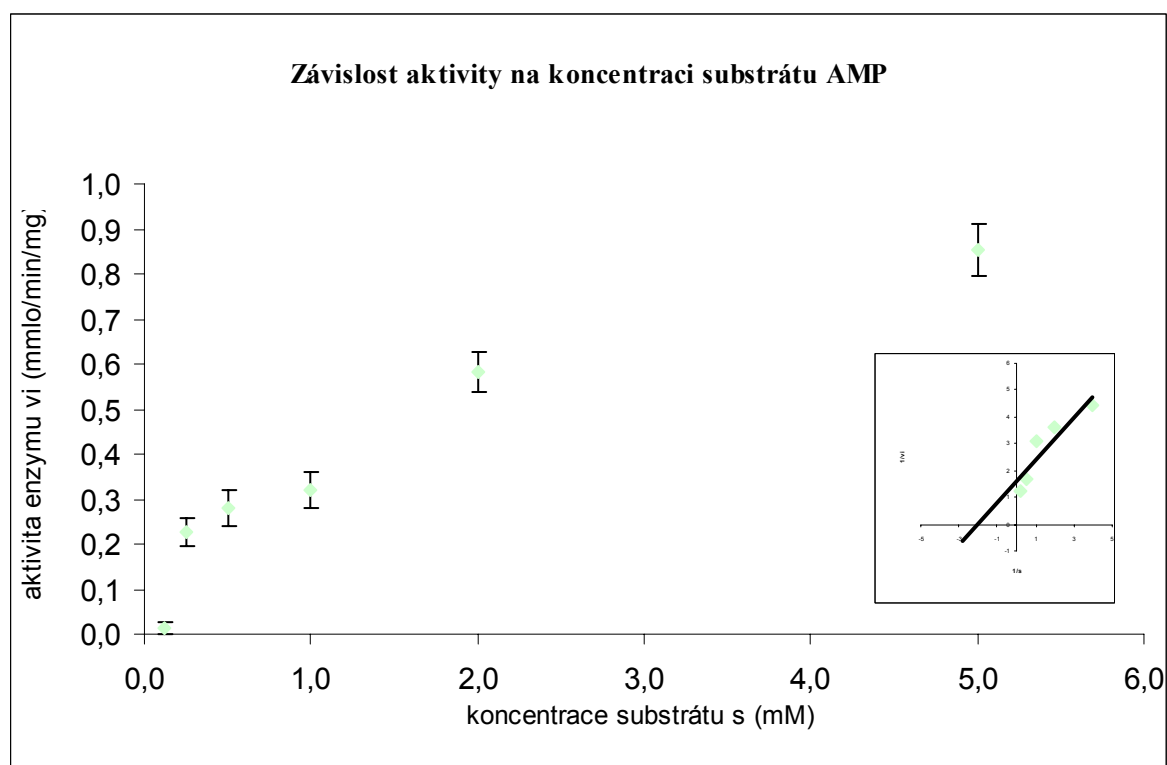
Graf. 6. 18. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu 5-FdUMP

Km **0,337 mM**
Vmax **0,962 mmol/min/mg**

6.6.4.7 AMP

konzentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,024	0,226	0,296	0,289	0,546	0,876
	0,001	0,230	0,243	0,302	0,528	0,765
	0,011	0,28	0,351	0,328	0,611	0,892
	0,003	0,182	0,245	0,293	0,646	0,93
	0,03	0,236	0,287	0,401	0,565	0,842
	0,012	0,213	0,261	0,309	0,599	0,824
průměr	0,013	0,228	0,280	0,320	0,582	0,855
směrodatné odchytky	0,011	0,032	0,041	0,042	0,044	0,058
1/s	8	4	2	1	0,5	0,2
1/vi	76,9	4,4	3,6	3,1	1,7	1,2

Tab. 6. 15. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu AMP



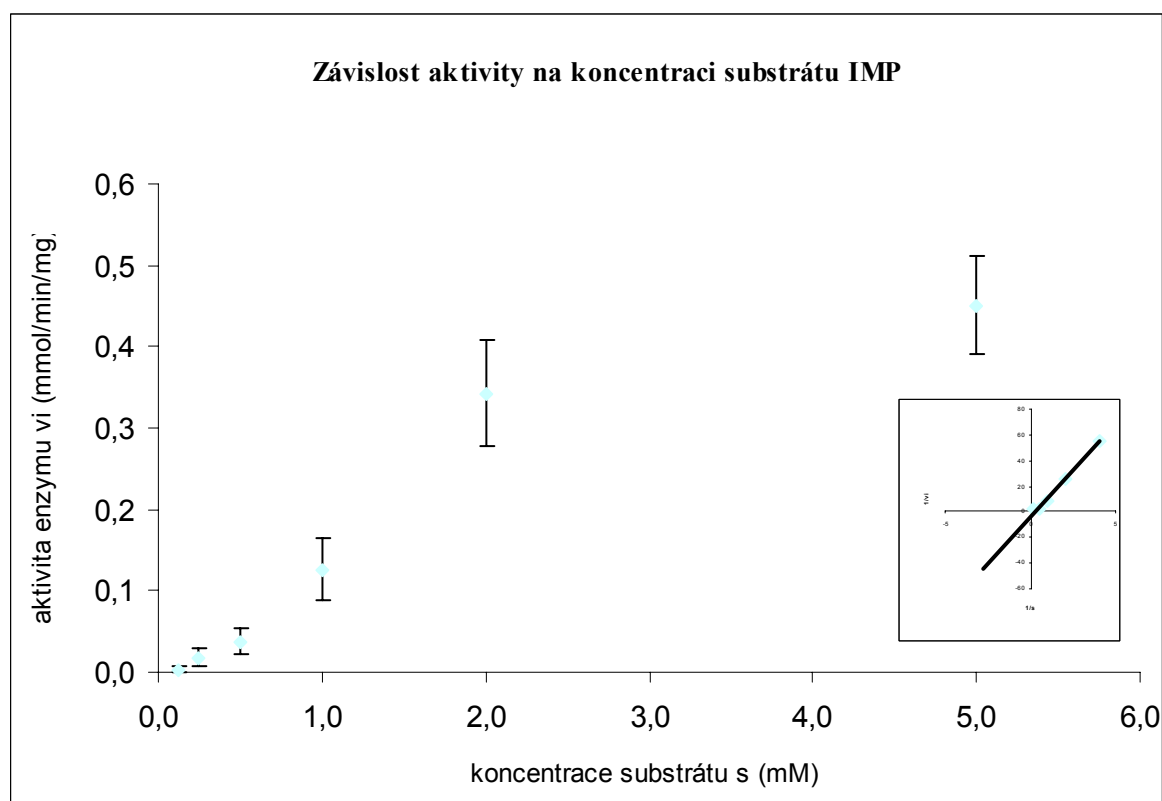
Graf. 6. 19. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu AMP

K_m 2,060 mM
 V_{max} 1,191 mmol/min/mg

6.6.4.8 IMP

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,002	0,028	0,031	0,094	0,460	0,403
	0,003	0,013	0,060	0,187	0,304	0,441
	0,004	0,006	0,025	0,109	0,264	0,502
	0,009	0,009	0,05	0,159	0,349	0,4
	0,002	0,024	0,019	0,115	0,338	0,411
	0,001	0,03	0,041	0,096	0,341	0,545
průměr	0,003	0,018	0,038	0,127	0,343	0,450
směrodatné odchylky	0,003	0,010	0,015	0,038	0,066	0,060
1/s	8	4	2	1	0,5	0,2
1/vi	333,3	55,6	26,3	7,9	2,9	2,2

Tab. 6. 16. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu IMP



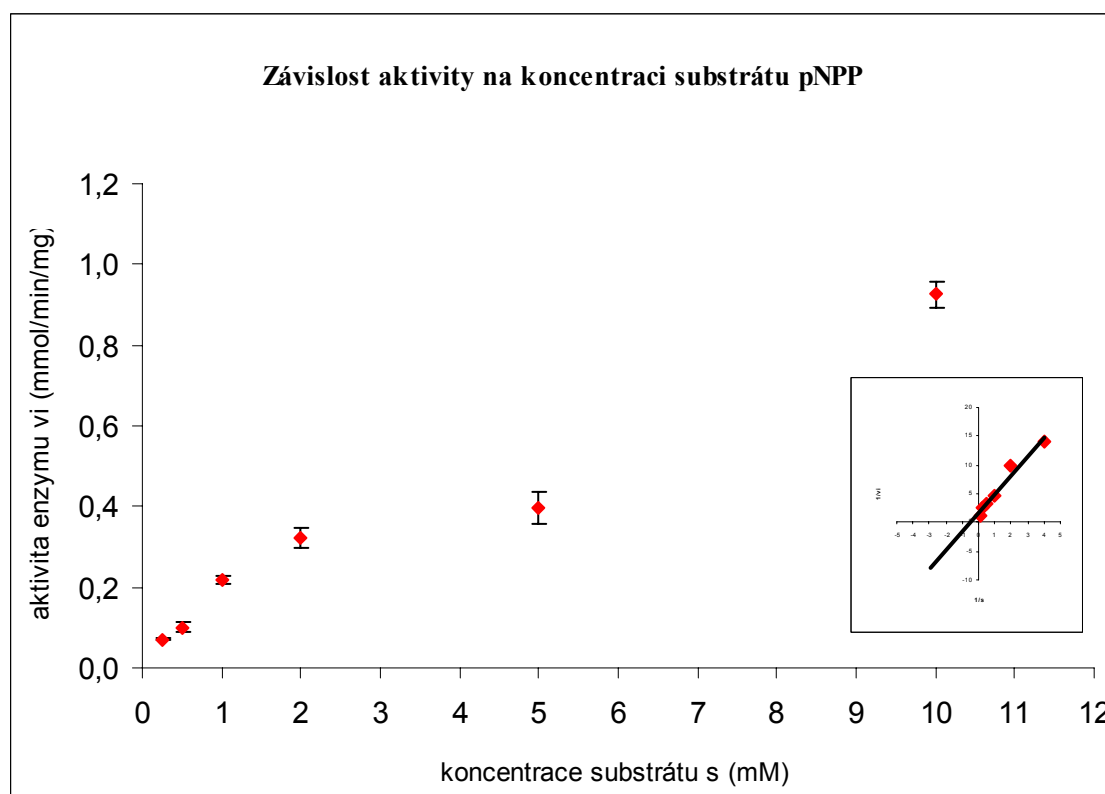
Graf. 6. 20. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu IMP

K_m **4,792 mM**
 V_{max} **0,918 mmol/min/mg**

6.6.4.9 pNPP

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,250	0,500	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,074	0,082	0,230	0,335	0,445	0,978
	0,067	0,110	0,211	0,332	0,405	0,902
	0,071	0,108	0,227	0,320	0,390	0,904
	0,077	0,115	0,221	0,358	0,417	0,937
	0,066	0,088	0,203	0,282	0,410	0,897
	0,072	0,101	0,225	0,320	0,327	0,940
průměr	0,080	0,126	0,265	0,438	0,678	1,603
směrodatné odchytky	0,024	0,067	0,124	0,297	0,709	1,820
1/s	4	2	1	0,5	0,2	0,1
1/vi	14,027	9,930	4,554	3,082	2,506	1,080

Tab. 6. 17. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu pNPP



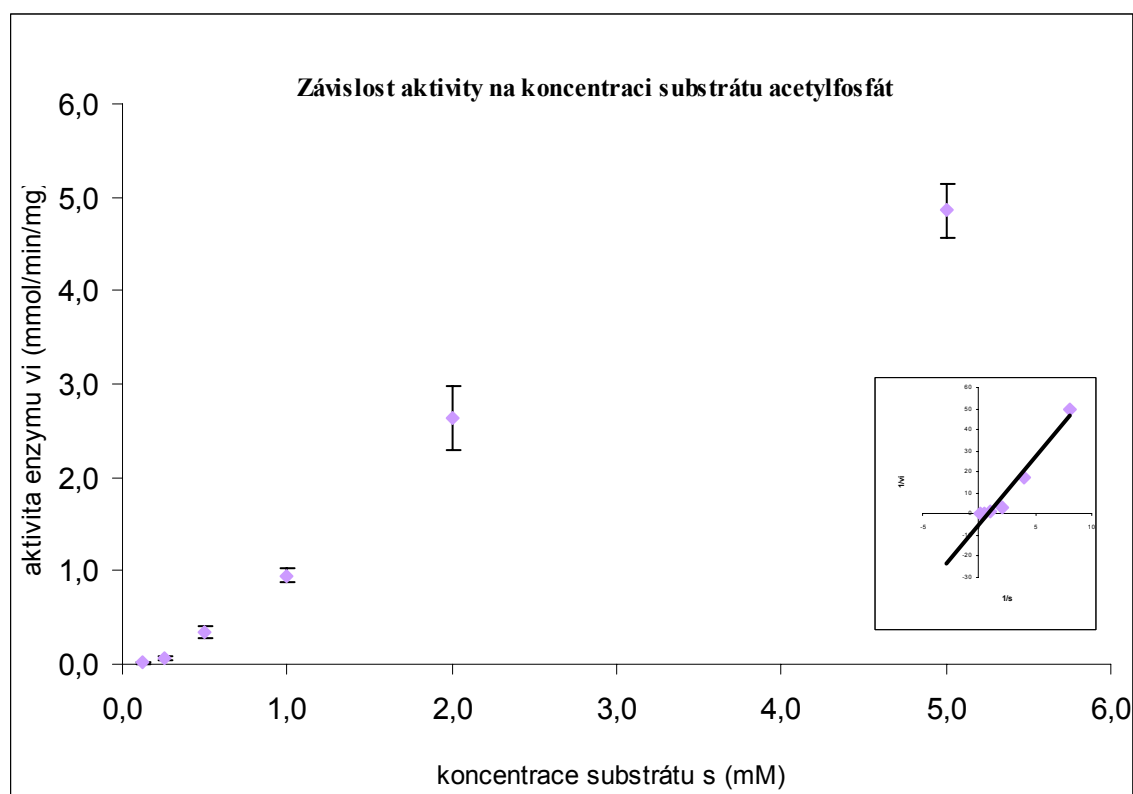
Graf. 6. 21. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu pNPP

K_m **20,346 mM**
V_{max} **2,692 mmol/min/mg**

6.6.4.10 acetylfosfát

koncentrace substrátu s (mM)	0,125	0,25	0,5	1	2	5
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,022	0,058	0,316	1,024	2,848	5,002
	0,005	0,089	0,256	0,862	2,742	4,801
	0,034	0,067	0,436	0,979	2,325	5,056
	0,013	0,054	0,378	0,85	2,109	4,303
	0,027	0,039	0,287	1,004	2,952	4,992
	0,02	0,041	0,345	0,953	2,861	5,007
průměr	0,020	0,058	0,336	0,945	2,639	4,860
směrodatné odchylky	0,010	0,018	0,065	0,073	0,341	0,287
1/s	8	4	2	1	0,5	0,2
1/vi	50	17,2	3	1,1	0,4	0,2

Tab. 6. 18. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu acetylfosfát



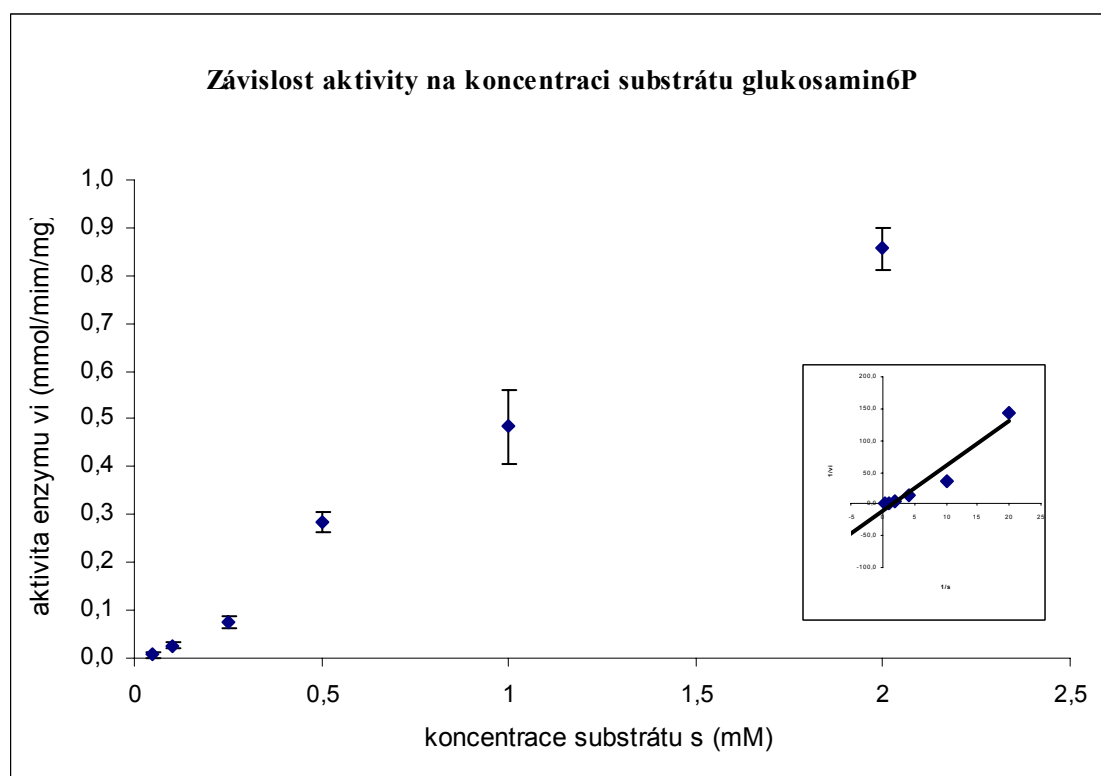
Graf. 6. 22. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu acetylfosfát

K_m 18,12 mM
 V_{max} 22,76 mmol/min/mg

6.6.4.11 glukosamin6P

koncentrace substrátu s (mM)	0,050	0,100	0,250	0,5	1	2
aktivita vi (mmol/min/mg)	0,008	0,029	0,092	0,302	0,403	0,857
	0,001	0,026	0,065	0,276	0,557	0,862
	0,007	0,026	0,076	0,268	0,492	0,805
	0,017	0,039	0,071	0,261	0,591	0,921
	0,004	0,015	0,058	0,312	0,416	0,813
	0,003	0,027	0,085	0,289	0,445	0,879
průměr	0,007	0,027	0,075	0,285	0,484	0,856
směrodatné odchytky	0,006	0,008	0,013	0,020	0,077	0,043
1/s	0,05	0,1	0,25	0,5	1	2
1/vi	0,007	0,027	0,075	0,285	0,484	0,856

Tab. 6. 19. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu glukosamin6P



Graf. 6. 23. : Měření aktivity Spr1057L v závislosti na koncentraci substrátu glukosamin6P

Km 8,391 mM
 Vmax 4,467 mmol/min/mg

Konstanty K_m a V_{max} charakterizují kinetické parametry enzymu a byly vypočítávány v programu SigmaPlot 10.0. Dle zjištěných hodnot K_m u jednotlivých substrátů jsme vyhodnotili substrátovou specifitu proteinu Spr1057L. Pro hodnoty K_m platí vztah: čím nižší hodnota K_m , tím vyšší afinita enzymu k danému substrátu.

substrát	K_m (mM)	V_{max} (mmol/min/mg)
GMP	5,38	1,26
dGMP	4,73	1,23
UMP	1,71	1,73
dUMP	1,08	1,75
dTMP	2,41	1,09
5-FdUMP	0,34	0,96
AMP	2,06	1,16
IMP	4,79	0,92
pNPP	20,35	2,69
acetylfosfát	18,12	22,76
glukosamin6P	8,39	4,47

Tab. 6. 20. : Kinetické parametry substrátů Spr1057L

substrát s nejvyšší afinitou



5-FdUMP
dUMP
UMP
AMP
dTMP
dGMP
IMP
GMP
glukosamin 6P
acetylfosfát
pNPP

substrát s nejnižší afinitou

Obr. 6. 32. : Seřazení substrátů dle K_m pro Spr1057L

Podle změřených a vypočítaných hodnot popisujících enzymatickou aktivitu proteinu Spr1057L *S. pneumoniae* jsme charakterizovali substrátovou specifitu, kterou popisuje výše uvedená souhrnná tabulka. Zjištěná specifita byla porovnávána s daty známými u proteinu YjjG *E. coli* (PROUDFOOT M. et al. 2004; KZUNETSOVA E. et al. 2006).

Spr1057 <i>S. pneumoniae</i>			YjjG <i>E. coli</i>	
substrát	Km (mM)	Vmax (mmol/min/mg)	substrát	Km (mM)
GMP	5,38	1,26	GMP	2,00
dGMP	4,73	1,23		
UMP	1,71	1,73	UMP	2,40
dUMP	1,08	1,75	dUMP	0,77
dTMP	2,41	1,09	dTMP	2,14
5-FdUMP	0,34	0,96	5-FdUMP	0,24
AMP	2,06	1,16	AMP	1,80
IMP	4,79	0,92		
pNPP	20,35	2,69	pNPP	17,8
acetylfosfát	18,12	22,76		
glukosamin6P	8,39	4,47	glukosa6P	2,10

Tab. 6. 21. : Kinetické parametry substrátů Spr1057 a YjjG

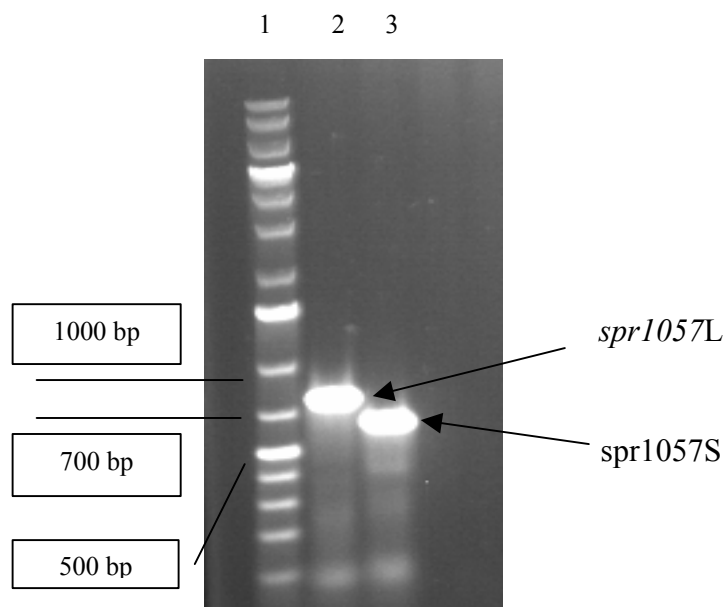
Na základě vlastní charakterizace substrátového spektra Spr1057L *S. pneumoniae* a porovnání s výsledky známými u YjjG *E. coli* jsme se pokusili charakterizovat funkci tohoto enzymu. Lze konstatovat, že z analysovaných substrátů má Spr1057L nejvyšší afinitu k modifikované basi 5-FdUMP. Vypočítaná Km je řádově nižší než u ostatních substrátů a je téměř shodná s Km určenou u YjjG. Lze důvodně předpokládat, že Spr1057L je funkčním analogem YjjG a má in vivo detoxikační funkci.

6.7 Komplementační testy

U komplementačních pokusů jsme vkládali pomocí integrace do bakteriálního chromosomu *S. pneumoniae* studovaný gen *spr1057L* a měli v úmyslu sledovat reverzi fenotypu mutanta. Používali jsme jeden komplementační systém s indukcí pomocí maltosy z vektoru pCEP (GUIRAL et al., 2005) a druhý s indukcí pomocí Zn^{2+} iontů z vektoru pJWV25 (EBERHARDT et al., 2009).

6.7.1 Příprava komplementačního konstruktů na bázi vektoru pCEP a komplementace

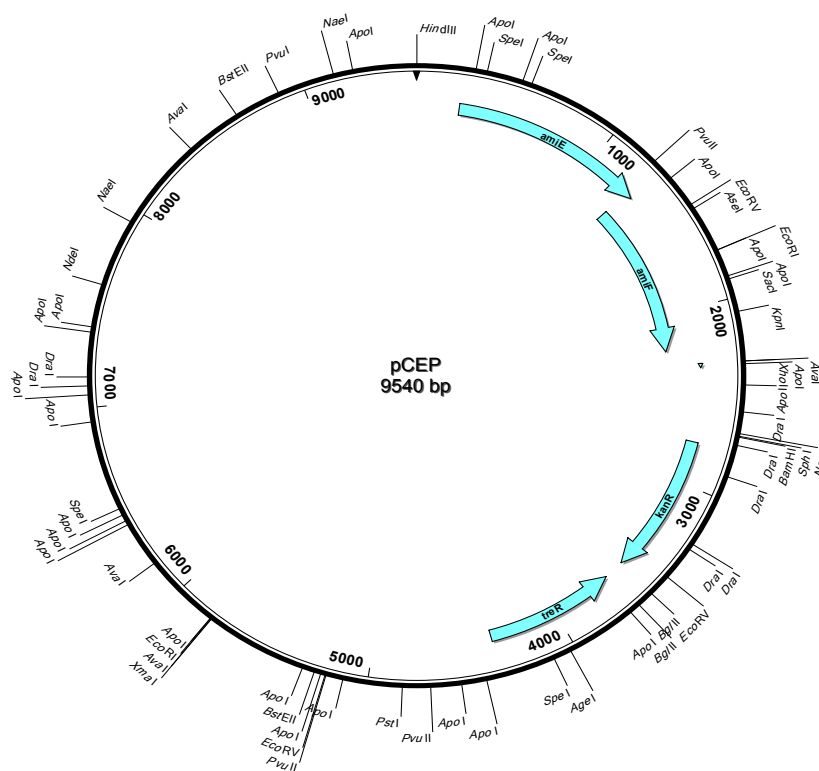
Fragmenty *spr1057L* i *spr1057S* byly amplifikovány pomocí Pfu-ultra polymerasy s primery HADIN-CEP-FL, HADIN-CEP-RL, HADIN-CEP-FS a HADIN-CEP-RS (navrženy pro účely in-fusion klonování do pCEP a přidávající proteinu histidinovou kotvu).



Obr. 6. 33. : Elektroforetogram: amplifikace *spr1057L* a *spr1057S* pomocí oligonukleotidů HADIN-CEP-FL, HADIN-CEP-RL, HADIN-CEP-FS a HADIN-CEP-RS

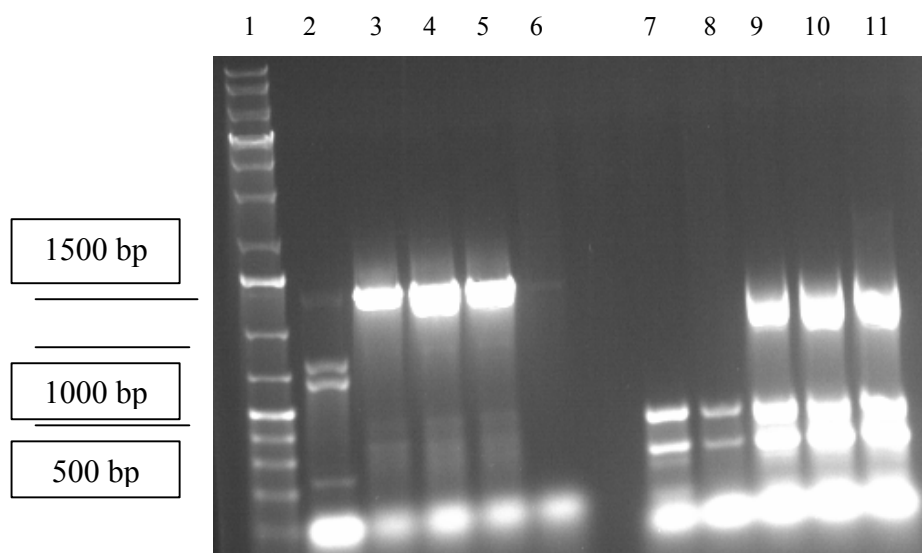
1. DNA standard (1 kb Plus DNA, FERMENTAS)
2. Amplifikace *spr1057L* pomocí oligonukleotidů HADIN-CEP-FL a HADIN-CEP-RL; očekávaný fragment: 744 bp
3. Amplifikace *spr1057S* pomocí oligonukleotidů HADIN-CEP-FS a HADIN-CEP-RS; očekávaný fragment: 600 bp

Vektor pCEP byl rozštěpen restričními enzymy NcoI a BamHI. Následovala in-fusion ligace *spr1057L* a *S* do rozštěpeného pCEPu a transformace do kompetentních buněk *E. coli* JM109 pomocí teplotního šoku. Požadované transformanty byly selektovány pomocí rezistence ke kanamycinu a po izolaci plasmidové DNA ověřeny restriční analýsou. Tímto postupem se nám zdařilo získat transformanty obsahující rekombinantní plasmid pCEPspr1057L, transformanty obsahující rekombinantní plasmid pCEPspr1057S se získat nepodařilo.



Obr. 6. 34. : Vektor pCEP

Připravený konstrukt pCEP + *spr1057L* byl izolován z *E. coli* JM109 v preparativním měřítku a transformován do *S. pneumoniae* Sp1 (WT). Díky přítomnosti homologních oblastí *bgaA* má vektor pCEP schopnost homologní rekombinace do *bgaA* lokusu chromosomu *S. pneumoniae*, k čemuž by mělo dojít při transformaci bakteriálních buněk tímto konstruktem. Transformanty byly selektovány pomocí rezistence na kanamycin a byly připraveny bakteriální konzervy pro pozdější použití. Z buněk *S. pneumoniae* byla izolována chromosomální DNA a na té následovalo ověřování integrace rekombinantního plasmidu pCEP*spr1057L* do chromosomu pomocí PCR. K PCR testování byla použita LA polymerasa a vzájemná kombinace oligonukleotidů SP-CEP(*amiF*) s SP-CEP(*kan*) a SP-CEP(*amiF*) s SP-CEP(*treR*).



Obr. 6. 35. : Elektroforetogram: PCR ověřování integrace konstruktů pCEP + spr1057L do chromosomální DNA *S. pneumoniae* pomocí kombinace primerů SP-CEP(amiF) s SP-CEP(kan) a SP-CEP(amiF) s SP-CEP(treR)

Ověřování integrace rekombinantního plasmidu pCEPspr1057L do chromosomu bylo prováděno pomocí PCR na chromosomální DNA čtyř transformantů s kombinací oligonukleotidů.

1. 1 kb DNA standard (1 kb Plus DNA, FERMENTAS)
2. Chromosomální DNA *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(kan); negativní kontrola
3. Chromosomální DNA prvního transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(kan); očekávaný fragment: 1,3 kb
4. Chromosomální DNA druhého transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(kan); očekávaný fragment: 1,3 kb
5. Chromosomální DNA třetího transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(kan); očekávaný fragment: 1,3 kb
6. Chromosomální DNA čtvrtého transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(kan); očekávaný fragment: 1,3 kb
7. Chromosomální DNA *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(treR); negativní kontrola
8. Chromosomální DNA prvního transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(treR); očekávaný fragment: 2,7 kb
9. Chromosomální DNA druhého transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(treR); očekávaný fragment: 2,7 kb
10. Chromosomální DNA třetího transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(treR); očekávaný fragment: 2,7 kb
11. Chromosomální DNA čtvrtého transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí SP-CEP(amiF) a SP-CEP(treR); očekávaný fragment: 2,7 kb

Velikosti amplifikovaného fragmentu s SP-CEP(amiF) a SP-CEP(kan) a fragmentu s SP-CEP(amiF) a SP-CEP(treR) velikostně odpovídají u 2. a 3. transformanty, což prokazuje integraci konstruktů do chromosomu.

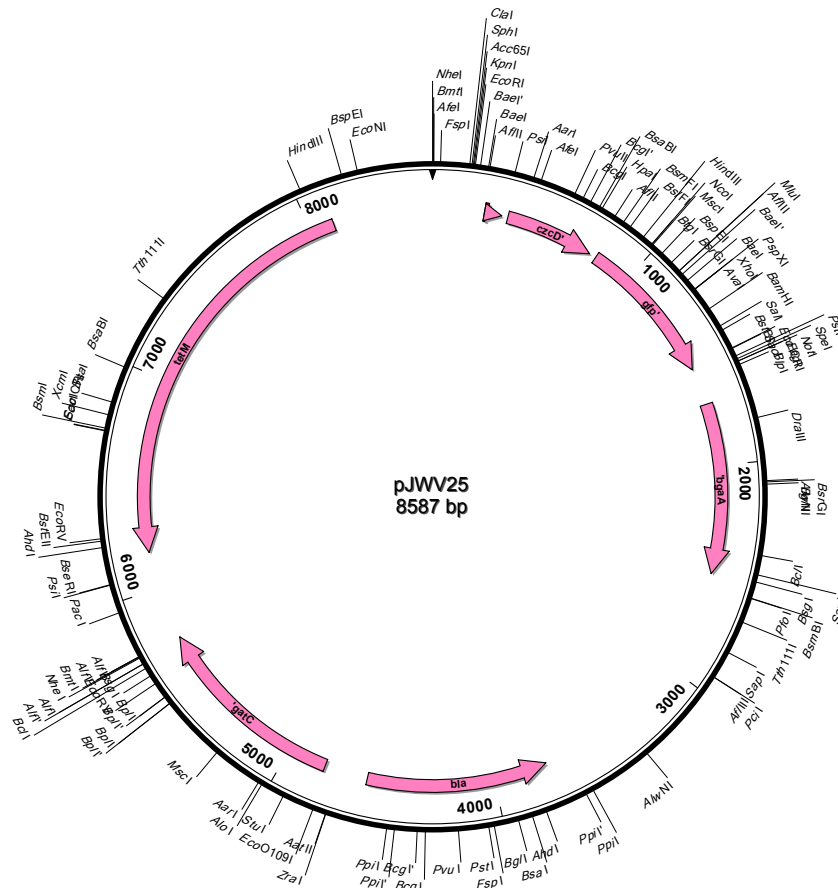
Bakteriální buňky *S. pneumoniae* byly pěstovány v 10ml CAT mediu se 100μl 20% D-maltosy jako induktora proteinové exprese do OD₆₀₀ 0,5 - 0,8. Následně byly buňky hydrolysovány ve vzorkovém pufru při 100°C a naneseny na SDS-PAGE elektroforesu (12% separační gel). Jeden proteinový gel byl barven Commasie Blue a druhý po Westernově přenosu na PVDF membránu imunodetekován Anti -His-POD - monoklonální protilátkou konjugovanou s peroxidasou (1:10000).

Zjistili jsme že přes úspěšnou integraci genu *spr1057L* do chromosomálního lokusu *bgaA* nedošlo po indukci maltosou k jeho expresi.

6.7.2 Příprava komplementačního konstruktů na bázi vektoru pJWV25 a komplementace

Vektor pJWV25 (EBERHARDT et al., 2009) je vektor určený primárně k indukibilní expresi genu fúzovaného s proteinem GFP z promotoru P_{czcD} (Zn²⁺-inducibilní) v *S. pneumoniae*. Díky přítomnosti homologních oblastí genu *bgaA* a *spr0564* se po dvojitém cross-overu integruje do této neesenciální oblasti.

Z plasmidu jsme pomocí restrikčních enzymů EcoRI a NotI odstranili příslušný fragment obsahující promotorovou oblast P_{czcD} a gen kódující protein GFP. Ve dvou nezávislých amplifikačních reakcích jsme připravili fragmenty obsahující jak promotorovou oblast tak gen *spr1057L*. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby na pravé straně fragmentu s promotorovou oblastí a na levé straně genu *spr1057L* byly přesahující komplementární oblasti. Pro amplifikaci promotorové oblasti byly použity oligonukleotidy LN123 a PB005, pro gen *spr1057* PB006 a PB007. Oba dva fragmenty byly purifikovány a po smíchání použity jako templát pro přípravu fúzního produktu obsahujícího jak promotor P_{czcD}, tak gen *spr1057* (tzv. fusion PCR). K amplifikaci fúzního fragmentu byly použity vnější oligonukleotidy, tj. LN123 a PB007. Vzniklý produkt byl purifikován a po štěpení EcoRI a NotI ligován do připraveného vektoru.



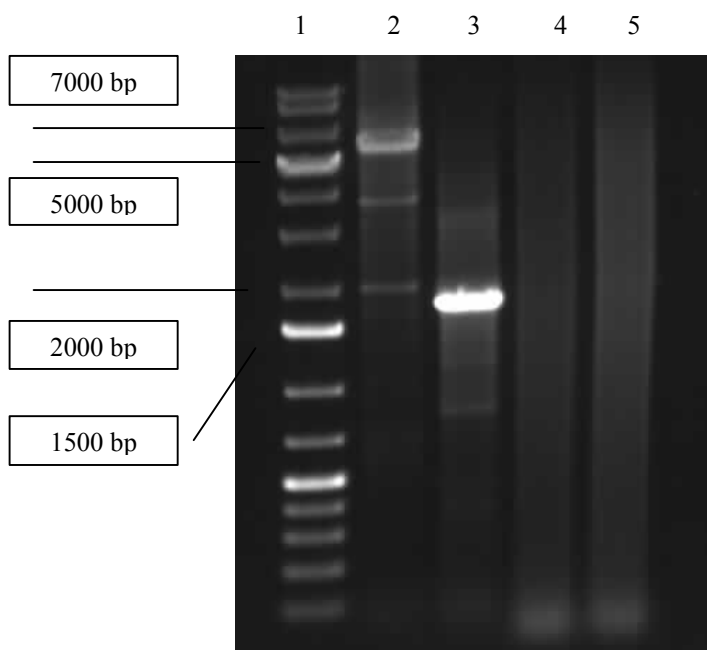
Obr. 6. 36. : Vektor pJWV25

Ligační směs byla transformována do *E. coli* JM109 pomocí teplotního šoku. Transformanty byly selektovány pomocí rezistence k tetracyklinu a po izolaci plasmidové DNA ověřeny restrikční analysou.

Tímto postupem se nám podařilo získat transformanty obsahující konstrukt pJWV25 + *spr1057L*, který jsme pojmenovali pJWHAD6.

Připravený konstrukt pJWHAD6 byl linearizován pomocí restrikčního enzymu PvuI, sole a enzym byly odstraněny po reakci pomocí soupravy MinElute™ Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) a lineární fragment byl transformován do *S. pneumoniae* Sp1 (WT). Vektor pJWV25 má schopnost integrace do lokusu *spr0564 - 0565* chromosomu *S. pneumoniae*, k čemuž by mělo dojít při transformaci bakteriálních buněk tímto konstruktem. Transformanty byly selektovány pomocí rezistence na tetracyklin. Z několika

kolonií byly připraveny bakteriální konzervy pro pozdější použití. Z narostlých kultur *S. pneumoniae* byla izolována chromosomální DNA a pomocí PCR byla ověřena integrace pJWHAD6 do chromosomu. K PCR reakci byla použita LA polymerasa a kombinace primerů LN32 s HADEXr-1infusion a LN142 s HADEXf-1infusion.



Obr. 6. 37. : Elektroforetogram: PCR ověřování integrace konstruktů pJWHAD6 do spr0564 - 0565 lokusu chromosomální DNA *S. pneumoniae* pomocí kombinace oligonukleotidů LN32 s HADEXr-1infusion a LN142 s HADEXf-1infusion

Ověřování integrace konstruktů pJWHAD6 do spr0564 - 0565 lokusu chromosomální DNA *S. pneumoniae* bylo provedeno pomocí PCR a kombinace oligonukleotidů. Pomocí primerů se amplifikoval gen *spr1057L*, ale i část plasmidové a chromosomální DNA.

1. 1. kb DNA standard (1 kb Plus DNA, FERMENTAS)
 2. Chromosomální DNA transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí LN32 a HADEXr-1infusion; očekávaný fragment: 5590 bp (714(gen) + 4641(plasmid) + 235(chromosom))
 3. Chromosomální DNA transformanta *S. pneumoniae* amplifikace pomocí LN142 a HADEXf-1infusion; očekávaný fragment: 1698 bp (714(gen) + 934(plasmid) + 50(chromosom))
 4. Chromosomální DNA *S. pneumoniae* amplifikace pomocí LN32 a HADEXr-1infusion; negativní kontrola
 5. Chromosomální DNA *S. pneumoniae* amplifikace pomocí LN142 a HADEXf-1infusion; negativní kontrola
- Získané fragmenty svou velikostí odpovídají předpokládané, což prokazuje u transformanta integraci konstruktů do chromosomu *S. pneumoniae*.

Dále máme záměr porovnat fenotypový projev, a to růstovou citlivost k analogům basí u potvrzeného transformanta *S. pneumoniae* s pJWHAD6, který má ve svém

chromosomu vložen *spr1057L* oproti mutantě *S. pneumoniae* Sp10 (Δ *stkP*), jež má 59x sníženou expresi *Spr1057L* a *S. pneumoniae* Sp1 (WT).

Takto připravený kmen *S. pneumoniae* s integrovaným genem *spr1057L* pod kontrolou inducibilního promotoru byl použit jako recipient pro přípravu mutace v genu *stkP*. Tento postup byl zvolen s ohledem na skutečnost, že dalece genu *stkP* má za následek snížení účinnosti transformace o 2 řády. Inaktivace *stkP* byla provedena pomocí transformace plasmidem pAkCmDK, dříve připraveným v laboratoři. Díky homologní rekombinaci s chromosomálním lokusem *stkP* došlo k jeho inaktivaci záměnou za rezistenční kazetu. Takto připravený kmen *S. pneumoniae* bude dále testován v budoucí fázi projektu.

6.8 Příprava konstruktů pro tvorbu mutantů *spr1057 S. pneumoniae*

Paralelně s přípravou komplementačního konstruktů probíhala příprava konstruktů, pomocí kterého by bylo možné inaktivovat gen *spr1057L*. Vzhledem ke skutečnosti, že *spr1057L* je pravděpodobně prvním genem v operonu, bylo nutné při volbě strategie se vyhnout vzniku polárního efektu a ovlivnění dalších genů v operonu. Zvolili jsme proto postup, který umožňuje delecí příslušného genu a následné vyštěpení selekční kazety. Tento postup umožňuje vznik tzv. neoznačených delecí. Při vhodném návrhu konstruktů je možné dosáhnout tzv. delecí „in-frame“, tzn. se zachováním čtecího rámce zbytkové sekvence deletovaného genu. Pak je pravděpodobnost vzniku polární mutace minimální.

Pro tvorbu konstruktů byla použita lineární Cheshire kazeta (WENG et al., 2009)) obsahující rezistenční kazetu kódující rezistenci k erytromycinu a gen pro rekombinasi Cre, která je pod kontrolou inducibilního fukosového promotoru. Cheshire kazeta byla amplifikována pomocí oligonukleotidů DAM868 a DAM 869 obsahujícími restrikční místa NcoI a MluI. Vzniklý fragment byl těmito enzymy štěpen a purifikován. Současně byly amplifikovány dva fragmenty, každý homologní k jedné polovině genu *spr1057L* (5'- a 3'-části). K amplifikaci byly použity oligonukleotidy PB001 a PB002 (5'-část) a PB003 a PB004 (3'-část). Vzniklé fragmenty byly jednotlivě štěpeny restriktasami NcoI a MluI a purifikovány. Cheshire kazeta, 5'-část genu a 3'-část genu byly smíchány v ekvimolárním množství a ligovány v tzv. tripartitní reakci. S ligační směsí jako templátu byla ve finále provedena PCR reakce s použitím krajních oligonukleotidů PB001 a PB004. Získali jsme produkt o požadované velikosti (data neuvedena), který bude v pokračování projektu

transformován do *S. pneumoniae*. Po homologiní rekombinaci bude fukosou indukována exprese rekombinasy Cre a dojde k vyštěpení celé Cheshire kazety.

7 DISKUSE

Protein YjjG *E. coli* patří mezi tzv. „úklidové“ nukleotidfosfatasy. Jedná se o enzymy s prokázanou vysokou afinitou vůči modifikovaným nukleotidům. Chrání tedy bakteriální buňku před poškozením modifikovanými nukleobasemi, které mohou v bakteriální buňce vznikat například během oxidativního stresu nebo se mohou vyskytovat ve vnějším prostředí. Tyto modifikované base mohou být inkorporované do DNA nebo RNA a zvyšovat tak mutační rychlost, která může dosáhnout pro buňku letálních hodnot.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda hypotetický protein Spr1057 *S. pneumoniae* s dosud neznámou funkcí je funkčním homologem proteinu YjjG *E. coli*. Srovnání aminokyselinových sekvencí Spr1057 *S. pneumoniae* a YjjG *E. coli* indikovalo, že se jedná o homologní proteiny, byť s relativně nízkou podobností (29%). Podstatné bylo, že byly konzervovány všechny aminokyseliny v předpokládaných katalytických doménách.

Impulsem ke studiu funkce tohoto proteinu byla skutečnost, že v laboratoři ve které byla předkládána diplomová práce vypracována, bylo zjištěno, že exprese genu *spr1057* je v mutantním kmeni *S. pneumoniae* Sp10 (Δ *stkP*) (gen kódující Ser/Thr proteinkinasu) reprimována (SASKOVÁ a kol., 2007). Dle výsledků transkriptomové analýzy bylo snížení exprese 59-násobné, dle údajů získaných pomocí RT-PCR dokonce 500-násobné. Lze říci, že se jednalo o totální represi exprese, což potvrdila i analýza proteinu (ústní sdělení).

Dosud není zřejmé, jaký je mechanismus regulace exprese *spr1057* pomocí StkP. Je však zřejmé, že StkP neovlivňuje transkripci přímo, nýbrž se tak pravděpodobně děje prostřednictvím dosud neidentifikovaného transkripčního faktoru. Mechanismus této regulace si jistě v budoucnu zaslouží experimentální pozornost, neboť u bakterií doposud není popsána podobná souvislost mezi fosforylační signální dráhou a metabolismem DNA. Analýza potenciální promotorové oblasti operonu zatím neprokázala žádné signifikantní sekvenční znaky, jež by umožnily takový faktor předem určit. Je tudíž pravděpodobné, že experimenty vedoucí k jeho identifikaci budou zahrnovat „pull-down“ pokusy, jež umožní určit interagující protein s potenciální promotorovou oblastí.

Zvolená strategie pro určení funkce Spr1057 *S. pneumoniae* byla inspirována prací TITZE, HAUSERA, ENGELBRECHTA a UETZE (2006). Zmiňovaní autoři připravili mutanta *E. coli* (Δyjg) u kterého prokázali vysokou citlivost k modifikované pyrimidinové basi 5-FUdR. Růst mutanta byl kompletně inhibován při 1 μ M koncentraci 5-FUdR v kultivačním médiu, zatímco divoký kmen ovlivněn nebyl. Komplementovaná mutanta (Δyjg + *yjg*) prokazovala téměř úplnou reverzi fenotypu. U mutanta (Δyjg) byla dále prokázána inkorporace mutagenní base 5-BrdU do chromosomální DNA, k čemuž u divokého kmene nedošlo. In vitro byla zjištěna u proteinu Yjg významná afinita k modifikovaným basím (5-FdUMP) s K_m v milimolárním rozmezí. Podstatná byla skutečnost, že afinita Yjg k 5-FdUMP byla téměř desetinásobně vyšší než ke klasickým („canonical“) basím. Na základě těchto skutečností pak byl interpretován pozorovaný fenotyp mutanta *yjg* v *in vivo* experimentech s určena funkce Yjg jako „house-cleaning“ nukleotidasy.

Na základě znalostí těchto výsledků jsme podobnou strategii aplikovali u *S. pneumoniae* s cílem stanovit funkci proteinu Spr1057. Testovali jsme citlivost mutanta *S. pneumoniae* Sp10 ($\Delta stkP$) k modifikovaným basím 5-FUdR a 5-BrdU. U mutanta se prokázala výrazná inhibice růstu již při velmi nízkých koncentracích 5-FUdR, a to 1 μ M, zatímco růst divokého kmene nebyl ovlivněn ani při 10 μ M koncentraci modifikované base. Zvýšená citlivost tohoto mutanta se prokázala i k potenciálnímu mutagennímu nukleotidu 5-BrdU.

Testovali jsme i míru inkorporace potenciálně mutagenního nukleotidu 5-BrdU do chromosomální DNA *S. pneumoniae*. Inkorporace 5-BrdU do chromosomální DNA *S. pneumoniae* kmene Sp10 ($\Delta stkP$) byla prokázána a to zejména při nejvyšší testované koncentraci 5-BrdU (100 μ M). Inkorporace modifikované base do DNA *S. pneumoniae* kmene Sp1 (WT) nebyla detekována.

Ze zjištěných skutečností (inhibice růstu mutanta 5-FUdR a zvýšená inkorporace mutagenního 5-BrdU do chromosomální DNA mutanta) jsme usoudili, že protein Spr1057 *S. pneumoniae* by mohl být homologem Yjg proteinu *E. coli* a mohl by mít stejnou, „úklidovou“ funkci.

Další cílem diplomové práce bylo určení vlastností proteinu Spr1057 *S. pneumoniae* v podmínkách *in vitro*. Protein Spr1057 *S. pneumoniae* je kódován genem

spr1057. Tento gen *spr1057* byl však anotován v databázích ve dvou formách, v původní známé delší variantě *spr1057L* (714 bp) a možné druhé kratší variantě *spr1057S* (514 bp). Pro delší variantu genu svědčí skutečnost, že v tomto případě lze jednoznačně před iniciačním kodónem identifikovat přítomnost ribosom-vázebného místa, zatímco před kratší verzí nikoliv. Přesto jsme v počáteční fázi těchto experimentů připravili obě varianty (expresní a komplementační konstrukty), abychom vyloučili možnost omylu.

Gen *spr1057* L i S jsme amplifikovali pomocí PCR a jako expresní vektor jsme zvolili plasmid pTYB2, díky uváděnému velkému výtěžku proteinu o vysoké čistotě a snadné manipulaci. Rekombinantní proteiny exprimované z tohoto vektoru mají na svém C-terminálním konci fúzi s inteinem, jehož afinity k nosiči s chitinem se využívá při izolaci proteinu. Jako alternativní schéma jsme měli připravený vektor pET28b. Rekombinantní proteiny exprimované z tohoto vektoru mají na svém C-terminálním konci fúzi s histidinovou kotvou, čehož se využívá při izolaci proteinu. Vzhledem k problémům s klonováním fragmentů *spr1057* do připraveného vektoru pTYB2, se v počáteční fázi nepodařilo připravit rekombinantní plasmidy na bázi pTYB2. Modifikovali jsme proces klonování pomocí subklonování fragmentu do alternativního vektoru, kterým byl plasmid pJAKO1. Jedná se o laboratorně připravený plasmid na bázi pBluescriptII obsahující rozšířené polyklonovací místo. Subklonování fragmentu *spr1057* do pJAKO1 bylo úspěšné a následné klonování fragmentů z pJAKO1 do pTYB2 bylo taktéž zakončeno úspěšnou tvorbou rekombinantních plasmidů. Příčina neúspěchu přímého klonování do plasmidu pTYB2 není zcela zřejmá.

Rekombinantní plasmidy jsme transformovali do kompetentních buněk *E. coli* BL21 za účelem proteinové exprese. Expres obou forem rekombinantního proteinu Spr1057 L a S s inteinem byla indukovaná pomocí IPTG při 15°C a probíhala 16 hodin. Expresi za nízké teploty jsme aplikovali s cílem získat co nejvíce proteinu v rozpustné frakci, která je snáze použitelná pro další použití. Touto metodikou jsme docílili masivní exprese Spr1057 L i S formy. Varianta Spr1057L se po rozdělení proteinových frakcí nacházela především v rozpustné frakci, naopak Spr1057S především v nerozpustné frakci. Rozpustnou frakci Spr1057L jsme používali po další experimenty, zatím co od analýzy kratší varianty proteinu jsme upustili. Je možné se domnívat, že kratší varianta proteinu není pro bakteriální buňku přirozenou formou a tudíž nedochází k jejímu správnému „foldingu“.

Fúzní protein Spr1057L s inteinem jsme izolovali metodou imobilizované afinitní chromatografie pomocí komerční soupravy IMPACTTM-CN (BIOLABS). K odštěpení

inteinu jsme používali restriktivního účinku 50mM DTT. Tato technika umožnila získat velké množství proteinu o vysoké čistotě.

Po úspěšné expresi, izolaci a purifikaci proteinu byl dalším cílem diplomové práce popis enzymové aktivity proteinu Spr1057L a reakčních podmínek.

Nejprve jsme charakterizovali a optimalizovali reakční podmínky tohoto enzymu. Testovali jsme závislost enzymatické aktivity na faktorech jako je: pH, teplota a na koncentraci dvojmocných iontů. Z výsledků experimentů je možno říci, že optimální enzymová aktivita je při pH 7,5, teplotě 37°C a přítomnosti dvojmocných iontů Mg^{2+} s Mn^{2+} při 5mM koncentraci. V těchto faktorech se studovaný protein Spr1057 *S. pneumoniae* neliší od homologního YjjG *E. coli*.

Po optimalizaci reakčních podmínek jsme testovali substrátovou specifitu Spr1057L k široké škále substrátů. Testované substráty byly vybrány vzhledem k předpokládané substrátové specifitě Spr1057L a byla brána v úvahu substrátová specifita YjjG a obdobných proteinů, jež byly u *E. coli* charakterizovány rozsáhle v práci KUZNETSOVÉ a kolektivu (2006). Byly zvoleny následující substráty: GMP, dGMP, UMP, dUMP, dTMP, 5-FdUMP, AMP, IMP, pNPP, acetylfosfát a glukosamin-6 fosfát.

Předpokládanou fosfatasovou aktivitu jsme testovali pomocí komerčních souprav Serine/Threonine Phosphatase Assay System (PROMEGA), případně P-nitrophenyl phosphate liquid substrate systém (SIGMA). Při optimalizovaných reakčních podmínkách jsme spektrofotometricky stanovovali enzymatickou aktivitu podle množství uvolněného fosfátu a určili jsme konstanty K_m a V_{max} charakterizující kinetické parametry enzymu pomocí programu SigmaPlot 10.0. Zjistili jsme, že protein Spr1057 *S. pneumoniae* má největší afinitu k modifikovaným basím s K_m v milimolárním rozsahu, stejně jako je tomu u YjjG *E. coli*. Jako nejlepší substrát byl popsán 5-FdUMP s $K_m = 0,34$ mM, čemuž odpovídá $K_m = 0,24$ mM pro tento substrát u *E. coli*. K ostatní testovaným substrátům, včetně přirozených dNMP, prokazoval protein Spr1057 mnohém nižší afinitu (10x).

Souhrnem lze konstatovat, že zjištěné hodnoty K_m pro testované substráty jsou velmi podobné jako u YjjG *E. coli* s obdobnou preferencí pro nepřirozené substráty, který je reprezentován 5-FdUMP. Je tedy pravděpodobné, že podobně jako YjjG v *E. coli* i Spr1057 v *S. pneumoniae* má funkci nukleotidfosfatasy, která má ochrannou funkci a odstraňuje potenciálně mutagenní base.

Jelikož je gen *spr1057* prvním genem v pravděpodobném operonu *spr1052 - spr1057*, kde se nachází kromě tohoto genu i další geny kódující enzymy účastníci se na

opravách DNA, položili jsme si otázku, zda pozorovaný fenotyp by nemohl být způsoben i díky vlivu mutace *stkP* na expresi těchto dalších genů operonu. U mutantu *S. pneumoniae* Sp10 (Δ *stkP*) byl totiž v transkriptomové studii pozorován sice malý, nicméně reprodukovatelný pokles exprese i těchto dalších genů operonu: *Spr1052* 2x, *pyrC* 3x, *ung* 4x, *Spr1056* 9x a *mutX* 4x, což by oproti totální inhibici exprese *Spr1057* nemuselo hrát zásadní roli. Otázkou zůstává, jak vysvětlit významný rozdíl v rozsahu inhibice exprese u genů jednoho potenciálního operonu. Na základě těchto znalostí nelze vyloučit, že by transkripce dalších genů operonu mohla být řízena z interního promotoru, který se nachází před genem *spr1056*, a mechanismus její regulace by mohl být odlišný. Odpověď na tyto otázky bude vyžadovat další experimentální úsilí. V první řadě se nabízí analýza struktury domnělého operonu, například metodou RT-PCR.

Připravili jsme komplementační konstrukt na bázi vektoru pCEP (plasmid pCEP s genem *spr1057L*) a nazvali ho pCEPspr1057L. Vektor pCEP díky přítomnosti homologních oblastí lokusu *bgaA* má schopnost homologní rekombinace do *bgaA* lokusu chromosomu *S. pneumoniae*, který je fenotypově neutrální, tzn., že inserce exogenního genu nijak neovlivní fyziologii buňky. Vektor má maltosový promotor, čehož se využívá k indukci expresi. Po testování získaných transformantů jsme zjistili že integrace genu *spr1057L* do chromosomálního lokusu *bgaA* byla úspěšná, ovšem po indukci maltosou nebyla jeho exprese imunochemicky detekovatelná. Příčina selhání exprese Spr1057 je nejasná, nicméně obdobný problém s expresí byl v tomto systému v laboratoři již dříve zaznamenán (ústní sdělení).

Zvolili jsme tedy jiné komplementační schéma. Připravili jsme komplementační konstrukt na bázi vektoru pJWV25, který byl označen pJWHAD6. Vektor pJWV25 má schopnost integrace do lokusu *spr0564 - 0565* chromosomu *S. pneumoniae*, a byl s úspěchem k ektopické expresi v laboratoři použit (ústní sdělení). Po testování získaných transformantů PCR jsme zjistili, že integrace do chromosomálního lokusu *spr0564 - 0565* byla úspěšná. Po nezbytném testování exprese, bude tento komplementovaný kmen použit ke studiu reverze fenotypu pozorovaného u mutantu *stkP*. Příprava komplementárních konstruktů a kmenů a testování fenotypu byla nad rámec stanovených cílů diplomové práce a bude součástí pokračování tohoto projektu.

Paralelně s tvorbou komplementačních konstruktů jsme se zabývali přípravou konstruktů pomocí kterého by bylo možné inaktivovat gen *spr1057* v chromosomu *S. pneumoniae*. Jelikož je *spr1057L* je pravděpodobně prvním genem v operonu, bylo nutné

se při volbě strategie vyhnout vzniku polárního efektu a ovlivnění exprese dalších genů v operonu.

Zvolili jsme proto postup, který umožňuje delecí příslušného genu a následné vyštěpení selekční kazety. Použili jsme lineární Cheshire kazetu obsahující rezistenční kazetu kódující rezistenci k erytromycinu a gen pro rekombinasi Cre, která je pod kontrolou inducibilního fukosového promotoru. Po sérii „fusion“-PCR reakcí jsme získali produkt o požadované velikosti, který bude v pokračování projektu transformován do *S. pneumoniae*. Po homologní rekombinaci bude fukosou indukována exprese rekombinasy Cre a po vyštěpení celé Cheshire kazety dojde ke vzniku neoznačeného mutantu *S. pneumoniae* ($\Delta spr1057$), kde by neměla být ovlivněna exprese genů ve směru transkripce. Na tomto mutantním kmeni, stejně jako na komplementovaném $\Delta stkP$ budou prováděny další experimenty, zejména pak analýza jejich citlivosti k modifikovaným basím.

Souhrnem lze konstatovat, že protein Spr1057L *S. pneumoniae* je funkčním homologem proteinu YjjG *E. coli*, alespoň v podmínkách *in vitro*. K tomu, aby bylo možné učinit jednoznačné konstatování, že je tomu tak i *in vivo* je nutné dále studovat fenotyp komplementovaného kmene a mutantního kmene *S. pneumoniae* ($\Delta spr1057$).

8 SOUHRN

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Pomocí analýzy aminokyselinových sekvencí, byla zjištěna přítomnost konzervovaných proteinových motivů a vysoká identita ve všech důležitých katalytických doménách Spr1057 *S. pneumoniae* a YjjG *E. coli*. Tato skutečnost vede k hypotéze, že se jedná o funkčně příbuzné proteiny.
- U mutanta *S. pneumoniae* Δ stkP, u kterého je 59 krát snížena exprese genu *spr1057* byla prokázána zvýšená citlivost k analogům basí (FUdR, BrdU), resp. snížená růstová rychlost v přítomnosti těchto derivátů oproti divokému typu *S. pneumoniae*. Zpomalení růstové rychlosti je přímo úměrné koncentraci analogu.
- U mutanta *S. pneumoniae* Δ stkP, u kterého je 59 krát snížena exprese genu *spr1057* byla prokázána zvýšená inkorporace mutagenního nukleotidu BrdU do chromosomální DNA oproti divokému typu *S. pneumoniae*. Míra inkorporace je přímo úměrná koncentraci BrdU v kultivačním médiu.
- Protein Spr1057 byl exprimován v *E. coli*, izolován a purifikován s velkým výtěžkem a o vysoké čistotě.
- Testovala se enzymatická aktivita Spr1057 *S. pneumoniae* a charakterizovaly se reakční podmínky. Současně byla charakterizována substrátová specifita na široké škále substrátů.
- Zjištěné skutečnosti (srovnání Spr1057 a YjjG; zvýšení citlivosti k analogům basí u mutanty; zvýšená inkorporace mutagenních basí do DNA u mutanty, enzymatická aktivita, substrátová specifita) potvrzují hypotézu, že protein Spr1057 *S. pneumoniae* je homolog proteinu YjjG *E. coli*. Jedná se tedy o „house cleaning“ nukleotidfosfatasu rodiny „haloacid dehalogenas HAD“ chránící bakteriální buňku před poškozením modifikovaným nukleobasemi a snižující mutační rychlost.

- Za účelem komplementace deficiencie Spr1057 u mutantu $\Delta stkP$ byl připraven komplementační konstrukt exprimující gen *spr1057* z inducibilního promotoru. Pomocí homologní rekombinace byl integrován do chromosomu *S. pneumoniae*. Cílem tohoto experimentu by mělo být porovnání citlivosti komplementovaného mutantu k modifikovaným basím.
Tyto experimenty byly nad rámec plánovaného rozsahu diplomové práce a budou dokončeny v budoucí fázi projektu.
- Pomocí samovyštitelné mutagenní kazety byl připraven neznačený mutant $\Delta spr1057$. Studium vlastností mutantu by mělo potvrdit, zda je deficiencie Spr1057 jedinou příčinou pozorovaného fenotypu.
Tyto experimenty byly nad rámec plánovaného rozsahu diplomové práce a budou dokončeny v budoucí fázi projektu.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A _{260, 280}	absorbance při 260, resp. 280nm
aa	aminokyselina
ATB	antibiotikum
Amp	Ampicilin
Anti	protilátka
BSA	hovězí sérum albumin
bp	páry basí
cc	kompetentní buňky
CSP	kompetenci stimulující peptid
ctg	centrifugace
DNA	kyselina deoxyribonukleová
<i>E. coli</i>	<i>Escherichium coli</i>
glc	glukosa
His	histidin
HAD	enzymatická skupina haloacid dehalogenas
kit	komerční souprava
kys.	kyselina
RNA	kyselina ribonukleová
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
MCS	Multiple cloning sites - polyklonovací místo vektoru
OD _{400, 600}	optická densita při 400, resp. 600nm
overnight	přes noc narostlá bakteriální kultura
WT	divoký typ bakterie

10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Baykov A. A., Evtushenko O. A., Avaeva S. M. - A malachite green procedure for orthophosphate-based enzyme immunoassay (Anal Biochem, Vol. 171(2), (1988), 266 - 270)

Bean B. and Tomasz A. - Inhibitory Effects and Metabolism of 5-Fluoropyrimidine Derivatives in Pneumococcus (Journal of Bacteriology, Vol. 106, No. 2, (1971), 412 - 420)

Biswas T., Yi L., Aggarwal P., Wu J., Rubin J. R., Stuckey J. A., Woodard R. W. and Tsodikov O. V. - The Tail of KdsC conformational changes control the activity of a haloacid dehalogenase superfamily phosphatase (Journal of Biological chemistry, Vol. 284, No. 44, (2009), 30594 - 30603)

Burroughs A. M., Allen K. N., Dunaway-Mariano D., Aravind L. - Evolutionary genomic of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes (J Mol Biol, Vol. 361(5), (2006), 1003 - 1034)

Cohen S. S., Flaks J. G., Barner H. D., Loeb M.R. & Lichtenstein J. - The Mode of Action of 5-Fluorouracil and Its Derivatives (Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 44, (1958), 1004 - 1012)

De Jong R. M. and Dijkstra B. W. - Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen (Current Opinion in Structural biology, Vol. 13, (2003), 722 - 730)

Eberhardt A., Wu L. J., Errington J., Vollner W. and Veening J. W. - Cellular localization of choline-utilization proteins in Streptococcus pneumoniae using novel fluorescent report system (Molecular Microbiology, Vol. 74(2), (2009), 395 - 408)

Egger L. A., Park H. and Inouye M. - Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay (Genes Cell., Vol. 2, (1997), 167 - 184)

Felts R. L., Reilly T. J., Tanner J. J. - Structure of recombinant *Haemophilus influenzae* e (P4) acid phosphatase reveals a new member of the haloacid dehalogenase superfamily (Biochemistry, Vol. 46(39), (2007), 11110 - 11119)

Galperin M. Y., Moroz O. V., Wilson K. S., Murzin A. G. - House cleaning, a part of good housekeeping (Molecular Microbiology, Vol. 59(1), (2006), 5 - 19)

Garnak M. and Reeves H. C. - Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* (SCIENCE, Vol. 203 (1978), 1111 - 1112)

Gillepsie S.H. and Balakrishnan I. - Pathogenesis of pneumococcal infection (J. Med. Microbiol., Vol. 49, (2000), 1057 - 1067)

Guiral S., Hénard V., Laaberki M.-H., Granadel Ch., Prudhomme M., Martin B., Claverys J.-P. - Construction and evaluation of a chromosomal expression platform (CEP) for ectopic, maltose-driven gene expression in *Streptococcus pneumoniae* (Microbiology, Vol. 152, (2006), 343 - 349)

Hamilton M. D., Nuara A A., Gammon D. B., Buller R. M., Evans D.H. - Duplex strand joining reactions catalyzed by vaccinia virus DNA polymerase (Nucleic Acid Research, Vol. 35 (2007), 143 - 151)

Hanks S. K., Quinn A. M. and Hunter T. - The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains (Science, Vol. 241 (1988), 42 - 52)

Hartmann K-U. and Heidelberger Ch. - Studies on Fluorinated Pyrimidines (Journal of Biological chemistry, Vol. 236, No. 11, (1961), 3006 - 3009)

Herrick D. J., Major P. P. & Kufe D. W. - Effect of methotrexate on incorporation and excision of 5-fluorouracil residues in human breast carcinoma DNA (Cancer Res, Vol. 42, (1982), 5015-5017)

Havlík J. - Význam očkování proti pneumokokům (Klinická mikrobiologie infekčního lékařství, Vol. 14(1), (2008), 30 - 35)

Hisano T., Hata Y., Fujji T., Liu J. Q., Kurihara T., Esaki N. and Soda K. - Crystal Structure of L-2-Haloacid Dehalogenase from *Pseudomonas sp.* YL (Journal of Biological chemistry, Vol. 271, No. 34, (1996), 203222 - 20330)

Hoskins J., Alborn W. E., W.E. Jr., Arnold J., Blaszczyk 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., Lu J., Matsushima P., McAhren S. M., McHenney M., Mc Leaster K., Mundy C. W., Nicas T. I., Norris F. H., O'Gara M., Peery R. B., Robertson G. T., Rockey P., Sun P. M., Winkler M. E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C. A., Baltz R. H., Jaskunas S. R., Rosteck P. R. Jr., Skatrud P. L., Glass J. I. - Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* R6 (J. Bacteriol., Vol. 183(19), (2001), 5709 - 5717)

Inoue H., Nojima H., Okayama H. - High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids (Gene, Vol. 96, (1990), 23 - 28)

Iwasaki W. and Miki K. - Crystal Structure of the Stationary Phase Survival Protein SerE with Metal Ion and AMP (J. Mol. Biol., Vol. 371, (2007), 123 - 136)

Jong R. M. and Dijkstra B. W. - Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond (Current Opinion in Structural Biology, Vol. 13, (2003), 722 - 730)

Kadioglu A., Weiser J. N., Paton J. C. and Andrew P.W. - The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease (NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY, Vol. 6, (2006), 288 - 301)

Kufe D. W. & Major P. P. - 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity (J Biol Chem, Vol. 256, (1981), 9802 - 9805)

Kurihara T., Esaki N. - Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: Occurrences, reaction mechanisms, and applications (The Chemical Record, Vol. 8, (2008), 67 - 74)

Kuznetsova E., Proudfoot M., Gonzales C. F., Brown G., Omelchenko M. V., Borozan I., Carmel L., Wolf Y. I., Mori H., Savchenko A. V., Arrowsmith Ch. H., Koonin E.V., Edwards A. M., Yakunin A. F. - Genome-wide Analysis of Substrate Specificities of the *Escherichia coli* Haloacid Dehalogenase-like Phosphatase Family. (Journal of Biological Chemistry, Vol. 281, No. 47, (2006), 36149 - 36161)

Lahiri S. D., Zhang G., Dai J., Dunaway-Marino D. and Allen K. N. - Analysis of the Substrate Specificity Loop of the HAD superfamily Cap Domain (Biochemistry, Vol. 43, (2004), 2812 - 2820)

Lanie J. A., Ng W. L., Kazmierczak K. M., Andrzejewski T. M., Davidsen T. M., Wayne K. J., Tettelin H., Glass J. I. and Winkler M. E. - Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6 (J. Bacteriol., Vol. 189(1), (2007), 38 - 51)

Lee H. S., Cho Y., Kim Y. J., Lho T. O., Cha S. S., Lee J. H., Kang S. G. - A novel inorganicpyrophosphatase in *Thermococcus onnurineus* NA1 (FEEMS Microbiol Lett Vol. 300(1), (2009), 68 - 74)

Lovečková Y., Kolář M., Retinger J., Smolka V., Widermann J.- Význam *Streptococcus pneumoniae* v patogenezi dětských bakteriálních infekcí (Pediatrie pro praxi, Vol. 1., (2002), 22 - 26)

Major P. P., Egan E., Herrick D. & Kufe D. W. - 5-Fluorouracil incorporation in DNA of human breast carcinoma cells (Cancer Res, Vol. 42, (1982), 3005 – 3009)

Makde R. D., Gupta G. D., Mahajan S. K., Kumar V. - Structural and mutational analyses reveal the functional role of active-site Lys-154 and Asp-173 of *Salmonella typhimurium* AphA protein (Arch Biochem Biophys, Vol. 464, (2007), 70 - 79)

Morona J. K., Morona R. and Paton J. C. - Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease (Proc Natl Acad Sci USA, Vol. May 30; 103(22) (2006), 8505 - 8510)

Morona J. K., Morona R., Miller D. C. and Paton J. C. - Mutation Analysis of the Carboxy-Terminal (YGX)₄ Repeat Domain of CpsD, an Autophosphorylating Tyrosine Kinase Required for Capsule Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* (JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 185, (2003), 3009 - 3019)

Nakamura T., Meshitsuka S., Kitagawa S., Abe N., Yamada J., Ishino T., Nakano H., Tsuzuki T., Doi T., Kobayashi Y., Fujii S., Sekiguchi M. and Yamagata Y. - Structural and Dynamic Features of the MutT Protein in the Recognition of Nucleotides with the Mutagenic 8-Oxoguanin Base (The Journal of Biological chemistry, Vol. 285, No.1, (2010), 444 - 452)

Nováková L., Sasková L., Pallová P., Janeček J., Novotná J., Ulrych A., Echenique J., Trombe M. C., Branny P. - Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates (FEBS J., Vol. 272(5), 2005, 1243-54)

O'Donovan G. A. & Neuhard J. - Pyrimidin metabolism v mikroorganismech (Bacteriol Rev, Vol. 34, (1970), 278 - 343)

Pallová P., Hercík K., Sasková L., Nováková L., Branny P. - A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo (Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 355 (2), (2007), 526 - 530)

Parsons J. F., Lim K., Tempczyk A., Krajewski W., Eisenstein E., Herzberg O. - From structure to function: YrbI from *Haemophilus influenzae* (HI1679) is a phosphatase (Proteins, Vol. 46(4), (2002), 393 - 404)

Pérez J., Castaneda-García A., Jenke-Kodama H., Müller R. and Munoz-Dorado J. - Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome (Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 105(41), (2008), 15950–15955)

Proudfoot M., Kuznetsova E., Brown G., Rao N. N., Kitagawa M., Mori H., Savchenko A., Yakunin A. F. - General Enzymatic Screens Identify Three New Nucleotidases in *Escherichia coli*. (Journal of Bacteriology, Vol. 279, No. 52, (2004), 54687 - 54694)

Richards L., M. Ferreira D., Miyaji E. N., Andrew P. W. and Kadioglu A. - The immunising effect of pneumococcal nasopharyngeal colonisation; protection against future colonisation and fatal invasive disease (J. Imbio., Vol. 215, (2009), 251 - 263)

Roberts A., Lee S. Y., McCullagh E., Silversmith R. E., Wemmer D. E. - YbiV from *Escherichia coli* K12 is a HAD phosphatase (Proteins, Vol. 58(1), (2005), 790 - 801)

Rye C. A., Isupov M. N., Lebedev A. A., Littlechild J. A. - Biochemical and structural studies of a L-haloacid dehalogenase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* (Extremophiles, Vol. 13(1), (2009), 179 - 190)

Santi D. V., McHenry C. S. & Sommer H. - Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate (Biochemistry, Vol.13, (1974), 471 – 481)

Sasková L., Nováková L., Basler M., Branny P. - Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae* (J. Bacteriol, Vol. 189(11), (2007), 4168 - 4179)

Schmidberger J. W., Wilce J. A., Tsang J. S., Wilce M. C. - Crystal structure of the substrate free-enzyme, and reaction intermediate of the HAD superfamily member, haloacid dehalogenase DehIV a from *Burkholderia cepacia* MBA4 (j Mol Biol, Vol. 368(3), (2007), 706 - 717)

Schmidberger J. W., Wilce J. A., Weightman A. J., Wilce M. C. - Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of DehI, a group I alpha-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain PP3 (Acta Crstallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, Vol. 64(7), (2008), 596 - 598)

Singh S. K., Yang K., Karthikeyan S., Huynh T., Zhang X., Phillips M. A., Zhang H. - The thrH gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is a dual activity enzyme with a novel

phosphoserine:homoserine phosphotransferase activity (J Biol Chem, Vol. 279(13), (2003), 13166 - 13173)

Smith P. K., Krohn R. I., Hermason G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and Klenk D. C. - Measurement of protein using bicinchonic acid (Anal. Biochem., Vol. 150, (1985), 76 - 85)

Suzuki T., Yamamoto K., Harashima H., Kamiya H. - Base excision repair system suppresses mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP in *Escherichia coli* (Nucleic Acids Symposium, Vol. 51., (2007), 51 -52)

Titz B., Häuser R., Engelbrecht A., Uetz P. - The *Escherichia coli* protein YjjG is a house - cleaning nucleotidase in vivo (FEMS, Vol. 270, (2007), 49 - 57)

Tribble G. D., Mao S., James C. E., Lamont R. J. - A *Porphyromonas gingivalis* haloacid dehalogenase family phosphatase interacts with human phosphoproteins and is important for invasion (Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 103(29), (2006), 11027 - 11032)

Wang J.Y.J. and Koshland D.E.Jr - Evidence protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium* (Journal Biochem., Vol. 253, (1973), 7605 - 7608)

Weng L., Biswas I., Morrison D. A. - A self-deleting Cre-lox-ermAM cassette, Cheshire, for marker-less gene deletion in *Streptococcus pneumoniae* (Journal of Microbiological Methods, Vol. 79, (2009), 353 - 357)

Weiss B. - The Deoxycytidine Pathway for Thymidylate Synthesis in *Escherichia coli* (JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 189, No. 21, (2007), 7922 - 7926)

Weiss B. - YjjG, a dUMP Phosphatase, Is Critical for Thymine Utilization by *Escherichia coli* K-12. (Journal of Bacteriology, Vol. 189, No. 5, (2007), 2186 - 2189)

Wilkinson D. S. & Crumley J. - Metabolism of 5-fluorouracil in sensitive and resistant Novikoff hepatoma cells (J Biol Chem, Vol. 252, (1977), 1051–1056)

Yamamoto H., Takio K., Sugahara M., Kunishima N. - Structure of a haloacid dehalogenase superfamily phosphatase PH1421 from *Pyrococcus horikoshii* OT3:oligomeric state and thermoadaptation mechanism (Acta Crystallographica, Vol. D64, (2008), 1068 - 1077)

Zimmerman M. D., Proudfoot M., Yakunin A. and Minor W. - Structural insight into the mechanism of substrate specificity and catalytic activity of an HD domain phosphohydrolase: the 5'-deoxyribonuclease YfbR from *Escherichia coli* (J Mol Biol, Vol. 378(1), (2008), 215 - 226)

PŘÍLOHY

Příloha číslo 1. :

Seznam bakterií u kterých byl objeven obdobný protein jako YjjG - Spr1057:

(<http://www.uniprot.org/uniprot/>)

Escherichia coli

Escherichia albertii

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus suis

Streptococcus gordonii

Streptococcus thermophilus

Streptococcus pyogenes

Streptococcus faecalis

Enterobacter sakazakii

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus

Staphylococcus haemolyticus

Staphylococcus saprophyticus

Haemophilus ducreyi

Bacillus thuringiensis

Bacillus weihenstephanensis

Bacillus cereus

Bacillus subtilis

Bacteroides thetaiotaomicron

Bacteroides fragilis

Bacteroides gingivalis

Salmonella arizonae

Salmonella paratyphi A

Salmonella choleraesuis

Salmonella typhimurium

Shigella boydii
Shigella sonnei
Shigella dysenteriae
Yersinia enterocolitica
Yersinia pestis
Yersinia pseudotuberculosis
Clostridium botulinum
Clostridium perfringens
Clostridium difficile
Leuconostoc citreum
Lactobacillus gasseri
Lactobacillus brevis
Lactobacillus casei
Lactobacillus delbrueckii
Lactobacillus salivarius
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus johnsonii
Lactobacillus sakei
Lactococcus lactis
Vibrio cholerae
Vibrio vulnificus
Vibrio parahaemolyticus
Vibrio splendidus
Vibrio fischeri
Bdellovibrio bacteriovorus
Shewanella frigidimarina
Shewanella amazonensis
Shewanella oneidensis
Shewanella sp.
Shewanella denitrificans
Shewanella loihica
Pediococcus pentosaceus
Flavobacterium psychrophilum

Gramella forsetii

Pseudoalteromonas haloplanktis

Erwinia carotovora

Pasteurella multocida

Aeromonas salmonicida

Aeromonas hydrophila

Kordia algicida atd.

Příloha číslo 2. :

Geny jejichž exprese byla v mutantě *ΔstkP* sníženy:

Kategorie	Název lokusu	Produkt (název genu)	Poměrná exprese*
Buněčná stěna			
	spr0096	Hypothetical protein, LysM domain protein	-11,01
	spr0867	Endo-beta-N-acetylglucosaminidase (lytB)	-4,78
	spr2021	General stress protein PcsB (pcsB)	-9,47
Metabolismus glycerolu			
	spr1344	Glycerol uptake facilitator protein paralog (glpF)	-2,08
	spr1990	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation (glpD)	-2,01
	spr1991	Glycerol kinase (glpK)	-2,58
Pyrimidinový metabolismus			
	spr0613	Orotidine-5'-decarboxylase (pyrF)	-2,90
	spr0614	Orotate phosphoribosyltransferase (pyrE)	-2,92
	spr0865	Dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit (pyrDII)	-4,19
	spr0866	Dihydroorotate dehydrogenase (pyrD)	-5,21
	spr1053	Dihydroorotase (pyrC)	-2,83
	spr1153	Carbamoylphosphate synthase (ammonia), heavy subunit (carB)	-2,69
	spr1154	Carbamoylphosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) light subunit (carA)	-2,41
	spr1155	Aspartate carbamoyltransferase (<i>pyrB</i>)	-2,47
	spr1156	Transcriptional attenuation of the pyrimidine operon/uracil phosphoribosyltransferase activity (pyrR)	-2,80
	spr1165	Uracil permease (pyrP)	-3,83
Oprava DNA			
	spr1054	8-oxo-dGTP nucleoside triphosphatase (mutX)	-3,88
	spr1055	DNA-uracil glycosylase (ung)	-4,08
	spr1317	O6-methylguanine-DNA methyltransferase (ogt)	-2,02
	spr1660	Exodeoxyribonuclease (exoA)	-2,30
Příjem železa			
	spr0934	ABC transporter substrate binding protein-iron transport	-2,23
	spr1684	ABC transporter membrane-spanning permease-ferric iron transport (fatD)	-2,10
	spr1685	ABC transporter membrane-spanning permease-ferric iron	-2,85

		transport (fatC)	
	spr1686	ABC transporter ATP binding protein-ferric iron transport (fecE)	-3,17
	spr1687	ABC transporter substrate binding protein-ferric iron transport (fatB)	-4,70
Oxidativní stres			
	spr1321	Conserved hypothetical protein, similar to amidotransferase, SNO family	-2,38
	spr1322	Pyridoxine biosynthesis protein (pdx1)	-2,14
	spr1495	Thioredoxin-linked thiol peroxidase (psaD)	-2,21
Ostatní			
	spr0551	Branched-chain amino acid transport system carrier protein (brnQ)	-2,31
	spr1047	Lipoate protein ligase A (lplA)	-2,02
	spr1048	Dihydrolipoamide dehydrogenase (acoL)	-2,14
	spr1577	Eukaryotic-type serine/threonine kinase (stkP)	-22,04
	spr1657	ABC transporter ATP binding/membrane spanning protein	-2,01
Hypotetické geny			
	spr0084	Conserved hypothetical protein, rhodanese-like protein	-3,24
	spr0552	Conserved hypothetical protein, M42 glutamyl aminopeptidase homologue	-2,34
	spr0652	Conserved hypothetical protein, degV family	-4,61
	spr0709	Hypothetical protein	-2,20
	spr0755	Conserved hypothetical protein, putative lipoprotein precursor	-2,06
	spr1052	Conserved hypothetical protein, MATE efflux protein family	-2,12
	spr1056	Hypothetical protein	-8,81
	spr1057	Conserved hypothetical protein, hydrolase HAD-like family	-58,52
	spr1316	Conserved hypothetical protein, similar to arsenate reductase	-2,12
	spr1318	Hypothetical protein, putative acetyltransferase	-2,19
	spr1319	Hypothetical protein	-6,47
	spr1320	Conserved hypothetical protein, similar to hemolysin III	-10,16
	spr1436	Conserved hypothetical protein, methyltransferase-like protein	-2,98
	spr1498	Conserved hypothetical protein, putative large secreted protein	-2,05
	spr1790	Conserved hypothetical protein, related to sporulation protein, SpoIIIJ	-2,26

* Poměrná exprese vyjadřuje poměr transkripce genu v *ΔstkP* mutantním kmenu vztaženo k divokému kmenu *S. pneumoniae* (záporná hodnota znamená pokles exprese genu u mutantu vzhledem k divokému kmenu) (SASKOVÁ et al., 2007).

Geny jejichž exprese byla v mutantě *ΔstkP* zvýšena:

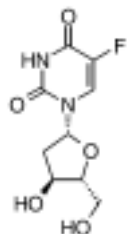
Kategorie	Název lokusu	Produkt (název genu)	Poměrná exprese*
Časné kompetenční geny			
	spr0020	Competence protein (comW)	7,18
	spr0043	Transport ATP binding protein ComA (comA)	9,65
	spr0044	Transport protein ComB (comB)	31,73
	spr2041	Response regulator (comE)	34,76
	spr2042	Histidine protein kinase (comD)	37,81
	spr2043	Competence stimulating peptide precursor (comC)	9,76
	spr0013/1819	Competence-specific global transcription modulator (comX/comX2)	18,59
Pozdní kompetenční geny			
	spr0857	Competence protein (celB)	2,62
	spr1144	DNA processing Smf protein (smf)	2,75
	spr1724	Single-stranded DNA binding protein (ssbB)	3,27
	spr1758	Competence induced protein A (cinA)	2,26
	spr1861	Competence protein (cglD)	2,54
	spr1863	Competence protein (cglB)	8,02
	spr1864	Competence protein (cglA)	7,57
CSP indukované geny			
produkce bakteriocinů	spr0472	BlpY protein (blpY)	2,83
	spr0473	Hypothetical protein (blpZ)	2,36
	spr0474	ABC transporter ATP binding protein (pncP)	2,10
	spr1561	ABC transporter membrane-spanning permease-Na export (natB)	3,69
	spr1562	ABC transporter ATP binding protein-Na export (natA)	4,30
purinový metabolismus	spr0021	Adenylosuccinate synthetase (purA)	4,31
	spr0053	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit (purE)	2,75
	spr0054	Phosphoribosyl glucinamide formyltransferase (purK)	2,52
	spr1109	Formate-tetrahydrofolate ligase (fhs)	2,10
	spr1128	GMP reductase (guaC)	2,01

hypotetické geny	spr0128	Hypothetical protein	3,36
	spr1407	Hypothetical protein	3,16
	spr1760	Conserved hypothetical protein	2,18
	spr1761	Conserved hypothetical protein	2,27
	spr1857	Hypothetical protein	2,67
	spr1858	Hypothetical protein	3,30
	spr1859	Conserved hypothetical protein	5,50
Riboflavinový metabolismus			
	spr0161	Riboflavin synthase beta chain (ribE)	2,12
	spr0162	Riboflavin biosynthesis; GTP-cyclohydrolase II (ribA)	3,03
	spr0164	Riboflavin biosynthesis; a deaminase (ribD)	2,89
	spr1017	Macrolide efflux protein (mreA)	6,64
Ostatní			
	spr0059	Beta-galactosidase 3 (bgaC)	2,01
	spr0060	Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component	2,58
	spr0561	Cell wall-associated serine proteinase precursor PrtA (prtA)	2,23
	spr1324	Thiamine biosynthesis lipoprotein (apbE)	2,25
	spr1408	Formylmethionine deformylase (def)	3,69
	spr1935	Dihydroxyacid dehydratase (ilvD)	3,31
	spr1945	Choline binding protein (pcpA)	2,77
Hypotetické geny			
	spr1482	Hypothetical protein	2,33
	spr1623	Hypothetical protein	3,52
	spr1624	Conserved hypothetical protein	3,75
	spr1625	Conserved hypothetical protein	3,37
	spr1626	Hypothetical protein	2,87
	spr1768	Conserved hypothetical protein, related to Trp repressor binding protein	2,15

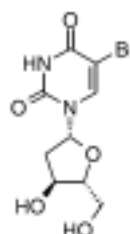
* Poměrná exprese vyjadřuje poměr transkripce genu v Δ stkP mutantním kmenu vztaženo k divokému kmenu *S. pneumoniae* (kladná hodnota znamená nárůst exprese genu u mutantu vzhledem k divokému kmenu) (SASKOVÁ et al., 2007).

Příloha číslo 3. :

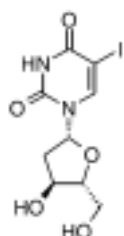
Příklady modifikovaných nukleobasí:



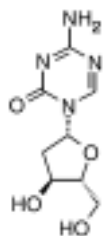
5-flouro-2'-deoxyuridin (5-FUdR)



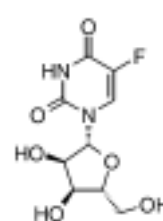
5- bromo-2' deoxyuridin (5-BrdU)



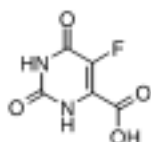
5-iodo-2'-deoxyuridin



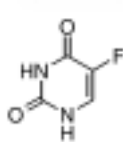
5-aza-2'-deoxycytidin



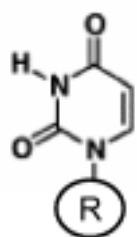
5-fluorouridin



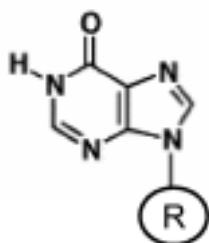
5-fluoro-orotová kyselina



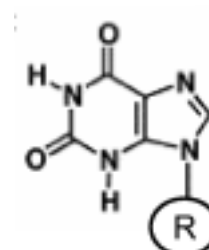
5-fluorouracil



dUTP



dITP



dXTP

