

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu
Streptococcus pneumoniae a charakterizace jejího
substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM**

Mgr. Petra Pallová

Praha 2007

Tato dizertační práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři buněčné signalizace pod odborným vedením RNDr. Pavla Brannyho, CSc. v období říjen 2003 - červen 2007.

Práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt číslo 204/02/1423), Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty číslo 188/2004/B-BIO/PřF a 153/2006/B/BIO/PřF), evropského programu Socrates/Erasmus a nadace Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových, která poskytla finanční příspěvek na dopravu na univerzitu Paris-Sud.

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně a použila jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Dále prohlašuji, že předložená práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného titulu.

V Praze, červen 2007

.....

Mgr. Petra Pallová

Za odborné vedení práce bych chtěla poděkovat svému školiteli Pavlu Brannymu. Ále, Alešovi, Ďurovi, Honzovi, Janči, Míše, Lence, Lindě, Petrovi a Zuzce, kolegům z laboratoře, chci poděkovat za jejich kamarádství, rady a podporu během celého našeho společného laboratorního soužití. Za podnětné dotazy bych ráda poděkovala Jiřímu Janečkovi.

Dále bych chtěla poděkovat Dr. Dominique Mengin-Lecreulx a Dr. Mireille Hérve z univerzity Paris-Sud za rady a pomoc při studiu fosfoglukosaminmutasy během studijního pobytu v jejich laboratoři. Dr. Mario L. Calcagno děkuji za poskytnutí enzymu glukosamin-6-fosfátdeaminasy NagB.

Tomáši Cajthamlovi děkuji za zapůjčení kapalinového chromatografu.

Jiřímu Adamcovi z Purdue University děkuji za identifikaci míst fosforylace GlmM pomocí hmotnostní spektrometrie.

RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. děkuji za zhotovení 3-D modelu fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*.

Své rodině a Michalovi děkuji za jejich lásku, podporu a zejména shovívavost při dokončování práce.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
1 ÚVOD.....	7
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8
2.1 <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	8
2.1.1 <i>S. pneumoniae a historie mikrobiologie</i>	8
2.1.2 <i>Morfologie, fyziologie a genetika S. pneumoniae</i>	8
2.1.3 <i>Patogenita S. pneumoniae</i>	9
2.1.4 <i>Virulenční faktory S. pneumoniae</i>	10
2.1.5 <i>Regulace exprese virulenčních faktorů</i>	13
2.1.6 <i>S. pneumoniae a přirozená kompetence</i>	13
2.1.7 <i>Regulace kompetence</i>	14
2.1.8 <i>S. pneumoniae a rekombinace</i>	16
2.2 FOSFORYLACE PROTEINŮ-ZÁKLADNÍ MECHANIZMUS PŘENOSU SIGNÁLŮ	18
2.2.1 <i>Eukaryotní proteinkinasy</i>	18
2.2.2 <i>Prokaryotní proteinkinasy</i>	19
2.3 RODINA α -D-FOSFOHEXOMUTAS	28
2.3.1 <i>Reakční mechanismus enzymů α-D-fosfohexomutasové rodiny</i>	28
2.3.2 <i>Struktura zástupců α-D-fosfohexomutasové rodiny</i>	29
2.3.3 <i>Fylogenetická analýza α-D-fosfohexomutasové rodiny</i>	31
2.3.4 <i>Fosfoglukosaminmutasa GlmM</i>	32
3 CÍLE PRÁCE	36
3.1 PROTEINKINASA STKP	36
3.2 FOSFOGLUKOSAMINMUTASA GLMM	36
4 MATERIÁL A METODY	37
4.1 MATERIÁL	37
4.1.1 <i>Bakteriální kmeny</i>	37
4.1.2 <i>Vektory</i>	38
4.1.3 <i>Bakteriofágy</i>	38
4.1.4 <i>Kultivační půdy</i>	38
4.1.5 <i>Chemikálie</i>	39
4.1.6 <i>Radiochemikálie</i>	41
4.1.7 <i>Enzymy pro testy aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM</i>	41
4.1.8 <i>Enzymy modifikující DNA</i>	42
4.1.9 <i>Enzymy modifikující RNA</i>	42
4.1.10 <i>Enzymy modifikující proteiny</i>	42
4.1.11 <i>Oligonukleotidy</i>	42
4.1.12 <i>Protilátky</i>	43
4.1.13 <i>Komerční soupravy</i>	43
4.1.14 <i>DNA standardy</i>	44
4.1.15 <i>Proteinové standardy</i>	44
4.1.16 <i>Software</i>	44
4.2 METODIKA	45
4.2.1 <i>Kultivace mikroorganismů</i>	45
4.2.2 <i>DNA manipulace</i>	45
4.2.3 <i>Manipulace s RNA</i>	50
4.2.4 <i>Manipulace s proteiny</i>	51
4.2.5 <i>Enzymatické reakce</i>	56

5	VÝSLEDKY	59
5.1	DIMERIZACE SER/THR PROTEINKINASY STKP	59
5.1.1	<i>Proteinkinasa StkP</i>	59
5.1.2	<i>Příprava epitopem značené membránově ukotvené kinázové domény proteinkinasy StkP</i> ..	61
5.1.3	<i>Homodimerizace proteinkinasy StkP</i>	66
5.1.4	<i>Nativní elektroforéza (Blue native)</i>	68
5.2	CHARAKTERIZACE FOSFOGLUKOSAMINMUTASY <i>S. PNEUMONIAE</i>	71
5.2.1	<i>Fosfoglukosaminmutasa GlmM jako substrát proteinkinasy StkP</i>	71
5.2.2	<i>Ověření fosfoglukosaminmutasy GlmM jako substrátu proteinkinasy StkP v buněčných lyzátech S. pneumoniae</i>	72
5.2.3	<i>Příprava rekombinantního proteinu GlmM</i>	72
5.2.4	<i>In vitro kinázová reakce s rekombinantními proteiny</i>	74
5.2.5	<i>Cílená mutagenese fosfoglukosaminmutasy GlmM S. pneumoniae</i>	75
5.2.6	<i>Štěpení fosfoglukosaminmutasy thrombinem</i>	76
5.2.7	<i>Identifikace míst fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM</i>	77
5.2.8	<i>Příprava proteinu se záměnou serinu v pozici 99 za alanin</i>	79
5.2.9	<i>Komplementace podmíněně letálního kmene E. coli GPM83 fosfoglukosaminmutasou GlmM S. pneumoniae</i>	80
5.2.10	<i>UDP-N-acetylglukosaminpyrofosforylasa GlmU</i>	81
5.2.11	<i>Testování fosfoglukosaminmutázové aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích mutantních forem</i>	83
5.2.12	<i>Testování fosfoglukomutázové aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích mutantních forem</i>	88
5.2.13	<i>Testování fosfomannomutázové aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích mutantních forem</i>	88
5.2.14	<i>Srovnání enzymatických aktivit fosfoglukosaminmutas GlmM E. coli, P. aeruginosa a S. pneumoniae</i>	89
5.2.15	<i>Analýza složení buněčné stěny kmene S. pneumoniae Cp1015 a delečního mutantu ΔstkP</i> ..	90
5.2.16	<i>Simulace 3-D struktury fosfoglukosaminmutasy GlmM S. pneumoniae</i>	92
6	DISKUZE	93
6.1	SER/THR PROTEINKINASA STKP FUNGUJE <i>IN VIVO</i> VE FORMĚ DIMERU	93
6.2	CHARAKTERIZACE FOSFOGLUKOSAMINMUTASY <i>S. PNEUMONIAE</i>	95
7	ZÁVĚR	104
7.1	PROTEINKINASA STKP	104
7.2	FOSFOGLUKOSAMINMUTASA GLMM	104
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	107

Seznam použitých zkratek

A ₃₄₀	absorbance při vlnové délce 340 nm
A ₄₀₀	absorbance při vlnové délce 400 nm
A ₆₀₀	absorbance při vlnové délce 600 nm
ABC	ATP binding cassette
ACN	acetonitril
AGM	acetylglukosaminfosfátmutasa
Amp	ampicilin
ATP	adenosin-5'-trifosfát
bp	páry bází
Cm	chloramfenikol
CSP	competence stimulating peptid
dpm	disintegrations per minute
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidy
EI, EII, EIII	enzymy účastnící se translokace sacharidů
ESI	ionizace elektrosprejem
ET	evolutionary trace
FHA	forkhead associated
GST	glutathion-S-transferasa
HPr	histidine containing protein
ID	inzerce-duplikace
IDH	isocitrátdehydrogenasa
IgG	imunoglobulin G
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
Kan	kanamycin
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LPS	lipopolysacharid
Mb	megabáze
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
nt	nukleotid
PBP	penicillin-binding protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEP	fosfoenolpyruvát
pfu	plaque forming unit
PGM	fosfoglukomutasa, fosfoglukomutázová aktivita
PGN	fosfoglukosaminmutasa, fosfoglukosaminmutázová aktivita
PMM	fosfomannomutázová aktivita
PMM/PGM	fosfomannomutasa/fosfoglukomutasa
PTS	fosfotransferázový systém
Rif	rifampicin
RT	reverzní transkripce
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s SDS
Ser	serin
TCS	two-component system
Tet	tetracyklin
TFA	trifluoroctová kyselina
Thr	threonin
Tn551	transpozón 551
Tyr	tyrosin
UDP	uridindifosfát
WT	divoký kmen
Yops	<i>Yersinia</i> outer-membrane proteins

1 Úvod

Bakteriální buňka v přirozeném prostředí musí čelit náhlým změnám koncentrace živin, pH, teploty, osmolarity a vlhkosti. Bakterie vyvinuly během evoluce řadu mechanismů, které jim umožňují tyto změny prostředí monitorovat a reagovat na ně.

Proteiny, které jsou jednou z hlavních složek buňky, plní jednak funkci stavební, jednak funkci katalytickou. Účastní se katalýzy chemických reakcí, ale také přenosu signálu v buňce. Jedním z nejdůležitějších mechanismů přenosu signálu je fosforylace proteinů prostřednictvím enzymů proteinkinasy. Současné studie a analýzy bakteriálních genomů prokázaly přítomnost Ser/Thr a Tyr proteinkinasy eukaryotního typu u celé řady prokaryotních organismů. Především se uplatňují v procesech spojených s regulací růstu, odpovědí na stresové podmínky a v patogenezi, což je jen potvrzením univerzality tohoto mechanismu.

Identifikace proteinů, které jsou signálů Ser/Thr a Tyr proteinkinasy ovlivňovány, a které jsou přímo substrátem daného signalizačního proteinu, skýtá možnost tyto signalizační dráhy blokovat a danou bakterii tak oslabit. Přestože Ser/Thr proteinkinasy jsou mezi bakteriemi široce rozšířené, dostupných informací o jejich substrátech je stále málo.

Předkládaná dizertační práce se zabývá studiem Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu patogenní bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Na rozdíl od mnoha jiných bakteriálních organismů, v genomu *S. pneumoniae* se vyskytuje pouze jeden gen kódující Ser/Thr proteinkinasy StkP, a ve stejném operonu také pouze jeden gen pro Ser/Thr proteinfosfátasu PhpP. Z tohoto hlediska je *S. pneumoniae* ideálním modelem studia signalizace eukaryotního typu u bakterií.

Práce navazuje a prohlubuje výsledky, které byly součástí diplomové práce autorky (Pallová, 2003). Předmětem zájmu bylo zejména studium aktivity zkrácených forem proteinu, s cílem objasnit mechanismus aktivace. V druhé části se práce zabývá charakterizací substrátu proteinkinasy StkP, enzymu fosfoglukosaminmutasy, který je nepostradatelný pro biosyntézu bakteriální buněčné stěny.

2 Literární přehled

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, extracelulární lidský patogen, patří do skupiny grampozitivních katalasa negativních koků. V nevirulentní neopouzdržené formě běžně kolonizuje sliznici horních cest dýchacích a je součástí normální mikroflóry. Virulentní opouzdržené formy způsobují běžná onemocnění jako záněty středního ucha, nosohltanu a nosních dutin, ale také závažné choroby jako pneumonie, meningitidy a sepse. Infekce jsou převážně endogenní a nastupují sekundárně po infekci způsobené jiným patogenem. Ohroženy jsou zejména malé děti, starší lidé, asplenici a imunosuprimovaní pacienti. Spolu s *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis* patří *S. pneumoniae* mezi tři nejdůležitější bakteriální patogeny dětí. Horizontální přenos mezi jednotlivými kmeny streptokoků vede k nárůstu kmenů rezistentních nejen k antibiotikům penicilinovým, ale také k vankomycinu, antibiotiku poslední volby (Novak *et al.*, 1999).

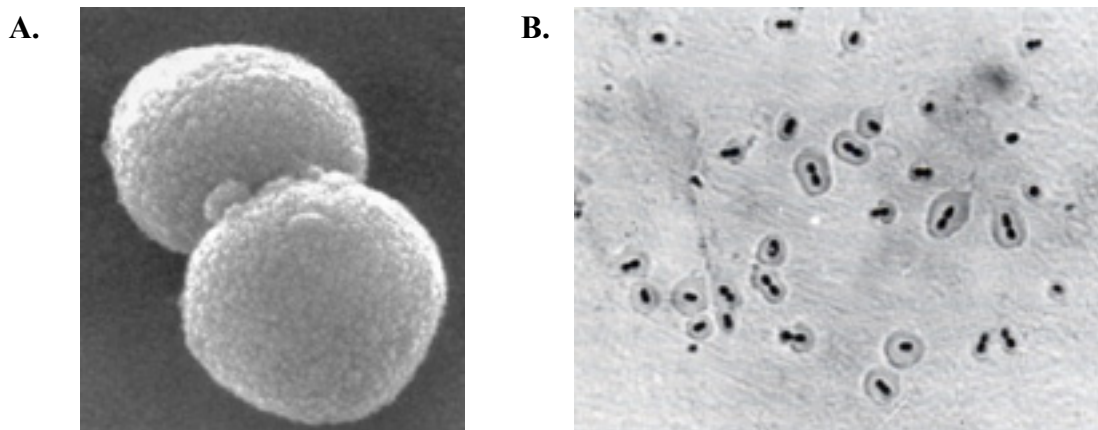
2.1.1 *S. pneumoniae* a historie mikrobiologie

Jednou z nejznámějších vlastností *S. pneumoniae* je vysoká schopnost přirozené transformace.

Schopnost transformace u *S. pneumoniae* objevil Fred Griffith v roce 1928. Izoloval mutantní kmeny *S. pneumoniae*, které neměly pouzdro a nebyly schopny způsobit onemocnění. Tyto mutantní kmeny rostly ve formě drsných kolonií (R fáze, rough-drsný). Původní kmeny tvořily hladké kolonie (S fáze, smooth-hladký). Zjistil, že když infikuje myši směsí avirulentních neopouzdržených (R) a usmrčených virulentních opouzdržených (S) pneumokoků, dojde k infekci a z mrtvé myši jsou pak izolovány bakterie typu S. Teprve v roce 1944 Avery a kol. přinesli vysvětlení molekulární podstaty tohoto děje a prokázali, že nositelem genetické informace je DNA.

2.1.2 Morfologie, fyziologie a genetika *S. pneumoniae*

S. pneumoniae se vyskytuje převážně ve dvojicích grampozitivních koků protáhlého lancetovitého tvaru s kratšími osami paralelně (Obr. 2.1). Pokud je vytvořeno pouzdro obklopuje celou dvojici.



Obr. 2.1: *Streptococcus pneumoniae*. Detailní záběr dvojice *S. pneumoniae* skenovací elektronovým mikroskopem (A). Zvýrazněná pouzdra okolo dvojic *S. pneumoniae* (swelling reaction) (B). Převzato z *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.

Jedná se o bakterii fakultativně anaerobní, růstově poměrně náročnou. Na krevním agaru roste v koloniích obklopených zónou viridace. Neopouzdržené kmeny vyrůstají v drsných koloniích (R fáze), virulentní opouzdržené kmeny vytváří kolonie hladké (S fáze). Polysacharidové pouzdro virulentních kmenů je hlavním virulenčním faktorem a nejvýraznějším antigenem. Podle pouzdrného antigenu rozlišujeme více než 90 sérotypů *S. pneumoniae*. Důležitou složku buněčné stěny tvoří teichoové kyseliny bohaté na galaktosamin a fosfocholin. Cholin je nepostradatelným růstovým faktorem a jeho přítomnost je nezbytná pro činnost autolysinů. Dále se podílí na ukotvení povrchových proteinů.

Genom *S. pneumoniae* je velký 2,1 Mb a dosud jsou známy sekvence tří kmenů, virulentního TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) a D39 (Lanie *et al.*, 2007), a nevirulentního R6 (Hoskins *et al.*, 2001). Sekvence genomů se liší především delecí úseku (7,5 kb) kódujícího geny pro syntézu polysacharidového pouzdra.

2.1.3 Patogenita *S. pneumoniae*

S. pneumoniae je lidský extracelulární patogen, který se šíří aerosolem. Běžně se vyskytuje na sliznici nosohltanu u 5-10% dospělých a 20-40% dětí. Interakci s epitelialními buňkami zajišťují adheziny. Pokud dojde k rozšíření bakterií dále do plic nebo Eustachovy trubice, dojde k rozvoji onemocnění. Infekce jsou převážně endogenní, u respiračních infekcí předcházejí záněty vyvolané viry, chlamydiemi, mykoplazmaty, nebo pokles lokální imunity z jiných příčin, meningitidy jsou většinou sekundární (poúrazové nebo otogenní) (Bednář *et al.*, 1996). Symptomy pneumokokové infekce jsou důsledkem

zánětlivé reakce hostitelského organismu. Zánět je vyvolán přítomností teichoových kyselin a fragmentů peptidoglykanu, které se uvolňují při lyzi buňky. Během lyze buňky také dochází k uvolnění intracelulárních virulenčních faktorů, z nichž nejznámější je pneumolysin.

2.1.4 Virulenční faktory *S. pneumoniae*

Mnoho proteinů či enzymů nacházejících se na povrchu grampozitivních patogenních bakterií patří mezi virulenční faktory. Tyto proteiny se přímo účastní interakce mezi bakteriálním povrchem a hostitelskou tkání.

1) Pouzdro

Hlavním faktorem virulence je pouzdro, které brání fagocytóze. Pouzdro *S. pneumoniae* je tvořeno specifickým pouzderným polysacharidovým antigenem. Je známo více než 90 imunologicky odlišných typů polysacharidů, které se liší mírou virulence. Syntéza pouzdra je pod kontrolou *cps* genů, z nichž tři jsou nepostradatelné. Jedná se o tyrosinovou proteinkinazu CpsD, tyrosinovou proteinfosfatasu CpsB a protein CpsC (Morona *et al.*, 2003). Díky horizontálnímu přenosu DNA může *S. pneumoniae* změnit kapsulární sérotyp a uniknout tak imunitnímu systému hostitelského organismu.

Proti *S. pneumoniae* byla v roce 1983 vyvinuta polyvalentní 23-složková polysacharidová vakcína, která nahradila dříve používanou 14-složkovou vakcínu. Vakcína obsahuje 23 purifikovaných pouzderných polysacharidových antigenů, které reprezentují 85-90% sérotypů způsobujících invazivní infekce. Tato vakcína ovšem nevyvolává dostatečnou imunitní odpověď u nejohroženější skupiny, u novorozenců, kteří mají omezenou protilátkovou odpověď k polysacharidům. Polysacharidová vakcína neindukuje vznik imunitní odpovědi závislé na T-lymfocytech, netvoří se paměťové B-buňky, což vede k omezené době ochrany. Dále byla vyvinuta 7-valentní konjugovaná vakcína, nicméně je používána zejména v USA. Tato vakcína je velmi účinná u malých dětí, její nevýhodou ovšem je malé pokrytí invazivních sérotypů (Bogaert *et al.*, 2004).

Hledání nových antigenů pro výrobu účinnější vakcíny je tudíž stále velkou prioritou mnoha vědeckých skupin. Proteiny, které se nachází na povrchu buněk a účastní se interakce s hostitelskou buňkou, jsou řazeny mezi potenciální vhodné antigeny (Berry a Paton, 2000).

2) PsaA antigen (pneumococcal surface antigen A)

Mezi virulenční faktory *S. pneumoniae* je dále řazen povrchový antigen A kódovaný genem *psaA* patřící mezi ABC transportéry (ATP-binding cassette). Mutace v genu *psaA* vede k ztrátě virulence (Berry a Paton, 1996). Pravděpodobnou funkcí PsaA je transport Mn^{2+} a Zn^{2+} do cytoplazmy bakterie (Dintilhac *et al.*, 1997).

3) Hyaluronátlyasa

Hyaluronátlyasa (Hyl) je jedním z hlavních povrchových proteinů *S. pneumoniae* a produkují ji téměř všechny virulentní kmeny (Berry *et al.*, 1994). Patří do skupiny hyaluronidas, které usnadňují invazivní průnik do tkání hydrolyzou složek extracelulární matrix. Hyaluronátlyasa *S. pneumoniae* rozkládá kyselinu hyaluronovou, hlavní součást extracelulární matrix, a tak se přímo účastní procesu průniku do hostitelské buňky. Mutace nevede ke snížení virulence, ale zvyšuje atenuaci kmene s mutací genu *ply* (Gosink *et al.*, 2000).

4) Neuraminidasa

Neuraminidasa je dalším virulenčním faktorem a je přítomna u všech kmenů pneumokoků (Berry *et al.*, 1996). Enzym odštěpuje koncovou kyselinu sialovou z glykanů (mucin, glykolipidy, glykoproteiny). Změnami glykosylace složek cytoplazmatické membrány hostitelské buňky je zpřístupněna větší část jejího povrchu, a tím je zvýšena pravděpodobnost nalezení receptoru pro interakci *S. pneumoniae* s hostitelskou buňkou (Krivan *et al.*, 1988). *S. pneumoniae* produkuje dvě neuraminidasy, NanA (Cámara *et al.*, 1994) a NanB (Berry *et al.*, 1996), které jsou aktivní za jiných podmínek, což naznačuje, že jsou aktivovány během různých fází infekce (Berry *et al.*, 1996).

5) Pneumolysin

Pneumolysin (Ply) je dalším virulenčním faktorem *S. pneumoniae*. Na rozdíl od ostatních antigenů se pneumolysin nenachází na povrchu buňky, ale v cytoplazmě, a uvolňuje se do hostitelské tkáně v závislosti na činnosti povrchového autolysinu LytA. Enzym je cytotoxický pro epitelální buňky průdušek (Rayner *et al.*, 1995). Interakce pneumolysinu s buňkami alveolárního epitelu a plicního endotelu vede k plicním edémům a hemoragiím. Cytotoxický efekt pneumolysinu inhibuje fagocyty a buňky imunitního systému, což vede ke zpomalení imunitní odpovědi (Rubins a Janoff, 1998). Vlastnosti

pneumolysinu, zejména v časných stádiích infekce, jsou rozhodující pro kolonizaci hostitelské buňky.

Pneumolysin patří do velké skupiny proteinů, které jsou nazývány cholesterol závislé cytolysiny. Všechny proteiny této skupiny jsou virulenčními faktory. Váží se na cholesterol v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky, kde oligomerizují a tvoří v membráně velké póry (Paton *et al.*, 1993, Morgan *et al.*, 1994).

6) Cholin vazebné proteiny

Skupina cholin vazebných proteinů se vyznačuje přítomností specifického cholin vazebného motivu (Rosenow *et al.*, 1997). Cholin vazebný motiv se nachází v C-terminální části a je obvykle následován flexibilním spojovacím peptidem, který je tvořen segmenty bohatými na prolin. Cholin vazebný motiv váže koncový fosfocholinový zbytek kyseliny teichoové či lipoteichoové, které jsou součástí buněčné stěny *S. pneumoniae*, ale i dalších patogenů, např. *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *N. meningitidis* (Gosink *et al.*, 2000). Přítomnost cholinu je důležitá pro adhezenci na hostitelské buňky prostřednictvím nesespecifických fyzikálně chemických interakcí (Swiatlo *et al.*, 2002).

- Prvním známým adhezinem *S. pneumoniae* byl cholin vazebný protein CbpA. Funkcí CbpA je tedy adherence k hostitelským tkáním a jejich následná kolonizace. Mutantní kmeny s delecí genu *cbpA* ztrácí schopnost vázat se na hostitelské buňky. Nedávno bylo prokázáno, že CbpA se váže na lidský polymerní imunoglobulinový receptor pIgR, který následně zajistí translokaci bakterií do hlubších vrstev tkáně (Zhang *et al.*, 2000).
- Autolysiny jsou enzymy katalyzující degradaci peptidoglykanu. Za podmínek buněčného dělení je funkcí autolysinů degradace bakteriální stěny během segregace. Za podmínek stresových, například v přítomnosti antibiotik či detergentu, indukují lyzi buňky. LytA, N-acetylmuramoyl-L-alanin-amidasa, je hlavním autolysinem *S. pneumoniae*. Pomocí cholin vazebného motivu je ukotvený v buněčné stěně. Účastní se patogeneze jednak přímo, kdy uvolněné složky buněčné stěny (fragменты peptidoglykanu a teichoových kyselin) způsobují zánětlivé reakce (Tuomanen, 1999), ale i nepřímo uvolněním cytoplazmatických virulenčních faktorů, včetně pneumolysinu. Ve srovnání s divokým kmenem vede mutace v genu *lytA* ke snížení virulence *S. pneumoniae* (Berry a Paton, 2000).

LytB muramidasa se podílí na separaci dceřiných buněk (Garcia *et al.*, 1999b). Třetím autolysinem je protein LytC, který byl prvním identifikovaným lysozymem pneumokoků (Garcia *et al.*, 1999a).

- Protein PspA je lokalizován v buněčné stěně pneumokoků všech sérotypů (Crain *et al.*, 1990). Je to povrchový protein s molekulovou hmotností v rozmezí 67-99 kDa (Waltmann *et al.*, 1990). Jeho C-koncová část obsahuje cholin vazebný motiv. PspA se účastní ochrany bakteriální buňky před účinky komplementu hostitelského organismu a inhibuje proces fagocytózy (Briles *et al.*, 1998, Tu *et al.*, 1999).

2.1.5 Regulace exprese virulenčních faktorů

S. pneumoniae běžně kolonizuje horní cesty dýchací bez jakýchkoliv příznaků onemocnění. Přejít z fáze nevirulentní do fáze virulentní je dán změnou exprese virulenčních faktorů. Stejně jako u jiných patogenů klíčovou roli v tomto procesu hrají dvousložkové systémy (TCS-two-component system). U *S. pneumoniae* je známo 13 TCS. U osmi z nich bylo prokázáno, že jsou pro plnou virulenci *S. pneumoniae* nezbytné. Jedná se o systémy: ComDE, který indukuje navození stavu kompetence (viz 2.1.6) (Lau *et al.*, 2001), RR04 účastníci se transportu manganatých iontů (McCluskey *et al.*, 2004), BlpRH, který je zodpovědný za produkci bakteriocinů (de Saizieu *et al.*, 2000), CiaRH, který je negativním regulátorem kompetence (Sebert *et al.*, 2002, Mascher *et al.*, 2003, Ibrahim *et al.*, 2004), RR06 účastníci se exprese *cbpA* (Standish *et al.*, 2005), RitR regulující transport železa (Ulijasz *et al.*, 2004), RR09 (Blue a Mitchell, 2003) a VicRK, homolog YycFG *B. subtilis*, jež pozitivně reguluje řadu genů kódujících povrchové proteiny, které se účastní procesu biosyntézy peptidoglykanu (Mohedano *et al.*, 2005, Ng *et al.*, 2005).

2.1.6 *S. pneumoniae* a přirozená kompetence

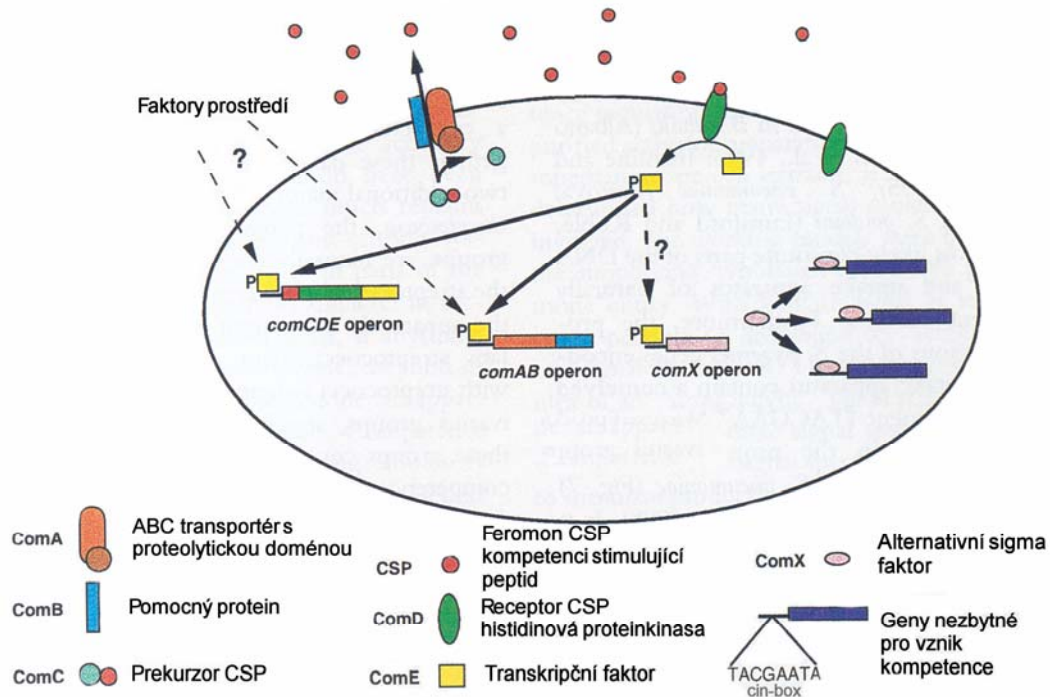
U *S. pneumoniae* je prokázán přechodně trvající fyziologický stav nazývaný stavem přirozené kompetence (Håvarstein, 1998), kdy je buňka schopná přijmout cizorodou DNA. Celý proces navození tohoto stavu je řízen mechanismem *quorum sensing* a jeho podstatou je monitorování buněčné denzity (viz 2.1.7). Kultura *S. pneumoniae* dosahuje stavu kompetence během exponenciální fáze růstu a proces závisí na teplotě, pH, koncentraci kyslíku, koncentraci manganatých a vápenatých iontů a na koncentraci fosfátu (Claverys a Håvarstein, 2002).

Existuje řada hypotéz, které se snaží zodpovědět otázku, proč se vlastně kompetence a v jejím důsledku transformace objevila. Jedna z hypotéz zastává názor, že je to jednoduchý způsob genetické výměny (Redfield, 1993). Dalším názorem je, že transformace je mocný nástroj horizontálního přenosu genů mezi populacemi (Lorenz a Wackernagel, 1994). V neposlední řadě cizorodá DNA přijatá do buňky transformací může sloužit jako templát pro rekombinační opravu poškozených oblastí na chromozómu (Hoelzer a Michod, 1991). V současné době je navození stavu kompetence u *S. pneumoniae* považováno za obecnou odpověď na stres (Claverys *et al.*, 2006). V tomto kontextu feromon CSP (competence stimulating peptid) zastává funkci alarmonu. Transformace je tedy jedním z velmi dokonalých nástrojů evoluce.

2.1.7 Regulace kompetence

Jak bylo zmíněno výše, navození stavu kompetence je řízeno mechanismem *quorum sensing*. Jde o kontrolu exprese genů v závislosti na buněčné denzitě. *Quorum sensing* je založen na produkci a detekci signálních molekul zvaných autoinduktory. Detekce signálu a odpověď na něj je zajišťována dvousložkovým systémem, který se skládá ze sensorové proteinkinasy a regulačního proteinu. Proteinkinasa se po navázání autoinduktoru autofosforyluje a poté přenáší fosfátový zbytek na regulační protein, který má DNA vazebnou aktivitu a ovlivňuje transkripci cílových genů.

Do kontroly regulace kompetence je zapojen operon *comCDE*. Produktem genu *comC* je prekurzor feromonu CSP (Håvarstein *et al.*, 1995). CSP je produkován přímo úměrně k počtu buněk. ABC transportér ComA/B s proteolytickou doménou rozpozná prekurzor CSP, štěpí ho a exportuje do extracelulárního prostředí. Maturace peptidu CSP probíhá endopeptidázovým štěpením sekvence Gly-Gly (Hui *et al.*, 1995). CSP se váže na extracelulární smyčku histidinové sensorové proteinkinasy ComD, která se vazbou CSP aktivuje, autofosforyluje se na histidinovém zbytku a následně fosforyluje aspartátový zbytek regulačního proteinu ComE (Pestova *et al.*, 1996) (Obr. 2.2). ComE je transkripční aktivátor, který ovlivňuje transkripci genů *comAB*, *comCDE* a genu *comX* (Håvarstein *et al.*, 1998). ComX je alternativní σ -faktor, je přítomen ve dvou kopiích ComX1 a ComX2, a reguluje transkripci pozdních kompetenčních genů, které se účastní příjmu cizorodé DNA a rekombinace (Lee a Morrison, 1999). Geny závislé na ComX jsou charakterizované přítomností konzervované sekvence, cin-box, v promotoru. Tuto sekvenci rozeznává RNA polymerasa s navázaným ComX (Campbell *et al.*, 1998, Luo a Morrison, 2003).



Obr. 2.2: Regulace navození stavu kompetence systémem *com*. Popis v textu. Převzato z *Cell-cell signaling in bacteria*, ASM News (1999).

Dalším systémem, který se účastní regulace kompetence, je dvousložkový systém kódovaný geny *ciaH* a *ciaR* (Guenzi *et al.*, 1994). Produktem genu *ciaH* je sensorová histidinová proteinkinasa a genem *ciaR* je kódován regulační protein. CiaRH negativně ovlivňuje expresi *comCDE* (Echenique *et al.*, 2000, Mascher *et al.*, 2003). Pokud je aktivován systém CiaRH, k rozvoji kompetence nedochází, neboť *cia* systém blokuje systém *com*. Kultura se stává kompetentní teprve po přidání exogenního feromonu CSP. Pokud je ale do média přidán prekurzor CSP peptidu k navození stavu kompetence nedochází. Systém CiaRH se zřejmě účastní regulace kompetence v časných fázích, a to buď při syntéze nebo při sekreci proteinu CSP (Hakenbeck *et al.*, 1999). U mutantů s inaktivací *cia* genů dochází k permanentní aktivaci exprese *comCDE*, což potvrzuje propojení systému *cia* a *com* (Echenique *et al.*, 2000). Otázkou zůstává, co je signálem pro sensorovou proteinkinasu CiaH. Systém CiaRH odpovídá na změny složení média, např. změny koncentrace Ca^{2+} a fosfátu (Giammarinaro *et al.*, 1999), ale molekulární podstata signálu je neznámá. Je možné, že spíše než nějaká specifická molekula, systém CiaRH aktivuje adaptace buněčného povrchu na tyto změny (Zähner *et al.*, 2002).

2.1.8 *S. pneumoniae* a rekombinace

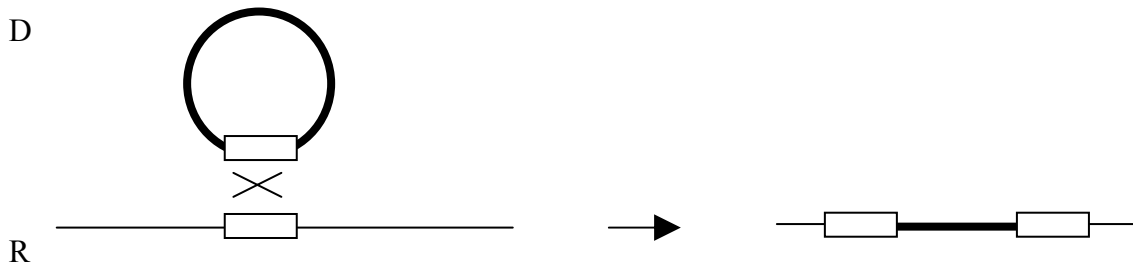
V důsledku navození stavu kompetence je exogenní DNA navázána na buněčný povrch pomocí DNA vazebného proteinu bez zřejmé vazebné specifity. Do buňky vstupuje jedno vlákno DNA, vybrané náhodně, a to ve směru od 3' konce, zatímco druhé vlákno zůstává vně buňky a je degradováno (Lacks, 1977).

Při rekombinaci dochází k nahrazení určité sekvence recipientní DNA sekvencí donora. Pokud je sekvence homologní, dojde k její integraci do bakteriálního chromozómu homologní rekombinací s pravděpodobností 100% (Humbert *et al.*, 1995). Sekvence může být i nehomologní. Výsledkem nehomologní rekombinace je výměna odlišných sekvencí, což vede ke vzniku mozaikových genů, které se skládají z úseků donorových i recipientních. Příkladem mozaikových genů jsou geny pro penicilin vazebné proteiny (PBP- penicillin-binding protein) *S. pneumoniae*, které díky genetické transformaci mění afinitu PBP proteinů k β -laktamovým antibiotikům, čímž dochází ke vzniku kmenů rezistentních na penicilin (Hakenbeck, 2000).

Odpovídající děje nehomologní rekombinace mohou být rozděleny do tří kategorií: inserce-duplikace (ID), inserce kazety a inserce-delece.

- Inserce-duplikace

Inserce-duplikace (ID) byla poprvé objevena u *S. pneumoniae* po transformaci nereplikativním rekombinantním plazmidem (Méjean *et al.*, 1981). Nyní je to široce používaná metoda pro inserční inaktivaci chromozomálních genů. Termín inserce-duplikace odpovídá struktuře rekombinantního produktu, neboť dochází k duplikaci homologního fragmentu (Obr. 2.3). Donorem je často cirkulární forma DNA a mechanismus ID je jednoduchý crossing-over mezi cirkulární molekulou a chromozómem recipienta. Tento typ rekombinace je také nazýván jako Campbellův typ rekombinace.

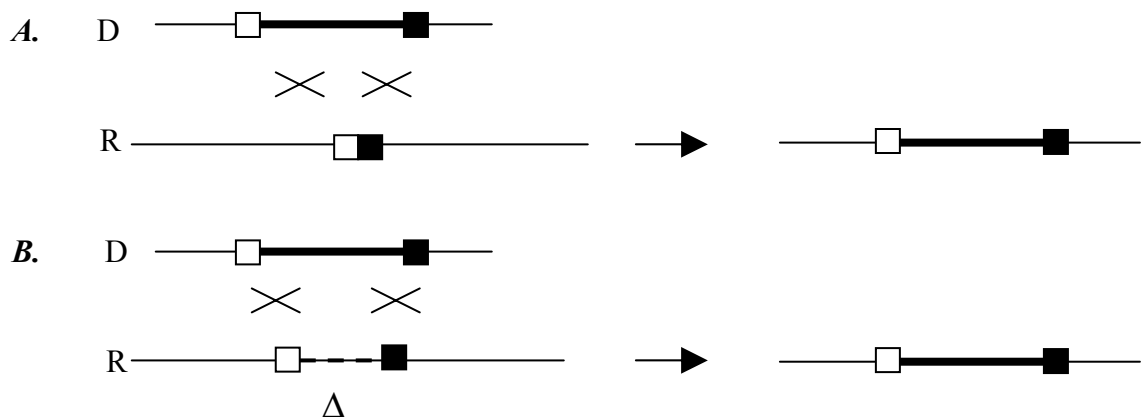


Obr. 2.3: Model inserce-duplikace.

D – donor, R – recipient, homologní fragment, **—** heterologní oblast

- Inzerce kazety (alelická výměna)

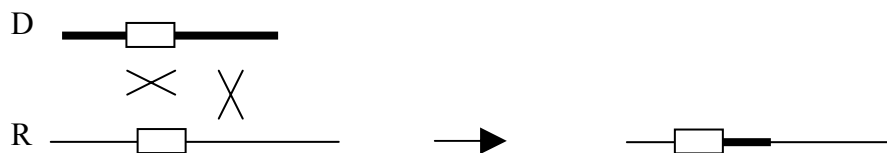
Vložení heterologní kazety do chromozómu je podmíněno přítomností homologních sekvencí na obou jejích koncích. Po dvojitém crossing-overu pak dojde buď k vložení kazety (*Obr. 2.4 A*) nebo nahrazení jisté části chromozómu kazetou (*Obr. 2.4 B*). Rekombinanti vzniklí inzercí kazety jsou stabilnější než ID rekombinanti, neboť u nich nemůže dojít k rekombinaci duplikovaných oblastí vedoucí ke spontánní excizi. Mechanismus inzerce kazety byl poprvé demonstrován v případě *DpnI* a *DpnII* restriktivního systému *S. pneumoniae* (Lacks *et al.*, 1986).



Obr. 2.4: Model inzerce kazety. Vložení kazety (**A**) nebo nahrazení části chromozómu kazetou (**B**). D – donor, R – recipient, □ ■ homologní fragmenty, — heterologní oblast, Δ sekvence deletovaná během procesu

- Inzerce-delece

Ilegitimní rekombinace zvaná inzerce-delece byla poprvé objevena během rekombinace hybridními DNA molekulami (Claverys *et al.*, 1980). Během procesu dojde současně k inzerci heterologní DNA a delecí chromozomální sekvence (*Obr. 2.5*). Nejprve dochází k párování homologních oblastí, které vede k přechodnému párování heterologních oblastí. S jistou pravděpodobností potom dochází k ilegitimní rekombinaci.



Obr. 2.5: Model inzerce-delece. D – donor, R – recipient, □ homologní fragment, — heterologní oblast, \times místo ilegitimní rekombinace

2.2 Fosforylace proteinů – základní mechanismus přenosu signálů

Fosforylace je kovalentní posttranslační modifikace proteinů katalyzovaná proteinkinasami, která vede k reverzibilní změně jejich strukturních a biochemických vlastností. Proces opačný je zajišťován proteinfosfatasami. Fosforylace a defosforylace proteinů je považována za nejdůležitější mechanismus regulace molekulárních procesů probíhajících při odpovědi na vnitrobuněčný či mimobuněčný podnět. Tento způsob signalizace využívají buňky všech živých organizmů.

2.2.1 Eukaryotní proteinkinasy

2.2.1.1 Serin/threoninové a tyrosinové proteinkinasy

Naprostá většina proteinkinas, které se vyskytují u eukaryot, patří do jedné nadrodiny. Modifikují proteiny na serinovém, threoninovém a tyrosinovém zbytku. Obsahují katalytickou doménu, která je tvořena 250–300 aminokyselinovými zbytky a je uspořádána do 11 konzervovaných subdomén, které jsou odděleny úseky s nižší homologií (Hanks *et al.*, 1988). Konzervované subdomény jsou nezbytné pro katalytickou funkci enzymu. Tvoří složky aktivního místa nebo se účastní tvorby sekundárních struktur, které stabilizují aktivní místo.

Na vazbě a správné orientaci ATP, zdroje fosfátové skupiny, se účastní subdomény I-III. Pro subdoménu I je charakteristická konsensus sekvence Gly-X-Gly-X-Gly (X = libovolná aminokyselina). Tento konzervovaný motiv se často vyskytuje u proteinů vázících nukleotidy. II. subdoména je tvořena motivem Ala-X-Lys-X-Val/Ile. Klíčovou roli hraje invariantní lysinový zbytek, který se přímo účastní fosfotransferázové reakce. Jakékoliv substituce tohoto lysinového zbytku vedou ke ztrátě aktivity enzymu (Carrera *et al.*, 1993). III. subdoména obsahuje absolutně konzervovaný glutamátový zbytek. Tento glutamátový zbytek je umístěn centrálně (centrálně v α -helixu, který reprezentuje III. subdoménu) a pomáhá stabilizovat interakci mezi lysinovým zbytkem II. subdomény a α - β -fosfátem ATP (pro přehled Hanks a Hunter, 1995).

Centrální a nejvíce konzervovanou oblast katalytické domény tvoří subdomény VI až IX. Vysoce konzervované zbytky Asp a Asn subdomény VI a Asp subdomény VII se účastní procesu vazby ATP. VIII. subdoména obsahuje konzervovanou sekvenci Ala-Pro-

Glu, v jejíž blízkosti se nachází místo autofosforylace mnoha proteinkinasy (Hunter a Cooper, 1986).

Podle odlišností v sekvencích VI. a VIII. subdomény se eukaryotní proteinkinasy dělí na dva typy lišící se svou substrátovou specifitou. Prvním typem jsou serin/threoninové proteinkinasy, které fosforylují proteiny na serinovém a threoninovém zbytku. Druhým typem jsou proteinkinasy tyrosinové fosforylující na tyrosinovém zbytku (Hanks *et al.*, 1988). Pro serin/threoninové proteinkinasy je typická sekvence Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn v VI. subdoméně a Gly-Thr/Ser-X-X-Tyr/Phe-X-Ala-Pro-Glu v VIII. subdoméně. Tyrosinové proteinkinasy mají v VI. subdoméně sekvenci Asp-Leu-Arg-Ala-Ala-Asn (Src proteinkinasy obratlovců), resp. Asp-Leu-Ala-Ala-Arg-Asn (všechny ostatní tyrosinové proteinkinasy). Všechny tyrosinové proteinkinasy obsahují v VIII. subdoméně charakteristickou sekvenci Pro-Ile/Val-Lys/Arg-Trp-Thr/Met-Ala-Pro-Glu (Hanks *et al.*, 1988).

2.2.1.2 Dvousložkové systémy

Dlouhou dobu se předpokládalo, že v eukaryotních organizmech se přenos signálu prostřednictvím fosforylace uskutečňuje pouze pomocí serin/threoninových, resp. tyrosinových proteinkinasy. Tento názor byl však revidován, neboť u několika eukaryotních organismů byly objeveny prvky dvousložkového systému. Nejlépe jsou prostudovány dvousložkové systémy u *Saccharomyces cerevisiae* (Posas *et al.*, 1996), *Candida albicans* (Nagahashi *et al.*, 1998), *Neurospora crassa* (Alex *et al.*, 1996) a *Arabidopsis thaliana* (Schaller a Blecker, 1995). Senzorové proteinkinasy těchto systémů řadíme do rodiny hybridních kinas obsahujících doménu senzorovou i regulační.

2.2.2 Prokaryotní proteinkinasy

Mnoho let převládal názor, že k fosforylaci proteinů dochází pouze u eukaryot, neboť počáteční pokusy detekovat fosforylované proteiny u mikroorganismů nebyly úspěšné (Cozzone, 1993). Koncem sedmdesátých let byla nezávisle prokázána fosforylace proteinů u *Salmonella typhimurium* (Wang a Koshland, 1978) a *Escherichia coli* (Garnak a Reeves, 1979). Vůbec první identifikovanou bakteriální proteinkinásou byla bifunkční IDH (isocitrátdehydrogenasa) kinasa/fosfatasa (Garnak a Reeves, 1979). V polovině osmdesátých let byl u bakterií objeven další mechanismus přenosu signálu pomocí fosforylace proteinů, který je uskutečňován dvousložkovým systémem (viz 2.2.2.2) (pro

přehled Egger *et al.*, 1997). Mezi prokaryoty byla také prokázána přítomnost proteinkinás, které jsou vysoce homologní s eukaryotními serin/threoninovými a tyrosinovými proteinkinásami (pro přehled Deutscher a Saier, 2005, Krupa a Srinivasan, 2005).

U prokaryotních organizmů jsou fyziologické procesy regulovány třemi typy fosforylačních systémů:

1. Fosfoenolpyruvát (PEP) – dependentní fosfotransferázový systém
2. Dvousložkové systémy
3. ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinasy.

2.2.2.1 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém

Velmi dobře charakterizovaným fosforylačním mechanismem je fosfotransferázový systém (PTS). Donorem fosfátové skupiny je v tomto systému fosfoenolpyruvát (PEP). Nejvýznamnější funkcí PTS systému je skupinová translokace, která umožňuje přenos sacharidů přes membránu a jejich fosforylaci.

PTS systém zahrnuje dva cytoplazmatické proteiny, enzym EI a HPr, které se podílí na transportu sacharidů. Pro každou translokaci je nezbytný specifický transmembránový protein EII, resp. EIIC, který je buď vázán v membráně, nebo se vyskytuje volně v cytoplasmě. K fosforylaci proteinů dochází na histidinových zbytcích.

Fosfotransferázový systém se mimo jiné podílí na chemotaxi k sacharidům, ale samotnou adaptivní odpověď zajišťuje interakce mezi proteiny dvousložkového systému CheA a CheY (Saier, 1990).

2.2.2.2 Dvousložkové systémy

Druhý typ regulace fyziologických procesů je reprezentován dvousložkovými systémy, které zajišťují odpověď na extracelulární signály, kontrolují genovou expresi a adaptivní buněčnou odpověď.

Model dvousložkového systému vychází z představy, že systém je tvořen dvěma prvky: senzorem a regulátorem (Parkinson a Kofoid, 1992). V některých případech však může být přítomno více prvků. Senzor, kterým je histidinová proteinkinasa, se v reakci na vnější podnět 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.

Struktura a funkce senzorových proteinkinasy

Histidinové senzorové proteinkinasy se podle organizace funkčních domén dělí do dvou tříd (Fousard *et al.*, 2001).

Pro histidinové proteinkinasy patřící do první třídy je typické, že obsahují variabilní N-terminální doménu, která může být tvořena více než 500 aminokyselinovými zbytky, a stěžejní C-terminální oblast, takzvaný přenašeč (transmitter). Tato 250 aminokyselinových zbytků dlouhá oblast je v rodině histidinových proteinkinasy velmi konzervovaná a je rozdělena do několika úseků, které jsou nazývány H, N, G1, F a G2 boxy. Box H se vyznačuje přítomností histidinového zbytku, akceptoru fosfátové skupiny. Boxy N, G1, F a G2 vymezují oblast, kde dochází k vazbě ATP.

Pro druhou třídu histidinových proteinkinasy je typické, že jsou asociovány s membránovým receptorem, který po detekci signálu kinasu aktivuje. Jako příklad lze uvést protein účastnící se chemotaxe u *E. coli*, CheA. Histidinový zbytek (box H), který je místem autofosforylace, je lokalizován v N-terminální části. C-terminální oblast proteinkinasy se účastní regulace autokinázové aktivity prostřednictvím spojení transmembránového receptoru a proteinu CheW (Bourret *et al.*, 1993, Morrison a Parkinson, 1997).

Struktura a funkce regulačních proteinů

Regulační proteiny mohou obsahovat jednu, dvě nebo tři domény, a je pro ně charakteristická konzervovaná N-terminální oblast (receiver). Tato oblast je tvořena asi 125 aminokyselinovými zbytky, mezi nimiž se nachází i fosforylovatelný aspartátový zbytek. Příkladem může být protein CheY (Stock *et al.*, 1989), který se účastní chemotaxe.

U mnoha regulačních proteinů má C-terminální výstupní doména DNA vazebnou aktivitu a po vazbě na sekvenci promotoru může negativně nebo pozitivně regulovat expresi genů, funguje tedy jako transkripční regulátor.

2.2.2.3 ATP-dependentní serin/threoninové a tyrosinové proteinkinasy

U prokaryot se dále vyskytují ATP-dependentní proteinkinasy fosforylující serin, threonin nebo tyrosin, které nemají žádnou sekvenční homologii s podobnými enzymy u

eukaryot. Jsou alostericky aktivovány buněčnými metabolity, ale známa je i regulace pomocí iontů Ca^{2+} (Saier *et al.*, 1990). Mezi zástupce těchto proteinkinás patří nejlépe charakterizovaná isocitrátdehydrogenasa (IDH) kinasa/fosfatasa (LaPorte a Koshland, 1982) a skupina proteinkinás grampozitivních bakterií, fosforylujících HPr protein, který je součástí fosfotransferázového systému (PTS). Aktivita IDH kinasy/fosfatasy je regulována řadou metabolických intermediátů, např.: isocitrát, oxalacetát nebo pyruvát inhibují kinázovou a aktivují fosfatázovou aktivitu. Kinasy fosforylující HPr jsou alostericky aktivované fruktosa 1,6-bisfosfátem a dalšími fosforylovanými intermediáty metabolismu sacharidů.

2.2.2.4 Proteinkinasy eukaryotního typu u bakterií

Mezi prokaryoty byla také prokázána přítomnost proteinkinás, které jsou vysoce homologní s eukaryotními proteinkínasami (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991, Galyov *et al.*, 1993, Zhang, 1993, Urabe a Ogawara, 1995, Av-Gay a Everett, 2000, Inouye *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2002). Tyto proteinkinasy obsahují všechny konzervované domény charakteristické pro proteinkinasy nalezené u eukaryot (Hanks *et al.*, 1988). Pojem eukaryotní proteinkinasy nebo též proteinkinasy eukaryotního typu je tedy chápán jako označení sekvenčně homologních proteinkinás, které fosforylují serinové, threoninové a tyrosinové zbytky, ale nevypovídá o výskytu těchto enzymů.

Veškeré dosud identifikované bakteriální proteinkinasy eukaryotního typu se nacházejí u bakterií se složitým životním cyklem podléhajících buněčné diferenciaci nebo u bakterií patogenních, které interagují s eukaryotním hostitelem (Cozzone, 2005). Nejvíce Ser/Thr proteinkinás eukaryotního typu můžeme nalézt u myxobakterií (100), sinic (53), aktinomycet (34) a mykobakterií (11).

Nedávno byla publikována práce (Nariya a Inouye, 2005), která vůbec jako první popisovala součinnost Ser/Thr proteinkinasy a dvousložkového systému u *Myxococcus xanthus*.

- **Příklady diferencujících mikroorganismů**

Myxococcus xanthus

M. xanthus je půdní bakterie charakteristická svým složitým vývojovým cyklem. Buňky se pohybují po podkladu klouzavým pohybem a v podmínkách nedostatku živin

dochází ke komplikované diferenciaci, buňky se shlukují, migrují do agregačního centra a tvoří plodničky. V roce 1991 byla u *M. xanthus* objevena první bakteriální proteinkinasa eukaryotního typu (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). Sekvence genomu *M. xanthus* odhalila přítomnost asi sta genů kódujících potenciální Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu (Nariya a Inouye, 2003).

Analýza delečních mutantů pro geny *pkn1*, *pkn2*, *pkn5*, *pkn6* a *pkn9* ukázala, že tyto proteinkinasy jsou nepostradatelné pro správný průběh diferenciaci a pro sporulaci (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991, Udo *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1996, Hanlon *et al.*, 1997). I ostatní popsané proteinkinasy se podílí na regulaci diferenciaci (Inouye *et al.*, 2000, Nariya a Inouye, 2002, 2003, 2005, Stein *et al.*, 2006).

Aktinomycety

Aktinomycety jsou grampozitivní půdní bakterie, které diferencují a produkují sekundární metabolity. Jejich životní cyklus je ukázkou kooperace jednotlivých buněk, neboť po vyčerpání živin z prostředí probíhá charakteristický vývojový cyklus vedoucí k tvorbě spór.

V sekvenci genomu *S. coelicolor* bylo identifikováno 34 genů kódujících proteinkinasy (Petříčková a Petříček, 2003). Nejvíce dostupných údajů je o membránově asociované proteinkinase AfsK (Matsumoto *et al.*, 1994, Sawai *et al.*, 2004). Autofosforyluje se na serinových a tyrosinových zbytcích, avšak svůj substrát, globální regulační protein AfsR, fosforyluje na serinových a threoninových zbytcích. Protein AfsR kontroluje produkci sekundárních metabolitů *S. coelicolor* a *S. lividans*.

Druhým velmi dobře prostudovaným proteinem je proteinkinasa RamC (Hudson *et al.*, 2002, O'Connor *et al.*, 2002). RamC je membránově vázaná Ser/Thr proteinkinasa, která se společně s proteinem RamR podílí na tvorbě vzdušného mycelia. Bylo prokázáno, že krátká sekvence C-terminální oblasti RamC má kapacitu tvořit stabilní dimery, a tudíž se předpokládá, že *in vivo* se RamC nachází v buňce ve formě dimeru (Hudson a Nodwell, 2004).

Sinice

Sinice jsou prokaryotní organizmy schopné provádět fotosyntézu rostlinného typu, fixovat dusík a diferencovat. U vláknité sinice *Anabaena* PCC 7120 byly popsány geny *pknA*, *B*, *C*, *D*, *E* kódující proteinkinasy eukaryotního typu (Zhang, 1993, Zhang *et al.*, 1998, Zhang a Libs, 1998, Gonzales *et al.*, 2001) a jejich studiem bylo prokázáno, že se

účastní regulace růstu, diferenciaci, vzniku heterocyst a metabolismu dusíku. Některé proteinkinasy sinice *Anabaena* PCC 7120 nesou kromě Ser/Thr kinázové domény také kinázovou doménu histidinových kinas, např. proteinkinasy HstK, Pkn41 a Pkn42 (Phalip *et al.*, 2001, Cheng *et al.*, 2006).

Druhým zástupcem sinic je *Synechocystis* PCC 6803, organizmus jednobuněčný, neschopný fixace dusíku, což se projevuje i v nižším počtu pravděpodobných Ser/Thr proteinkinás eukaryotního typu (12). Nejlépe jsou charakterizované proteinkinasy SpkA a SpkB, které se podílí na pohyblivosti této sinice, SpkA dále reguluje expresi *pilA* operonů a účastní se tvorby pili (Kamei *et al.*, 2001, Kamei *et al.*, 2003, Panichkin *et al.*, 2006).

Bacillus subtilis

B. subtilis je grampozitivní půdní bakterie, která prochází procesem diferenciaci a dává vznik spórám. V genomu této bakterie byly nalezeny dvě pravděpodobné Ser/Thr proteinkinasy, PrkC a PrkD. Proteinkinasa PrkC byla charakterizována a bylo zjištěno, že se podílí na tvorbě biofilmu a procesu diferenciaci (Gaidenko *et al.*, 2002, Madec *et al.*, 2002). Rovněž bylo prokázáno, že tato kinasa je schopna tvořit dimery (Madec *et al.*, 2002) a svou topologickou organizací se podobá eukaryotním receptorovým kinasám jako je např. TGF- β . Důležitou vlastností těchto receptorů je schopnost tvořit stabilní dimery v přítomnosti ligandu *in vivo* (Massagué, 1998). S využitím hmotnostní spektrometrie byly u PrkC identifikovány aminokyselinové zbytky, které jsou fosforylované *in vitro* (Madec *et al.*, 2003). Čtyři z nich, Thr 162, 163, 165 a 167 se nacházejí v oblasti aktivační smyčky a jsou pro aktivitu enzymu nezbytné. Výrazné snížení aktivity bylo pozorováno také při substituci serinu v pozici 214, který se nachází v substrát vazebné doméně. Studium Ser/Thr/Tyr fosfoproteomu *B. subtilis* bylo identifikováno 29 fosforylovaných proteinů, jež se uplatňují v rozličných buněčných procesech (Lévine *et al.*, 2006).

- **Příklady patogenních mikroorganismů**

Yersinia pseudotuberculosis

Y. pseudotuberculosis je patogenní bakterie, která kolonizuje lymfoidní tkáň a způsobuje záněty mízních uzlin a septikémie. Tato bakterie nese 70 kb plazmid kódující řadu virulenních proteinů, které jsou sekretovány do vnějšího prostředí (tzv. *Yops*-*Yersinia* outer-membrane proteins). Mezi tyto proteiny patří i proteinkinasa eukaryotního typu YpkA schopná autofosforylace na serinovém zbytku (Galyov *et al.*, 1993). YpkA byla

první známou proteinkinasou účastnící se patogeneze. Je produkována jako neaktivní enzym, který se aktivuje až po interakci s aktinem v hostitelských buňkách. Barz a kol. (2000) popsali přímou interakci YpkA s eukaryotními proteiny Rac-1 a RhoA, regulátory buněčné signalizace.

Mycobacterium tuberculosis

V genomu *M. tuberculosis* bylo identifikováno celkem jedenáct genů kódujících proteinkinasy eukaryotního typu (Av-Gay a Everette, 2000).

Geny *pknA* a *pknB* leží ve stejném operonu s geny *pbpA* a *rodA*, které se účastní kontroly syntézy peptidoglykanu a tvorby septa. Bylo prokázáno, že regulace morfologických změn během buněčného dělení a tvaru buňky je zprostředkována signalizací proteinkinasy PknA a PknB (Chaba *et al.*, 2002, Kang *et al.*, 2005), a že PknB je pro růst *M. tuberculosis* nezbytná (Fernandez *et al.*, 2006). Krystalová struktura kinázové domény PknB v komplexu s ATP prokázala strukturní podobnost s eukaryotními Ser/Thr kinasami a podporuje hypotézu, že Ser/Thr proteinkinasy jsou aktivovány univerzálním způsobem u eukaryot i prokaryot. Krystalografické studie prokázaly přítomnost konzervované oblasti, která se podílí na dimerizaci proteinkinasy PknB (Youth *et al.*, 2003, Greenstein *et al.*, 2005). Konstitutivně transkribovaná transmembránová proteinkinasa PknB se autofosforyluje na Ser a Thr, a je defosforylovaná transmembránovou Ser/Thr fosfatase PstP, která leží ve stejném operonu (Av-Gay *et al.*, 1999, Boitel *et al.*, 2003). Nedávno byly taktéž publikovány práce identifikující *in vivo* substráty PknB (Kang *et al.*, 2005, Villarino *et al.*, 2006).

Geny *pknE* a *pknF* leží v těsné blízkosti a gen *pknF* ve stejném operonu jako gen pro ABC transportér. Bylo prokázáno, že proteinkinasa PknF interaguje s FHA doménou (Forkhead-Associated) ABC transportéru kódovaného genem *Rv1747*, a že je nezbytná pro růst *M. tuberculosis* v myších (Curry *et al.*, 2005). Také byla popsána role proteinkinasy PknF v transportu glukosy a při buněčném dělení (Deol *et al.*, 2005). Krystalová struktura proteinkinasy PknE je velmi podobná struktuře proteinkinasy PknB, což podporuje hypotézu, že dimerizace hraje rozhodující roli v aktivaci proteinkinasy (Gay *et al.*, 2006).

Proteinkinasa PknG je nezbytná pro přežití *M. tuberculosis* v makrofázích, kde sekretována do jejich cytosolu zabraňuje fúzi fagozomu s lysozomem (Nguyen *et al.*, 2005). PknG je homologní s proteinkinase YopO *Yersinia pestis*.

Proteinkinasa PknH se účastní transkripční regulace operonu *embCAB* skrze fosforylaci FHA domény regulačního proteinu EmbR (Molle *et al.*, 2003, Alderwick *et al.*,

2005, Sharma *et al.*, 2006), který hraje roli v biosyntéze arabinogalaktanu, klíčové složky buněčných stěn mykobakterií.

Pseudomonas aeruginosa

Genom oportunního lidského patogena *P. aeruginosa* obsahuje 3 Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu. Proteinkinasa PpkA je preferenčně exprimována během infekce v neutropenické myši a hraje roli v regulaci exprese virulenčních faktorů (Motley a Lory, 1999). *ppkA* deficientní kmen má sníženou schopnost virulence, nadprodukce proteinu PpkA je vysoce toxická pro *E. coli* i *P. aeruginosa* (Wang *et al.*, 1998).

Gen kódující proteinkinasu Stk1 se nachází v jednom operonu s genem kódujícím proteinfosfatasou Stp1 a oba geny jsou kotranskribovány (Mukhopadhyay *et al.*, 1999). Funkce proteinu Stk1 nebyla prozatím objasněna.

Sekvenční studie ukázaly, že proteinkinasa PpkB obsahuje jak kinázovou, tak fosfatázovou doménu. Jedná se tedy o unikátní Ser/Thr proteinkinasu/fosfatasu eukaryotního typu. Biochemické studie potvrdily, že protein je schopný autofosforylace a současně vykazuje fosfatázovou aktivitu (Lněnička, ústní sdělení).

Popsána byla i jedna Tyr proteinkinasa eukaryotního typu, protein WaaP (Zhao a Lam, 2002).

Chlamydia trachomatis

Sexuálně přenosná patogenní bakterie *C. trachomatis* způsobuje slepotu. Patří mezi obligátní intracelulární patogeny a uvnitř hostitelské buňky prodělává jedinečný dvoufázový životní cyklus. Infekční, metabolicky neaktivní elementární tělísko, se mění v neinfekční metabolicky aktivní a replikující se retikulární tělísko. Genom *C. trachomatis* sérovar D obsahuje 3 otevřené čtecí rámce kódující Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu (Stephens *et al.*, 1998). Dvě z nich, Pkn1 a PknD, byly amplifikovány ze sérovaru L2 a charakterizovány. Proteinkinasy Pkn1 a PknD jsou schopny autofosforylace a jsou exprimovány v časně střední fázi vývoje. Bylo prokázáno, že spolu vzájemně interagují, což je první důkaz signální kaskády u prokaryot. Protein InkC byl identifikován jako substrát proteinkinasy Pkn1. Rovněž byl vysloven předpoklad, že signalizace pomocí těchto kinas může být zodpovědná za interakci patogena s hostitelskou buňkou a tudíž důležitá pro proces infekce (Verma a Maurelli, 2003).

Streptococcus agalactiae

S. agalactiae je lidský patogen patřící do skupiny B streptokoků. V genomu této bakterie byla identifikována přítomnost genů kódujících Ser/Thr proteinkinasu Stk1 a Ser/Thr proteinfosfatasu Stp1 eukaryotního typu. Zároveň bylo prokázáno, že tyto proteiny mají pleiotropní vliv na růst, segregaci buněk a virulenci, a také se podařilo identifikovat substrát proteinkinasy Stk1, Mn-dependentní anorganickou pyrofosfatasu PpaC (Rajagopal *et al.*, 2003).

Byl připraven *stk1* deficientní kmen a biochemická analýza mutantního kmene ukázala, že není schopný biosyntézy purinů *de novo* a byla vyslovena hypotéza, že proteinkinasa Stk1 je negativním regulátorem proteinu PurA, a účastní se tak regulace procesu biosyntézy purinů *de novo* (Rajagopal *et al.*, 2005).

Streptococcus mutans

S. mutans je hlavní etiologické agens způsobující vznik zubního kazu. Analýza genomu *S. mutans* potvrdila přítomnost genu *pknB* kódujícího Ser/Thr proteinkinasu a genu *pppL*, který kóduje Ser/Thr proteinfosfatasu eukaryotního typu. Mutace v genu pro PknB vedla k defektům při tvorbě biofilmu, v genetické kompetenci a v rezistenci k nízkému pH (Hussain *et al.*, 2006).

Streptococcus pyogenes

S. pyogenes je řazen do skupiny A streptokoků, bakterií způsobujících velké množství lidských onemocnění od mírných infekcí respiračního traktu a kůže až po vážné, často smrtelné nekrotizující záněty či syndrom toxického šoku. Nedávno Jin a Pancholi (2006) identifikovali a charakterizovali Ser/Thr proteinkinasu SP-STK kotranskribovanou se Ser/Thr proteinfosfatasou SP-STP. Mutanti v genu pro SP-STK projevovali poruchy v růstu, morfologii kolonií, septaci, expresi virulenčních faktorů, schopnosti adherovat a invadovat do lidských faryngeálních buněk, a odolnosti vůči fagocytóze lidskými neutrofily. Dále bylo popsáno, že exprese intracelulární a extracelulární domény SP-STK hraje důležitou roli v expresi M proteinu, hlavního virulenčního faktoru. SP-STK a SP-STP se tedy účastní regulace patogeneze *S. pyogenes*.

2.3 Rodina α -D-fosfohexomutas

Do rodiny α -D-fosfohexomutas jsou řazeny čtyři příbuzné enzymy, které katalyzují reverzibilní přenos fosfátové skupiny v molekule cukerného substrátu. Enzymy patřící do této skupiny hrají důležitou roli v metabolismu sacharidů a v jiných biosyntetických drahách od bakterií až po člověka (Shackelford *et al.*, 2004). Dva z enzymů, fosfoglukomutasa (PGM) a fosfomannomutasa/fosfoglukomutasa (PMM/PGM), jsou velmi dobře charakterizované a tvoří nejvíce zastoupenou skupinu uvnitř rodiny.

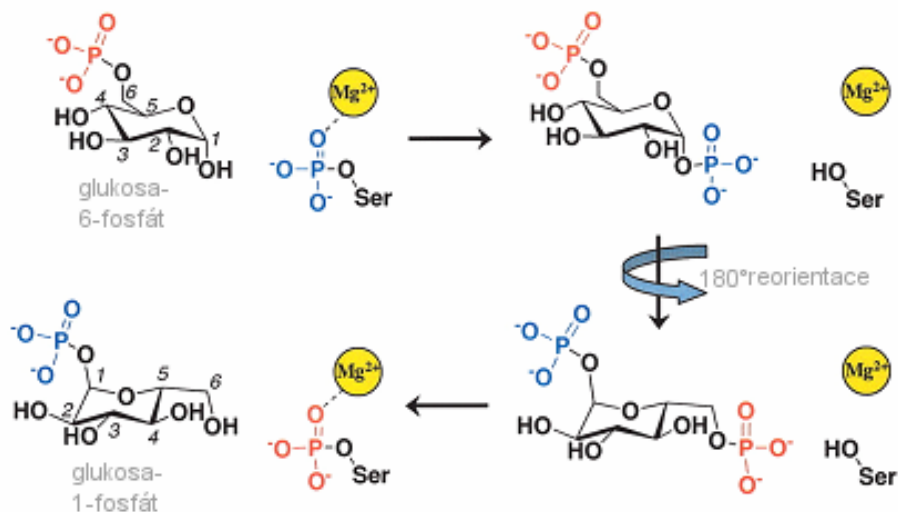
Fosfoglukomutasa je vysoce specifická a jako substrát rozpoznává pouze glukosu. Tento enzym je široce znám díky tvorbě substrátů, které poté vstupují do glykolytické dráhy.

Enzymy patřící mezi fosfomannomutasy/fosfoglukomutasy jsou nacházeny výhradně u bakterií. Jsou méně specifické, kromě glukosy rozpoznávají i mannosu a účastní se biosyntetických drah velké škály sacharidů, např. lipopolysacharidů a alginátu (Shankar *et al.*, 1995 a Roccheta *et al.*, 1999).

Do rodiny α -D-fosfohexomutas jsou dále řazeny mnohem méně charakterizované fosfoglukosaminmutasa (PGN, GlmM) a *N*-acetylglukosaminfosfátmutasa (AGM). Oba enzymy se účastní biosyntézy UDP-*N*-acetylglukosaminu, esenciálního prekurzoru složek buněčné stěny (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996) a také jsou nutné pro posttranslační modifikaci *N*-acetylglukosaminu (Mio *et al.*, 2000).

2.3.1 Reakční mechanismus enzymů α -D-fosfohexomutasové rodiny

Ačkoliv se enzymy liší substrátovou specifitou, vykazují stejný reakční mechanismus. Katalyzují reverzibilní přeměnu 1-fosfo- a 6-fosfo-cukrů přes 1,6-fosforylovaný meziproduct. Aktivní enzym je fosforylovaný na konzervovaném serinovém zbytku a váže hořčnatý iont. Reakční mechanismus zahrnuje dva přenosy fosfátové skupiny, nejprve z aktivního enzymu na substrát a poté z meziproductu reakce zpět na enzym. Meziproduct reakce fosforylovaný na prvním a šestém uhlíku cukru změní svou konformaci a znovu se váže k enzymu v odlišné pozici, čímž může dojít k přenosu fosfátové skupiny zpět na enzym. Dojde tedy k tvorbě produktu za současné regenerace aktivní formy enzymu (*Obr. 2.6*).



Obr. 2.6: Reakční mechanismus enzymů patřících do α -D-fosfohexomutasové rodiny. Předvedeno na příkladu přeměny glukosa-6-fosfátu na glukosa-1-fosfát. Převzato z Shackelford *et al.*, 2004. Popis v textu.

2.3.2 Struktura zástupců α -D-fosfohexomutasové rodiny

Krystalografické studie PMM/PGM a PGM proteinů ukázaly, že jejich terciární struktury jsou téměř totožné (Liu *et al.*, 1997 a Regni *et al.*, 2002). Proteiny obsahují čtyři domény, které uspořádány v terciární struktuře tvoří velký centrální zářez v oblasti aktivního místa. Nedávno publikovaná krystalografická studie (Regni *et al.*, 2004) dále prokázala, že každá ze čtyř domén obsahuje aminokyselinový zbytek esenciální pro katalýzu nebo pro rozpoznání substrátu. Srovnání sekvencí PGM, PMM/PGM, PGN a AGM potvrdilo přítomnost esenciálních zbytků u všech zástupců rodiny (Shackelford *et al.*, 2004).

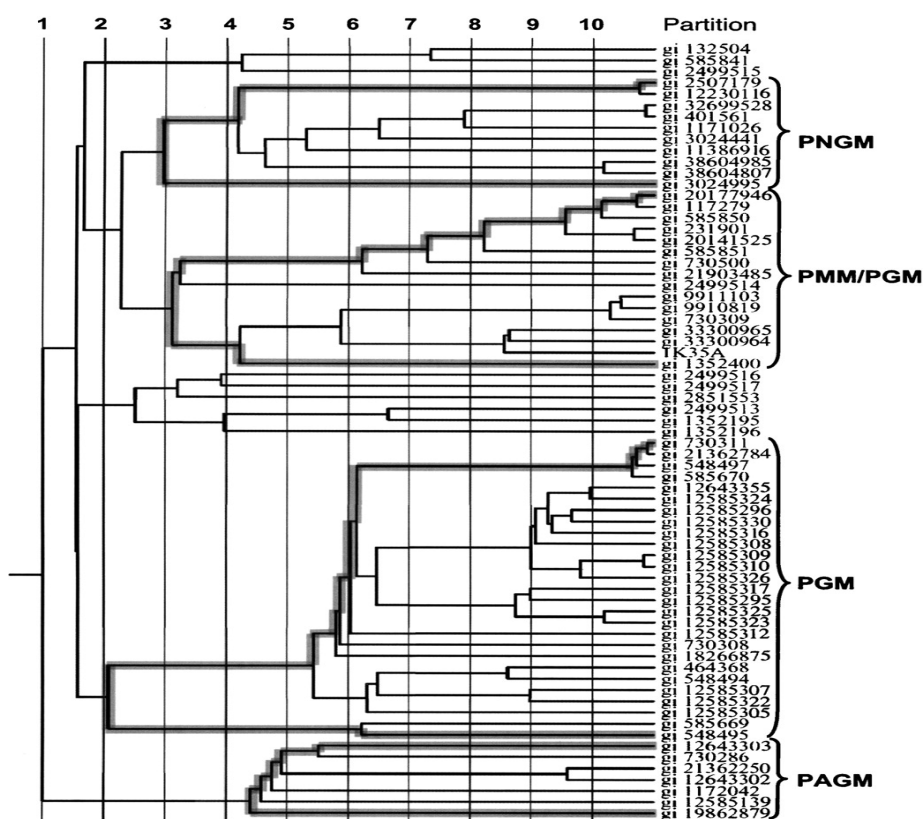
Doména I obsahuje fosforylovaný serinový zbytek nezbytný pro přenos fosfátové skupiny, doména II obsahuje kov vázající smyčku, která váže Mg^{2+} , nezbytný pro aktivitu enzymu. Doména III obsahuje cukr vazebnou smyčku s aminokyselinovými zbytky umožňujícími rozpoznání dvou orientací cukerného substrátu. Aminokyselinové zbytky v doméně IV tvoří fosfát vazebné místo, které určuje orientaci fosforylovaného cukru (Obr. 2.7).

	I →		
	Tyr17		
PGN	-----MSNRKYEFTGDIRGRVGDAPITDPDFVLKLGWAAGKVLARHGSR-----KIIIGKTRISGMLESLEAAGLAAGLSALFTG-----PM	79	
PMM/PGM	-----LPASIFRAYDIRGVG-DPLTAETAWI CRAIGSESLARG-----EPCVAVCRGRISGPELVKQLIQGLVDCGQVSDVG-----MV	85	
PGM	-----MVKIVT-----VKTWAYPQKPFSGLRKRKRVFQSSNYAFNFTQSIISTVEPAQRFQ-----ATLVVGGDRFYMKEAQLIVRIAAAANGIGRLVIG-----QNGILL	94	
AGM	-----MDLGAITKYSALHAKPNGLLILQYGTAGFRTKAEHLDHVMFRMGLLAVLRSKQTK-STIGVWVYAS [*] HNPEDDNGVKLVDP [*] LGEMLAPSWEEHATCLANAEE-----QDM	102	
	P-Ser		
PGN	PTPAVAYLTRIF-----RAEAG-IVISASHNPFDNG--IKFFSI--DGTKLDPAVEAEI EAEMEKE-----ISCVDSAEELGKASR-----IVDAAGRVEFCCK	163	
PMM/PGM	PTPVLVYAAANVL-----EGKSG-VMLTGSNHPDYG--FKIVVA--GET--LANEQIQLRERTERN--DLASG--V--GSVE-----QVDILLPRVFKQIR	164	
PGM	STPAVSCILIRK-----IKAIIGG-IILLPASHNPQPNG-DFGIKFN-INSGGPAPEALTKIQI SHTIEYAI CPDLK-----VDLGVLG-KQDFDEN-KFPPFTVEIVDSVEAKATMLR	200	
AGM	QRVLIDISEKEAVNLQQ-----DAFVVIQRDRTRPSSEKLSQSVIDQVT-VLGGQPHDYGLLTTQLHYWVY-----CRMTGGRYG-----KATIEGYQYQKLS	188	
		Mg2+ vazebná smyčka	
PGN	ATFPNELSLS-----ELKIVVDCANGATYHIAPN-----VLRLELG-----ANVIAIGCEPNGVIN-----AEVGATDVRAIQAORVLA-----EKADLGI AFDGGRVIMVD-----	240	
PMM/PGM	DDI-----AMAK-----PMKVVDGCGVAGVIAPQ-----LIEALG-----CSVPLCYEVDGNFPNHPH-----DPKRPENLKDIFAKVKA-----ENADLGLA F DGGDRGVVVT-----	252	
PGM	NLDFNALKELLSG-----PNRLKIRIDAMHGVVGVYVKK-----ILCEELGA--PANSAVN-CVPLEDFGGHPDENLTYAADLVETMKSGEHD-----FGA AFDGGRDRNMLLG-----	298	
AGM	KAFVELTRQASCSD-----EYRSLSKVDANGICALK-----LREM-----EHYFSOGLSVQLFNDGSK--GKLNILCGADFVKSHKPPQNGE-IKS-NEKCCSFDGADRI VVYVYH-----	287	
	III →		
PGN	-----HECNKVDGQIMYIIAREGLRQOQLR-----G-GAVGTILSNMGLLALKQLGIFPARAKVQDRYVLEKMQEKQWR-----IGAENSGHVILLDKTT--TGD-----	340	
PMM/PGM	-----NIGTIIYDRLMLLEAKDVVSRN--P-----GADII FVKTRRLIALISGYGGRVPMVKQSHSLIKKMKETGAL-----LAGENSGHVFFKERWFGFDD-----	341	
PGM	-----KHGFFVNPDSVAVIAAN-IFSIPYFOQTG-----VRGFARSMPTSGALDRVANATKIALYEYTPGKWKFGNLMDSKLS-----LCGEESFG--TGSDHIREKD-----	390	
AGM	DADGFHLIDGDKIATLISSELIKELLEVEIG-----ESLNICGVQVQTA YANGSSTRYLEEVMKVVPYCTKTGCVKHLHKAQE-FDIG--VYFFRANGHGTALFSTAVEMKIKQSAEQLE-----	395	
		cukr vazebná doména	
PGN	-----GIVAGLQVLAAMARN-----HMSLHDLCSGMKMFQIILVNVRYTAGSDPLEHESVKAVT-----AEVEAALG-----	403	
PMM/PGM	-----GIYSAARLLEILSQD-----SVEDILKDHWHFRGNFFPRYDYEVEAEGATKMKMLDEALMFDRSFVKGQFSANDKVVYT--VEKADNFYEHVDFVDSVSKNOGL	409	
PGM	-----GLWAVLAWLSILATRKO-----SRIIFRLSGTSGAGATIRLYIDSYEKDNKINQDQVQVMLAPLISIAL-KVSOEQERTGRTAPTAVIT	490	
AGM	-----DKKRAAKMLENIIDLFNQAAGDAISD-----MLVTEAILALKGLITVOONDALYDLPNRQLKVQVADRRVI STTDAER-----QAVTTPGLQEAINDL	484	
		IV →	
PGN	-----NRG-----RVLRRKSGT--EPLIRVWVGEDEAQVTEFAHRIADAVKAV-----	445	
PMM/PGM	RVDYYPKG-----WGLVRSANT--FPVLVLRFEADTEEELERIKVFRNQLKAVDSSLPVPF-----	463	
PGM	RLIFADG-----SRIIFRLSGTSGAGATIRLYIDSYEKDNKINQDQVQVMLAPLISIAL-KVSOEQERTGRTAPTAVIT	562	
AGM	VKKYKLS-----RAFVRPSTG--EDVVRVIAEADSQESADHLAHEVSLAVFQLAGGIGERPPQFGF-----	542	
		PO ₄ vazebná doména	

Obr. 2.7: Srovnání aminokyselinových sekvencí zástupců α -D-fosfohexomutasové rodiny. (PGN *E. coli* (gi:401561), PMM/PGM *P. aeruginosa* (gi:113630), králičí PGM (gi:548497) a lidské AGM (gi:12643302). Římskými číslicemi jsou vyznačeny jednotlivé domény, modře jsou zvýrazněny vysoce konzervované aminokyselinové zbytky, růžově aminokyselinové zbytky konzervované pro danou skupinu enzymů. Popis v textu.

2.3.3 Fylogenetická analýza α -D-fosfohexomutasové rodiny

Pomocí ET (Evolutionary Trace) metody (Lichtarge *et al.*, 1996) bylo analyzováno 69 proteinů α -D-fosfohexomutasové rodiny (Shackelford *et al.*, 2004) a byl sestaven fylogenetický strom (Obr. 2.8). Z obrázku plyne, že rodina je tvořena dvěma hlavními větvemi: 1) proteiny řazenými mezi *N*-acetylglukosaminfosfátmutasy (eukaryotní) a 2) proteiny řazenými do ostatních tří skupin. Tato větev je dále dělena na dvě hlavní podskupiny: a) PGM proteiny a b) PMM/PGM a PGN proteiny (bakteriální). Z navrženého schématu (Obr. 2.8) vyplývá, že AGM proteiny jsou nejvíce se lišící skupinou, kdežto PMM/PGM proteiny a PGN proteiny jsou si nejpříbuznější.



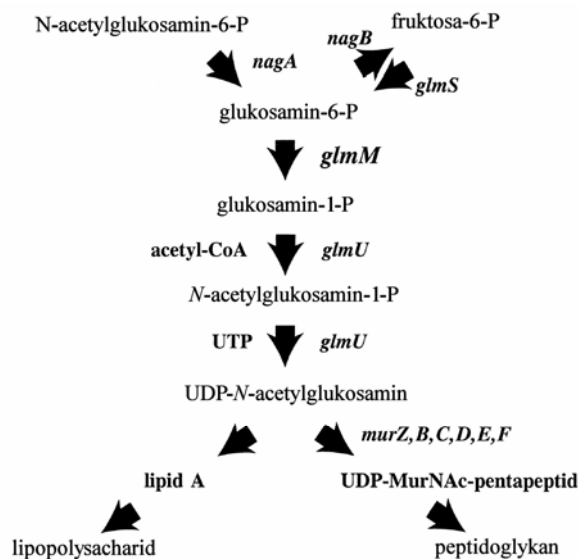
Obr. 2.8: Fylogenetický strom enzymů α -D-fosfohexomutasové rodiny. Převzato z Shackelford *et al.*, 2004.

Dále by bylo možné proteiny dělit na eukaryotní (AGM a PGM) a prokaryotní (PMM/PGM a PGN). Tuto hypotézu potvrzuje i fakt, že byl prokázán horizontální přenos genu pro fosfoglukomutasu PGM mezi eukaryotním hostitelem a bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (Whitehouse *et al.*, 1998). Převaha proteinů PMM/PGM a PGN skupiny u bakterií na druhou stranu naznačuje, že tyto enzymy mohou být využity v diagnostice pro rozpoznání infekce nebo jako cílové molekuly pro nová antibiotika (Lu *et al.*, 1999; Regni *et al.*, 2002).

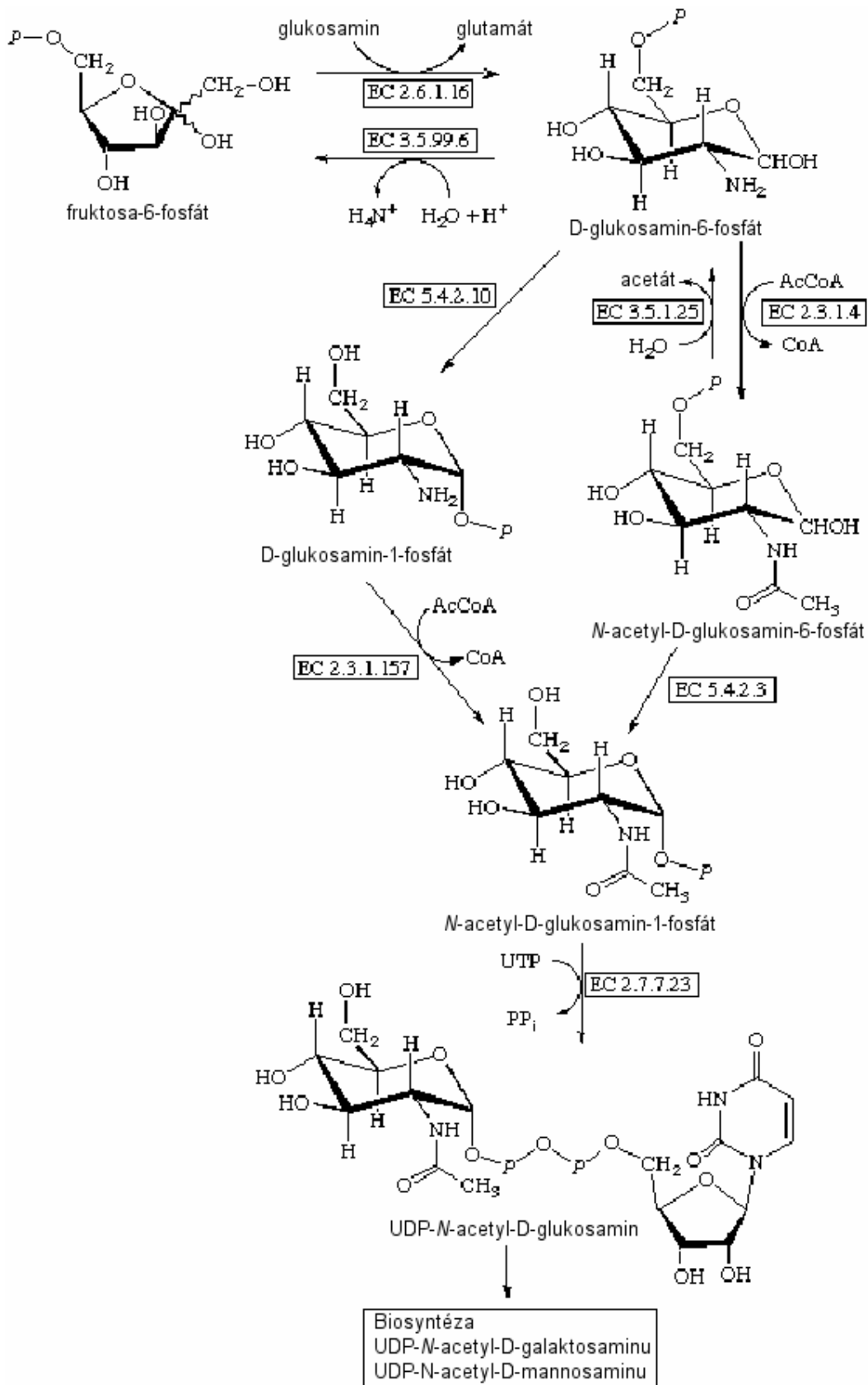
2.3.4 Fosfoglukosaminmutasa GlmM

2.3.4.1 Biosyntéza UDP-*N*-acetylglukosaminu

Fosfoglukosaminmutasa je enzym zodpovědný za přeměnu glukosamin-6-fosfátu a glukosamin-1-fosfátu. Tato reakce je esenciálním krokem v biosyntetické dráze UDP-*N*-acetylglukosaminu, prekursoru složek nezbytných pro syntézu buněčné stěny, a to peptidoglykanu, lipopolysacharidů a teichoových kyselin. Schématické znázornění tvorby a využití UDP-*N*-acetylglukosaminu ukazuje Obr. 2.9. Biosyntéza UDP-*N*-acetylglukosaminu z fruktosa-6-fosfátu u *E. coli* vyžaduje přítomnost tří enzymů, produktů genů *glmS*, *glmM* a *glmU* (Dobrogosz, 1968, Dutka-Malen *et al.*, 1988, Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1993, 1994, 1996, White 1968). Je nutné zdůraznit, že biosyntéza UDP-*N*-acetylglukosaminu se liší mezi prokaryoty a eukaryoty. U bakterií je glukosamin-6-fosfát za přítomnosti fosfoglukosaminmutasy GlmM (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996) přeměněn na glukosamin-1-fosfát a ten je následně acetylován a uridylován bifunkčním enzymem GlmU (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1994). U eukaryot dochází nejprve k acetylaci glukosamin-6-fosfátu enzymem glukosamin-6-fosfát-*N*-acetyltransferasa (Mio *et al.*, 1999), poté dochází k přeměně na *N*-acetylglukosamin-1-fosfát účinkem *N*-acetylglukosaminfosfátmutasy AGM1 (Hofmann *et al.*, 1994) a posledním krokem je uridylyace enzymem UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasa UAP1 (Mio *et al.*, 1998) za vzniku UDP-*N*-acetylglukosaminu (Obr. 2.10).



Obr. 2.9: Tvorba a využití UDP-*N*-acetylglukosaminu u *E. coli*. Převzato z Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996. Popis v textu.



Obr. 2.10: Znázornění biosyntézy UDP-N-acetylglukosaminu. Levá větev představuje posloupnost reakcí u bakterií, pravá u eukaryotních organismů. Převzato z <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/polysacc/UDPGlcN.html>

2.3.4.2 Dosud charakterizované fosfoglukosaminmutasy

První charakterizovanou bakteriální fosfoglukosaminmutasou byla fosfoglukosaminmutasa *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996), poté následovaly fosfoglukosaminmutasy UreC *Helicobacter pylori* (de Reuse *et al.*, 1997), FemR315 (FemD, GlmM) *Staphylococcus aureus* (Jolly *et al.*, 1997) a GlmM *Pseudomonas aeruginosa* (Tavares *et al.*, 2000).

Escherichia coli

Fosfoglukosaminmutasa *E. coli* je syntetizována v neaktivní, defosforylované formě (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Enzym je však aktivní pouze ve fosforylovaném stavu (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996, Jolly *et al.*, 1999). Proces prvotní fosforylace enzymu *in vivo* je neznámý. Existují dvě možné hypotézy (Jolly *et al.*, 2000): 1) jedná se o proces závislý na přítomnosti kinasy a donorem fosfátové skupiny je nukleosidtrifosfát; 2) fosforylace je zajišťována prostřednictvím glukosamin-1,6-difosfátu, reakčního intermediátu. V podmínkách *in vitro* je iniciální fosforylace proteinu purifikovaného z *E. coli* dosaženo autofosforylací v přítomnosti [³²P] ATP. Bylo zjištěno, že k fosforylaci proteinu dochází v pozici Ser 102, a že tento aminokyselinový zbytek je pro enzymatickou aktivitu enzymu nezbytný (Jolly *et al.*, 1999). Mutace vedoucí k záměně serinu 102 na alanin (S102A) vedla u *E. coli* ke ztrátě autofosforylační aktivity (Jolly *et al.*, 2000). Gen pro fosfoglukosaminmutasu GlmM *E. coli* je esenciální (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996) a inaktivace genu vede k depleci prekurzorů pro tvorbu peptidoglykanu, ke změnám tvaru buněk a následně, když dojde ke snížení obsahu peptidoglykanu pod kritickou hodnotu 60%, k lyzi buněk.

Helicobacter pylori

Gen *ureC* grampozitivní bakterie *H. pylori* je esenciální a vykazuje 43% identitu s genem *glmM* *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Produkt genu *ureC* komplementuje podmíněně letální *glmM* mutantní kmen *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Měřením obsahu peptidoglykanu a fosfoglukosaminmutázové aktivity bylo dokázáno, že se jedná o plně funkční fosfoglukosaminmutasu (de Reuse *et al.*, 1997).

Staphylococcus aureus

Produkt genu *femR315* (známého taktéž pod názvem *femD*) grampozitivní bakterie *S. aureus* taktéž kóduje fosfoglukosaminmutasu. Gen *femR315* (*femD*, *glmM*) *S. aureus* byl identifikován pomocí inzerční mutagenese transpozónem Tn551 (Jolly *et al.*, 1997).

Mutace se projevila sníženou rezistencí k methicilinu a zvýšenou citlivostí k teikoplaninu (Glanzmann *et al.*, 1998). Mutant taktéž vykazoval abnormální složení buněčné stěny, což bylo způsobeno absencí disacharidového pentapeptidu (Wu *et al.*, 1996). Produkt genu je stejně jako UreC *H. pylori* schopen komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* a vykazuje fosfoglukosaminmutázovou aktivitu (Jolly *et al.*, 1997). Geny kódující fosfoglukosaminmutasy u ostatních bakterií jsou esenciální, tudíž se předpokládá, že i tento gen bude esenciální. K inzerci transpozónu došlo 272 bp od terminačního kodonu, zkrácený protein si zachovává charakteristické znaky fosfoglukosaminmutasy a pravděpodobně vykazuje i zbytkovou enzymatickou aktivitu (Jolly *et al.*, 1997). Nicméně bylo navrženo, že u *S. aureus* existuje alternativní metabolická dráha pro tvorbu glukosamin-1-fosfátu (Glanzmann *et al.*, 1998).

Pseudomonas aeruginosa

Gen *glmM* *P. aeruginosa* je homologem genu *algC*, který je esenciální v biosyntetických drahách lipopolysacharidu (LPS) a alginátu (Coyne *et al.*, 1994, Rochetta *et al.*, 1999, Ye *et al.*, 1994, Zielinski *et al.*, 1991). Gen vykazuje významnou homologii s proteiny patřícími do rodiny fosfohexomutas, především s geny popsány jako fosfoglukosaminmutasy (Tavares *et al.*, 2000). Tento enzym vykazuje taktéž výraznou fosfomannomutázovou aktivitu, což by mohlo znamenat jeho účast v biosyntéze LPS a alginátu. Experimenty však prokázaly, že produkt genu *glmM* není schopen komplementovat *algC* mutantní kmen *P. aeruginosa*. Jako možná příčina byla navržena nedostatečná exprese PMM aktivity nebo neschopnost přeměny mannosy-6-fosfátu na mannosu-1-fosfát *in vivo* (Tavares *et al.*, 2000).

2.3.4.3 Alternativní enzymatické aktivity

Kromě glukosaminmutázové aktivity mohou mít enzymy patřící do rodiny fosfohexomutas taktéž fosfoglukomutázovou aktivitu (Jolly *et al.*, 1999) a také aktivitu fosfomannomutázovou (Tavares *et al.*, 2000). Mutace vedoucí k záměně serinu 100 na threonin (S100T) vedla u *GlmM* *E. coli* k 20-krát vyšší nespecifické fosfoglukomutázové aktivitě *GlmM*, což by mohlo znamenat, že přítomnost serinu nebo threoninu v pozici 100 konsensus sekvence fosfohexomutas může být jedním z faktorů určujících specifitu enzymu (Jolly *et al.*, 1999).

3 Cíle práce

3.1 *Proteinkinasa StkP*

První část předkládané dizertační práce se zaměřuje na pochopení mechanismu aktivace Ser/Thr proteinkinasy StkP. Vychází z výsledků diplomové práce autorky a snaží se je prohloubit. Byly stanoveny tyto cíle:

- Připravit kmen *S. pneumoniae*, který bude ve svém genomu kódovat epitopem značenou kinázovou doménu proteinkinasy StkP včetně transmembránové domény.
- Analyzovat autofosforylační aktivitu výše zmíněného proteinu.
- Pokusit se objasnit mechanismus aktivace Ser/Thr proteinkinasy StkP.

3.2 *Fosfoglukosaminmutasa GlmM*

Druhá část této dizertační práce vychází z výsledků laboratoře a věnuje se biochemické charakterizaci fosfoglukosaminmutasy GlmM, předpokládaného substrátu Ser/Thr proteinkinasy StkP. Byly stanoveny tyto cíle:

- Potvrdit fosfoglukosaminmutasu GlmM jako substrát proteinkinasy StkP *in vitro*.
- Připravit rekombinantní protein GlmM.
- Zjistit, zda fosfoglukosaminmutasa *S. pneumoniae* komplementuje podmíněně letální kmen *E. coli* s inaktivovaným genem *glmM*.
- Testovat vliv fosforylace na aktivitu enzymu.
- Připravit rekombinantní protein GlmM s bodovou mutací esenciálního serinu v pozici 101 za alanin a testovat aktivitu mutantního proteinu.
- Identifikovat modifikované aminokyselinové zbytky proteinu GlmM, připravit odpovídající mutantní proteiny a analyzovat jejich aktivitu.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene): (F[']::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44relA1 lac) a *Escherichia coli* JM 109 (Promega): (endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻,m_k⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F['] traD36 proAB lacI^qZΔM15]) byly použity jako recipientní kmeny pro transformaci plazmidovou DNA.

Escherichia coli BL21(DE3) (Novagen): (F⁻, ompT, hsdS_B, (r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3)) byl použit pro nadprodukcí proteinů, kmen nese profág O s genem pro T7 polymerasu.

Escherichia coli 61F (Leeds a Beckwith, 1998): (MC1061/F['] lacI^q, Kan^R) byl použit jako recipientní kmen fúzních konstruktů pro testy dimerizace proteinkinasy StkP.

Escherichia coli GPM83 (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996): (JM83 glmM::kan [pGMM]) a *Escherichia coli* USG83 (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1993): JM83 glmU::kan [pGMU]), podmíněně letální kmeny nesoucí kopie esenciálních genů glmM a glmU na termosenzitivních plazmidech odvozených od pMAK705 (Hamilton *et al.*, 1989), byly použity při testech komplementace.

Escherichia coli BL21(DE3) (pEXstkP) (Nováková *et al.* 2005) a *Escherichia coli* BL21(DE3) (pEXstkP-T) (Nováková *et al.*, 2005), kmeny exprimující epitopem (histidinová kotva (6x His)) značenou proteinkinasy StkP a kinázovou doménu proteinkinasy StkP byly použity jako pozitivní kontroly při imunodetekcích a kinázových reakcích *in vitro*.

Escherichia coli BL21(DE3) (pEXstkP-GST) (Nováková *et al.*, 2005), kmen exprimující proteinkinasy StkP fúzovanou s GST. Kmen byl používán pro nadprodukcí a následnou izolaci StkP-GST.

Streptococcus pneumoniae Cp1015 (Morrison *et al.*, 1984): (Rx derivát, str1; hexA) byl použit jako výchozí kmen pro přípravu mutantních kmenů. Kmen *S. pneumoniae* byl poskytnut Dr. M.C. Trombe, Université Paul Sabatier, Toulouse, Francie.

4.1.2 Vektory

pBluescript II KS⁻ (2,96 kbp; Stratagene) je komerční klonovací fágemid se syntetickým polylinkerem a ampicilinovou rezistencí. Může existovat ve formě dvouřetězcové i jednořetězcové v závislosti na podmínkách kultivace, neboť pro replikaci může být využíván buď ColE1 nebo fl-počátek replikace. Do vektoru byl klonován gen kódující rezistenci na chloramfenikol a následně i amplifikované fragmenty odpovídající částem genu *stkP* a vektor byl použit pro mutagenezi *S. pneumoniae* alelickou výměnou.

pEVP3 (6,3 kbp) (Claverys *et al.*, 1995) je plazmidový vektor, který jsme použili jako zdroj CAT (chloramfenikolacetyltransferasa) kazety kódující rezistenci ke chloramfenikolu. Plazmid poskytl Dr. D.A. Morrison.

pJAH01 (Leeds a Beckwith, 1998) je klonovací vektor, který nese N terminální doménu cI represoru lambda fága. Tento vektor sloužil k přípravě fúzních produktů potřebných pro testy dimerizace proteinkinasy StkP. Vektor poskytl Dr. J. Beckwith.

pET28b a pET42b (5,37 kbp; 5,93 kbp; Novagen) jsou komerční expresní vektory s kanamycinovou rezistencí. Exprese proteinů je pod kontrolou *T7lac* promotoru. pET28 umožňuje fúzi N-terminálního nebo C-terminálního konce cílového proteinu s histidinovou kotvou (6x His). pET42b umožňuje fúzi cílového proteinu s GST (glutathion-S-transferasa) na N-terminálním konci nebo fúzi C-terminálního konce proteinu s histidinovou kotvou.

pTrcHis30 a pTrcHis60 (Pompeo *et al.*, 1998) jsou expresní vektory odvozené od plazmidu pTrc99A (Pharmacia) a sloužily pro nadprodukcii fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích variant. Protein byl fúzován s histidinovou kotvou na N-, respektive C-konci. Vektory poskytl Dr. D. Mengin-Lecreulx.

4.1.3 Bakteriofágy

λ cI bakteriofág, reprimovatelný cI represorem a virulentní bakteriofág λ vir, který není reprimován cI represorem (Leeds a Beckwith, 1998) byly použity v testech dimerizace proteinkinasy StkP. Bakteriofágy poskytl Dr. J. Beckwith.

4.1.4 Kultivační půdy

Množství jednotlivých složek je udáváno na 1 l půdy. Pevné půdy byly připraveny přidáním agarů (15 g/l). Top agar byl připraven přidáním agarů do tekuté půdy (7 g/l). Do

selektivních půd byla přidávána antibiotika (u pevných půd po rozvaření a ochlazení na 50°C) na výslednou koncentraci: Amp (ampicilin) 100 µg/ml; Cm (chloramfenikol) 10 µg/ml (*S. pneumoniae*) a 25 µg/ml (*E. coli*); Kan (kanamycin) 50 µg/ml, Tet (tetracyklin) 12,5 µg/ml (tekutá půda) a 8 µg/ml (pevná půda), Rif (rifampicin) 1 µg/ml (*S. pneumoniae*) a 200 µg/ml (*E. coli*).

Půdy určené pro kultivaci *E. coli*:

Půda LB: trypton 10 g; yeast extract 5 g; NaCl 10 g; pH 7.5
Půda SOB: trypton 20 g; yeast extract 5 g; NaCl 0,58 g; KCl 0,186 g; po sterilizaci přidáno 10 ml 1 M MgCl₂; 10 ml 1 M MgSO₄
Půda NZY: NZ amine 10 g; yeast extract 5 g; NaCl 8 g; po sterilizaci přidáno 10 ml 1 M MgSO₄ (Guzman *et al.*, 1992)

Půdy a média určené pro kultivaci *S. pneumoniae*:

Médium CAT: casitone 10 g; trypton 5 g; yeast extract 1 g; NaCl 5 g (Morrison *et al.*, 1983)
Kompletní CAT: na 1 l CAT přidáno: 34 ml 0,5 M K₂HPO₄; 10 ml 20% glukosa; (CATc) pH 7.5
Médium CTM: na 1 l kompletního CAT média přidáno: 10 ml 0,1 M CaCl₂; 25 ml 8% BSA (hovězí sérový albumin frakce V); úprava pH na 7.8 1 N NaOH
Gelosa D: dextrosa 1g; NaCl 5 g; neopepton 5 g; Tris 1,25 g; casitone 10g; agar 10 g

4.1.5 Chemikálie

	<i>Firma</i>	<i>Zkratka</i>
Acetylkoenzym A	Sigma	AcCoA
Agarosa LE Analytical Grade	Promega	
Akrylamid 4 x krystalický	Amersham	
Aminokapronová kyselina	Fluka	
Ampicilin	Fluka	Amp
Bacto-agar	Difco	

Bacto-casitone	Difco	
BisTris(hydroxymethyl) aminomethan	Sigma	BisTris
Blokační činidlo	Boehringer	
Bromfenolová modř	Sigma	BPB
5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	Boehringer	X-fosfát
Coomassie blue G-250	Serva	
Coomassie blue R-250	Merck	
Competence Stimulating Peptid	Biopharm	CSP
2' - Deoxyadenosin-5'-trifosfát	Promega	dATP
2' - Deoxycytidin-5'-trifosfát	Promega	dCTP
2' - Deoxyguanosin-5'-trifosfát	Promega	dGTP
2' - Deoxythymidin-5'-trifosfát	Promega	dTTP
Deoxycholát sodný	Merck	DCNa
Digoxigenin-11 dUTP	Roche	DIG-dUTP
Dimethylsulfoxid	Sigma	DMSO
Dithiotreitol	Promega	DTT
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS
Ethidium bromid, p.a.	Sigma	EtBr
Glukosa-1-fosfát	Fluka	Glc1P
Glukosa-1,6- difosfát	Fluka	Glc1,6diP
Glukosamin-1-fosfát	Sigma	GlcN1P
Glukosamin-6-fosfát	Sigma	GlcN6P
N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid	Sigma	HEPES
Hovězí sérový albumin	Exbio	BSA
Chloramfenikol	USB	Cm
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	Fluka	IPTG
Kanamycin	Fluka	Kan
Kys. ethylenaminotetraoctová, dvojsodná sůl, p.a.	Serva	EDTA
Kys. 1,4-piperazindiethan- sulfonová	Sigma	PIPES
6x Loading Dye Solution	Fermentas	
Maltosa	Sigma	

Mannosa-1-fosfát	Sigma	Man1P
N,N'-methylenbisakrylamid 2 x kryst.	Serva	bisAA
Neopepton	Difco	
Nikotinamindinukleotid	Sigma	NAD
Nitroblue tetrazolium salt	Boehringer	NBT
NZ amine	Difco	NZ
Peroxosíran amonný, p.a.	Lachema	APS
Proteinasa K	Boehringer	
Rifampicin	Sigma	Rif
RNasa A	Promega	
Tetracyklin	USB	Tet
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin	Serva	TEMED
Tricine	Sigma	
Triethylamin	Fluka	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva	Tris
Triton X-100	Serva	
Tryptone Peptone	Difco	
Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate)	Sigma	
Yeast extract	Difco	YE
Uridin-5'-trifosfát	Sigma	UTP

Ostatní chemikálie byly běžně dostupné látky analytické čistoty.

4.1.6 Radiochemikálie

Adenosin-5 [γ - 32 P]trifosfát	MP Radiobiochemicals	[γ - 32 P]ATP
Acetylkoenzym A [acetyl- 14 C]	MP Radiobiochemicals	[acetyl- 14 C]

4.1.7 Enzymy pro testy aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM

Fosfoglukoisomerasa	Sigma	PGI
Fosfomannoisomerasa	Sigma	PMI
Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	Sigma	GDH
Glukosamin-6-fosfátdeaminasa	(Altamirano, 1998)	NagB

4.1.8 Enzymy modifikující DNA

<i>Pfu</i> polymerasa	Stratagene	
Rec <i>Taq</i> DNA polymerasa	Top-Bio	<i>Taq</i> pol
Restrikční endonukleasy	NEB, Fermentas	
T4 DNA-ligasa	Fermentas	

4.1.9 Enzymy modifikující RNA

Improm II TM reverzní transkriptasa	Promega
--	---------

4.1.10 Enzymy modifikující proteiny

Thrombin	Novagen
----------	---------

4.1.11 Oligonukleotidy

CAT1 (<i>Bam</i> HI)	5'-CGC <u>GGA TCC</u> GAA AAT TTG TTT GAT TTT TAA-3'
CAT2 (<i>Xba</i> I)	5'-GCT <u>CTA GAG</u> GGT TCC GAC CGT CAA CGT CAA-3'
Cp	5'- <u>GCT CTA GAG</u> CCC TTG TTT CTA TGA ACG A-3'
C-term-f (<i>Afl</i> III)	5'-TCC <u>ACATGTC</u> CCTGCAACCATTGCC-3'
GlmM-f (<i>Nde</i> I)	5'-GAACTGACATCATATGGGTAAATATTTTGGG-3'
GlmM-f (<i>Bam</i> HI)	5'-TTT <u>GGATCC</u> ATGGGTAAATATTTT-3'
GlmM-f (<i>Bsp</i> LU11I)	5'-TTT <u>ACATGTC</u> GGGTAAATATTTTGGGACT-3'
GlmM-r (<i>Bgl</i> II)	5'-TTC <u>AGATCT</u> GTCAATCCCAATTTTCAGC-3'
GlmM-r (<i>Xho</i> I)	5'-CCGCTCGAGGTCAATCCCAATTTTCAGC-3'
GlmM-r (<i>Hind</i> III)	5'-TTC <u>AAGCTT</u> TTAGTCAATCCCAAT-3'
GlmM-r term(<i>Xho</i> I)	5'-CCGCTCGAGTTAGTCAATCCCAATTTTCAGC-3'
GlmUR6-f (<i>Nde</i> I)	5'-TCATTCAC <u>ATATG</u> CGGAATGATTTG-3'
GlmUT4-f (<i>Nde</i> I)	5'-AGAGAAG <u>CATATG</u> TCAAATTTTGCC-3'
GlmU-r (<i>Xho</i> I)	5'-TAGCTCGAGCTACTGGTTCTTAGG-3'
GlmU-f (<i>Bam</i> HI)	5'-GAGGATCC <u>ATGTCAA</u> ATTTTGCC-3'
GlmU-r (<i>Xba</i> I)	5'-ATTCTAGACTACTGGTTCTTAGG-3'
Histag-r	5'-GTGATGGTGATGGTGATG-3'
KD-f (<i>Eco</i> RI)	5'-CGC <u>GAA TTC</u> CAT TAT CCT CTT TCT AAT GA-3'

KD-r (<i>AflIII</i>)	5'-CAA <u>ACATGTA</u> ACAAGTCTACATA-3'
KD2-r (<i>SacII</i>)	5'-TGCCCGCGGC <u>CAAATA</u> AAGGTCGCCACTC-3'
KDTM-r (<i>AflIII</i>)	5'-CAC <u>ACATGTA</u> AATGGCAATGGTTGC-3'
KDSTK-f (<i>XbaI</i>)	5'-GCTCTAGAGATGCCAGATTTGTGATA-3'
KMP-r	5'-ACGGACTGCTTCTTCATTAG-3'
KRT-f	5'-CGGCAAGATTTTTGCCGGAC-3'
KRT-r	5'-GCGCATAGCCAAGAGAATTTG-3'
S101A-f (<i>SacII</i>)	5'-TGATTTCCGCGGCACACAACCC-3'
S101A-r (<i>SacII</i>)	5'-GTGTG <u>CCGCGG</u> AAATCATGAC-3'
S101AS99A	5'-GTGCCGGTGTCATGATTGCCGCGGCAC-3'
S101AS99A antisense	5'-GTGCCGCGGCAATCATGACACCGGCAC-3'
StkP-f (<i>AflIII</i>)	5'-GGA <u>ACATGT</u> ATGATCCAAATCGGC-3'
StkP-r (<i>AflIII</i>)	5'-CTG <u>ACATGT</u> AGGAGTAGCTGAATG-3'
SX	5'-GAACAATTCCTCGAGTATGG-3'
TM-r (<i>BamHI</i>)	5'-CGCGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGT GATGAATGGCAATGGTTGCAGGAG-3'
WTS99A	5'-GCAAGTGCCGGTGTCATGATTGCTGCTAGCCACA-3'
WTS99A antisense	5'-TGTGGCTAGCAGCAATCATGACACCGGCACTTGC-3'

Všechny oligonukleotidy byly syntetizovány společností VBC-GENOMICS (Viedeň). Podtržením jsou vyznačena restrikční místa.

4.1.12 Protilátky

Primární myši monoklonální protilátka (IgG) proti histidinové kotvě Sigma
Sekundární kozí protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou Amersham

4.1.13 Komerční soupravy

Izolace plazmidové DNA *E. coli*-QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
Izolace DNA z agarosového gelu-Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN)
Imunodetekce-Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce)
Měření koncentrace proteinů-BCA Protein Assay Reagent (Pierce)

Izolace RNA-RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

Přečištění RNA-DNA free (Ambion)

Cílená mutageneze-QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

4.1.14 DNA standardy

DNA 1 kb ladder Fermentas

DNA 1 kb ladder (značený DIG-11-dUTP) NEB

DNA 100 bp ladder NEB

4.1.15 Proteinové standardy

Prestained Protein Marker Broad Range NEB

High Molecular Weight Calibration Kit Amersham

4.1.16 Software

Mapy klonovacích vektorů byly sestaveny pomocí programu Clone manager Version 4.01 (Scientific & Educational Software).

Analýza radiogramů byla provedena pomocí programu Aida-Advantage Image Data Analyzer Version 3.28 (Izotopenmeßgeräte GmbH).

Pro analýzu sekvencí byla použita sestava programů Lasergene (Dnastar).

Sekvenační data byla kontrolována pomocí programu Chromas.

4.2 Metodika

4.2.1 Kultivace mikroorganismů

4.2.1.1 Kultivace *E. coli*

Kulturu *E. coli* jsme kultivovali v LB médiu (za stálého třepání) nebo na LB agaru při 37°C (pokud nebude uvedeno jinak). Pro selekci buněk nesoucích žádoucí plazmid jsme do média přidávali příslušné antibiotikum.

4.2.1.2 Kultivace *S. pneumoniae*

Kulturu *S. pneumoniae* jsme kultivovali (staticky) v komplexním médiu ve vodní lázni při 37°C.

4.2.2 DNA manipulace

4.2.2.1 Izolace plazmidové DNA *E. coli* alkalickou lyzí

Princip metody spočívá v denaturaci DNA alkalickým pH následované rychlou renaturací. Plazmidová ccc-forma DNA (covalently close circle) renaturuje rychle, kdežto chromozomální 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 13 000 g a buňky jsme resuspendovali ve 100 µl roztoku PEB1 (50 mM glukosa; 25 mM Tris pH 8.0; 10 mM EDTA). Přidali jsme 200 µl roztoku P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS), šetrně promíchali a inkubovali 5 minut při laboratorní teplotě. Dále jsme přidali 150 µl 3 M acetátu draselného (pH 5.2), opět šetrně promíchali a inkubovali 10 minut na ledu. Po centrifugaci (10 min, 13 000 g) jsme odebrali supernatant obsahující plazmidovou DNA. K supernatantu jsme přidali jeden objem isopropanolu. Sraženinu plazmidové DNA jsme odstředili centrifugací (10 min, 13 000 g) a promyli 80% ethanolem. Plazmidovou DNA jsme vysušili ve vakuu a rozpustili ve 20 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0) s RNAsou A (20 µg/ml, Promega).

4.2.2.2 Izolace plazmidové DNA *E. coli* pomocí komerční soupravy

Pro přípravu plazmidové DNA v dostatečné čistotě jsme používali komerční soupravu QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Při práci jsme dodržovali pokyny výrobce.

4.2.2.3 Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*

Kulturou *S. pneumoniae* jsme inokulovali kompletní CAT médium (CATc) a inkubovali do OD₄₀₀= 0,5 (začátek exponenciální fáze). Po centrifugaci (10 min, 10 000 g, 4°C) jsme buňky promyli fyziologickým roztokem a opět centrifugovali (10 min, 6 500 g, 4°C). Buňky jsme resuspendovali v 250 µl roztoku SEDS (150 mM NaCl; 30 mM EDTA; pH 8.0 : 0,5% deoxycholát sodný; 0,25% SDS ; 24:1) a inkubovali při 37°C, dokud nedošlo k lyzi kultury. Přidali jsme 5 µl proteinasy K (2 mg/ml, Boehringer) a inkubovali 15 minut při 56°C. Po přidání 250 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0) následovala extrakce směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1). Vodnou fází jsme separovali centrifugací 20 minut při 6 500 g při laboratorní teplotě a znovu extrahovali směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol. Počet extrakcí závisel na množství mezifáze. Poslední extrakci jsme provedli samotným chloroformem a poté precipitovali chromozomální DNA přidáním 0,6 objemu isopropanolu a 0,1 objemu 3 M NaOAc pH 5.2. Chromozomální DNA jsme promyli 80% ethanolem, nechali oschnout na vzduchu a rozpustili v TE pufru.

4.2.2.4 Precipitace DNA isopropanolem

K roztoku DNA jsme přidali 0,1 objemu 3 M acetátu sodného, pH 5.2 (vysoká iontová síla) a jeden objem isopropanolu. Roztok jsme promíchali (vortex) a centrifugovali 10 minut při 13 000 g. Supernatant jsme odsáli a sraženinu DNA promyli 200 µl 80% ethanolu. Po centrifugaci (5 min, 13 000 g) jsme vysráženou DNA vysušili ve vakuu a rozpustili v destilované vodě.

4.2.2.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

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.

4.2.2.6 Ligace molekul DNA

Ligaci molekul DNA jsme prováděli ve 20 μ l za dodržení molárního poměru mezi vektorem a fragmentem 1:2. Používali jsme 1 u T4 DNA ligasy a odpovídající ligační pufr (Fermentas; 40 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP; pH 7.8). Reakční směs jsme inkubovali přes noc při laboratorní teplotě.

4.2.2.7 Transformace kompetentních buněk *E. coli* plazmidovou DNA

Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky jsme připravovali metodou podle Inoue a kol. (1990). 100 ml půdy 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 OD₆₀₀ = 0,6, kultivace byla přerušena a buňky jsme ochladili 10 minut na ledu. Po centrifugaci (10 min, 2500 g, 4°C) jsme buňky resuspendovali v 32 ml ledového pufru TB (10 mM PIPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; sterilizace filtrací, poté přidáno MnCl₂; (výsledná koncentrace 55 mM); pH 6.7). Suspenzi jsme ochladili 10 minut na ledu a centrifugovali za stejných podmínek. Buňky jsme resuspendovali v 8 ml pufru TB a následně jsme přidávali DMSO (Sigma) do konečné koncentrace 7%. Poté jsme buňky rozdělili do alikvótů a uchovávali při -70°C.

Transformace buněk plazmidovou DNA

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

Kompetentní buňky jsme rozmrazili na ledu a přidali k nim ligační směs. 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 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.

4.2.2.8 Transformace buněk *S. pneumoniae*

Transformace v pevném médiu s použitím CSP (Competence Stimulating Peptide)

Tato metoda je založena na indukci stavu kompetence přidáním exogenního syntetického kompetenčního feromonu CSP (Biopharm).

Kulturu jsme zaočkovali do CTM média a staticky kultivovali při 37°C do OD₄₀₀= 0,1-0,12. Suspenzi jsme naředili a 10 µl naředěných buněk (ředění 10⁻¹-10⁻⁵) jsme přidali ke směsi: 1 ml CTM, 1 ml směsi CTM + 2,4% agar (1:1), 500 µg CSP, 2 µg DNA fragmentu a vyseli na misky. Po 4 hodinové inkubaci při 37°C jsme misky převrstvili gelosou D s příslušným antibiotikem.

4.2.2.9 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu

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

Analytická DNA elektroforéza

Pro analýzu DNA jsme používali horizontální agarosovou elektroforézu v pufru TAE (40 mM Tris; 1 mM Na₂EDTA; pH 8.0). Hustota agarosového gelu závisela na velikosti dělených fragmentů a do gelu jsme přidávali interkalační činidlo ethidium bromid (0,5 µg/ml gelu) 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; 60 mM EDTA). Fragменты jsme separovali při napětí 5 V/cm a jejich velikost odečítali podle DNA standardu.

Preparativní DNA elektroforéza

Fragменты separované v agarosovém gelu jsme izolovali pomocí komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (QIAGEN) dle návodu výrobce.

4.2.2.10 Přenos DNA na membránu (Southern blot)

K přenosu DNA z agarosového gelu na nylonovou membránu Hybond-N⁺ (Amersham) jsme používali vakuový přístroj a při sestavování jsme se řídili pokyny výrobce. Po spuštění vakuové pumpy jsme na DNA v agarosovém gelu působili 2 x 15

minut denaturačním roztokem (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), 2 x 10 minut neutralizačním roztokem (3 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7.5) a 75 minut blotovacím roztokem (20 x SSC) (300 M citrát sodný; 3 M NaCl; pH 7.0). Po přenosu jsme membránu osušili a DNA přenesenou na membráně jsme 4 minuty fixovali UV zářením. Membránu jsme vložili do hybridizační zkumavky a inkubovali 1 hodinu v hybridizačním roztoku (5 x SSC; 1% (w/v) blokovací činidlo (Boehringer Mannheim); 0,1% (w/v) N-lauroylsarcosine; 0,02% (w/v) SDS) v hybridizační peci při 68°C. DNA sondu proti kinázové doméně proteinkinasy StkP (Pallová, 2003) jsme denaturovali 10 minut při 80°C a poté rychle ochladili na ledu. Denaturovanou sondu jsme přidali do hybridizační zkumavky a inkubovali přes noc při 68°C. Po hybridizaci jsme membránu promyli 2 x 5 minut roztokem 2 x SSC s 0,1% SDS při laboratorní teplotě a 2 x 15 minut roztokem 0,1 x SSC s 0,1% SDS při 68°C. Po promytí jsme membránu krátce (1 min) inkubovali v pufru 1 (0,1 M kys. maleinová; 0,15 M NaCl; pH 7.5) s 0,3% Tweenu 20. Následovala 30 minutová inkubace membrány v pufru 2 (blokační činidlo rozpuštěné 1:10 v pufru 1) a poté jsme k membráně přidali protilátku proti digoxigeninu (1 µl na 5 ml pufru 2) a inkubovali 30 minut. Nenavázanou protilátku jsme odstranili promytím 2 x 15 minut puftrem 1. Membránu jsme ekvilibrovali 2 minuty puftrem 3 (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9.5). Připravili jsme detekční roztok (3,5 µl X-fosfátu a 4,5 µl NBT na 1 ml pufru 3) a membránu jsme spolu s roztokem zatavili do fólie a inkubovali na tmavém místě do zbarvení. Reakce byla ukončena opláchnutím membrány v destilované vodě.

4.2.2.11 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Princip metody PCR spočívá v opakování tří po sobě jdoucích kroků s řízenými teplotními a časovými podmínkami. Jeden cyklus je tvořen těmito kroky: denaturace templátu, hybridizace oligonukleotidů k templátu a prodlužování DNA řetězce směrem od oligonukleotidů (elongace). Pro správnou termodynamiku hybridizace oligonukleotidů na DNA a pro zabránění vzniku nespecifických produktů je nutné zvolit vhodnou teplotu ($T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$).

4.2.2.12 Cílená mutagenese s využitím komerční soupravy

Pro přípravu rekombinantního proteinu GlmM se záměnou serinu v pozici 99 za alanin jsme využili komerční soupravu QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit

(Stratagene). Princip této rychlé metody spočívá v amplifikaci obou vláken plazmidu za použití oligonukleotidů s požadovanou záměnou, následovanou destrukcí mateřského templátu pomocí restriční endonukleasy *DpnI*, která rozpoznává pouze metylované sekvence 5'-Gm6ATC-3'. DNA opracovaná *DpnI* je použita k transformaci buněk *E. coli* XL1-Blue. Sekvence vytvořených vektorů byla ověřena sekvenováním.

4.2.3 Manipulace s RNA

4.2.3.1 Izolace RNA *S. pneumoniae*

Bakteriální kulturu jsme kultivovali v CATc médiu do $OD_{400} = 0,5$ nebo 1, buňky jsme odstředili a RNA jsme izolovali s využitím komerční soupravy RNeasy Mini Kit (QIAGEN) podle pokynů výrobce. Izolovaná RNA byla přečištěna pomocí soupravy DNA free (Ambion) podle instrukcí výrobce a uchovávána v -80°C .

4.2.3.2 Reverzní transkripce

cDNA byla amplifikována dle RNA templátu pomocí ImProm-IITM reverzní transkriptasy (Promega) dle pokynů výrobce. 1 μg celkové RNA jsme smíchali s 20 pmol oligonukleotidu (hexamer), doplnili vodou do 5 μl , inkubovali 5 min při 70°C a poté ochladili 5 min na ledu. K reakční směsi jsme přidali 4 μl 5x koncentrovaného reakčního pufru, 2,4 μl 25 mM MgCl_2 , 1 μl 10 mM dNTP, 1 μl RNaseOUT (1u/ μl , Invitrogen), 1 μl ImProm-IITM reverzní transkriptasy a vodou doplnili do 20 μl . Hybridizace oligonukleotidu probíhala 5 min při 25°C , následovala reverzní transkripce 1 hod při 42°C a reakce byla ukončena inkubací 15 min při 70°C .

5 μl reakční směsi obsahující cDNA jsme použili pro PCR reakci, která obsahovala 1 x *Taq* pufr bez MgCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 1 μM oligonukleotidy a 5u *Taq* polymerasy. Počáteční denaturace probíhala 1 min při 95°C . V následujících 35 cyklech došlo k amplifikaci cDNA (denaturace 95°C 30 vteřin, hybridizace oligonukleotidů při 50°C 30 vteřin, elongace při 72°C 45 vteřin). Závěrečná elongace probíhala 5 min při 72°C .

4.2.4 Manipulace s proteiny

4.2.4.1 Frakcionace proteinů

Bakteriální kulturu *S. pneumoniae* jsme pěstovali v 50 ml kompletního média CAT do $OD_{400} = 1$ a poté odstředili (10 min, 10 000 g). Buňky jsme promyli ve 20 ml pufru (50 mM Tris, pH 7.5) a znovu centrifugovali. Následně jsme buňky promyli 1 ml pufru PSB (50 mM Tris, pH 7.5; 100 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 1 mM DDT; 10% glycerol) (10 min, 6 000 g) a nakonec resuspendovali v 0,5 ml tohoto pufru. Buňky jsme dezintegrovali sonikací 4 x 10 vteřin (sonikátor Labsonic 2000) a nerozbité buňky jsme odstředili (10 min, 6 000 g). Ze supernatantu jsme odebrali 100 μ l a uschovali v -20°C (celkový lyzát). Zbýlých 400 μ l jsme frakcionovali centrifugací 1 hodinu při 100 000 g (4°C), abychom oddělili membránovou frakci od frakce cytoplazmatické.

4.2.4.2 Izolace epitopem značených forem proteinkinasy StkP z bezbuněčného lyzátu *S. pneumoniae*

Kulturu *S. pneumoniae* jsme pěstovali v 50 ml kompletního média CAT do $OD_{400} = 1$ a poté odstředili (10 min, 10 000 g). Buňky jsme promyli v Tris pufru (50 mM Tris, pH 7.5), znovu odstředili a resuspendovali v lyzačním pufru (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 1% Triton X-100) a přidali inhibitory proteas a inhibitory fosfatas. Buňky jsme dezintegrovali sonikací 4 x 10 vteřin (sonikátor Labsonic 2000) a nerozbité buňky jsme odstředili (10 min, 6 000 g). Buněčný lyzát jsme frakcionovali a cytoplazmatické a membránové frakce jsme inkubovali s resinem pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou (Clontech) 1 hod při 4°C na rotační třepačce. Resin s navázanými proteiny jsme 3 x promyli, přidali SDS vzorkový pufr a povařili 3 min při 100°C . Proteiny jsme dělili na 10% SDS elektroforéze a poté přenesli na PVDF membránu a proteiny identifikovali pomocí imunodetekce.

4.2.4.3 Expresse proteinů v *E. coli*

Buňky *E. coli* BL21(DE3) obsahující rekombinantní expresní vektory (pET) jsme kultivovali v LB médiu na reciproké třepačce při 30°C do dosažení $OD_{600} = 0,6$. Ke kultuře jsme přidali IPTG do konečné koncentrace 1 mM a po hodině růstu rifampicin do konečné koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$. Po následné 3 hodinové kultivaci byly buňky odstředěny (10 min,

10 000 g), resuspendovány, promyty v Tris pufru (50 mM Tris, pH 7.5) a opětovně odstředěny. Poté jsme buňky resuspendovali v 2 ml sonikačního pufru (50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl), přidali inhibitory proteas (Sigma) a dezintegrovali na přístroji French Pressure cell press (SLM Aminco). Nerozbité buňky a buněčné stěny jsme odstranili centrifugací (10 min, 5 000 g).

Buňky *E. coli* GPM83 nesoucí rekombinantní expresní vektory (pTrc) jsme kultivovali v LB médiu na reciproké třepačce při 37°C a po dosažení $OD_{600} = 0,6$ jsme ke kultuře přidali IPTG do konečné koncentrace 1 mM. Po následné 3 hodinové kultivaci byly buňky odstředěny (10 min, 10 000 g), resuspendovány a promyty v Tris pufru (50 mM Tris, pH 7.5) a opětovně odstředěny. Poté jsme buňky resuspendovali v 2 ml sonikačního pufru (50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl), přidali inhibitory proteas (Sigma) a dezintegrovali na přístroji French Pressure cell press (SLM Aminco). Nerozbité buňky a buněčné stěny jsme odstranili centrifugací (10 min, 5 000 g).

4.2.4.4 Izolace proteinů s histidinovou kotvou

Pro izolaci proteinů fúzovaných s histidinovou kotvou jsme používali imobilizované afinitní chromatografie (immobilized metal affinity chromatography), TALONspin Column Kit (Clontech). Jejím principem je vazba polyhistidinového konce nadprodukovaného proteinu na kationt Co^{2+} chelatačního činidla ukotveného k polymeru. Izolace probíhala za nedenedurujících podmínek. Hrubý extrakt jsme nanесли na kolonu a jemně protřepávali 5 min při pokojové teplotě a poté jsme kolonu odstředili 2 min při 700 g. Kolonu jsme 3 x promyli promývacím pufrém (50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl) a navázané proteiny jsme uvolnili přidáním elučního pufru (50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 100 mM imidazol). Vzorek jsme dialyzovali přes noc při 4°C proti roztoku 50 mM Tris, pH 7.5; 100 μ M EDTA; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 10% glycerol nebo proti roztoku 20 mM HEPES, pH 7.2; 0,3 mM $MgCl_2$. Následně byly proteiny zahuštěny centrifugací při 4°C 5 000 g za použití koncentrátoru Centricon (Amicon).

4.2.4.5 Izolace proteinů fúzovaných s GST (Glutathion-S-Transferasa)

Pro izolaci nadprodukovaných proteinů fúzovaných s GST jsme používali afinitní chromatografii, GST•Bind™ Kit (Novagen). Buňky *E. coli* s nadprodukovanými proteiny jsme po promytí dezintegrovali v GST pufru (4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 ; 0,137

M NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7.3) pomocí French Pressure cell press. Nerozbité buňky jsme odstranili centrifugací (10 min, 5 000 g) a hrubý lyzát inkubovali 10 min s 1,5 ml GST-vazebné sepharosy v koloně. Nenavázané proteiny jsme odstranili promytím kolony GST pufrem. Navázané proteiny jsme uvolnili elučním pufrem (10 mM redukovaný glutathion; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Izolované proteiny jsme dialyzovali přes noc při 4°C proti roztoku 50 mM Tris, pH 7.5; 100 µM EDTA; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 10% glycerol. Následně byly proteiny zahuštěny centrifugací při 4°C 5 000 g za použití koncentrátoru Centricon (Amicon).

4.2.4.6 Měření koncentrace proteinů

Množství proteinů jsme stanovovali podle Smith a kol. (1985) pomocí komerční soupravy (BCA Protein Assay Reagent). Postupovali jsme podle pokynů výrobce a jako standard pro vytvoření kalibrační křivky jsme použili ředící řadu zásobního roztoku BSA (2 mg/ml).

4.2.4.7 Štěpení proteinů thrombinem

Pro štěpení proteinu fosfoglukosaminmutasy GlmM a její mutantní formy jsme použili sekvenčně specifickou proteasu thrombin (Novagen), která rozeznává sekvenci LeuValProArg↓GlySer. Postupovali jsme podle instrukcí výrobce. Nejlepších výsledků jsme dosáhli při inkubaci přes noc při 37°C za použití 0,04 u thrombinu/20 µg proteinu.

4.2.4.8 Elektroforetická analýza proteinů

SDS-PAGE

K analýze proteinů jsme využívali vertikální SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (SDS-PAGE). Analyzovaný vzorek jsme před nanesením inkubovali s SDS vzorkovým pufrem 3 minuty při 100°C. Elektroforéza probíhala v SDS elektrodovém pufru (25 mM Tris; 200 mM glycin; 0,1% SDS) při 50 mA. Používali jsme 10% nebo 12% separační gel a 4% zaostřovací gel.

Nativní elektroforéza

K analýze proteinů v nativním nedenaturovaném stavu jsme používali Blue-native elektroforézu (BN-PAGE) (Schagger, 1994). Podstatou této metody je absence denaturujícího dodecylsulfátu (SDS) a pohyblivost proteinů v gelu je zajištěna vazbou Coomassie Blue, která uděluje proteinům záporný náboj. Proteiny byly děleny v gradientovém separačním gelu (5-13%) (složení viz *Tab. 4.1*) a složení elektrodových pufrů bylo následující: a) katodový pufr (50 mM Tricine; 15 mM BisTris, pH 7.0; 0,02% Coomassie Blue G 250), b) anodový pufr (50 mM BisTris, pH 7.0).

Tab. 4.1: Příprava gradientových gelů.

Separací gel	5%	13%	Zaostřovací gel	4%
48% akrylamid, 2% bisAA	1,25 ml	2,7 ml	48% akrylamid, 2% bisAA	0,5 ml
Pufr *	4 ml	3,3 ml	Pufr *	2 ml
Glycerol	-	2 g	Glycerol	-
APS	66 µl	33 µl	APS	50 µl
TEMED	6,6 µl	3,3 µl	TEMED	5 µl
H ₂ O	6,7 ml	2 ml	H ₂ O	3,5 ml

* Pufr (150 mM BisTris, pH 7.0; 1,5 M aminokaprová kyselina)

2D elektroforéza

Pro oddělení jednotlivých fosforylovaných izoform fosfoglukosaminmutasy GlmM byla použita dvourozměrná elektroforéza. V prvním rozměru jsou proteiny děleny na základě svého izoelektrického bodu izoelektrickou fokusací. Následně jsou proteiny děleny pomocí SDS-PAGE podle své molekulové hmotnosti. Po separaci ve druhém směru byly gely barveny koloidní Coomassie blue nebo stříbřeny.

4.2.4.9 Barvení proteinů v separačním gelu

Proteiny v gelu jsme barvili 30 minut barvicím roztokem Coomassie blue (45% methanol, 10% kyselina octová, 0,1% Coomassie blue R-250) a gel odbarvili promýváním v odbarvovacím roztoku (20% methanol, 10% kyselina octová).

4.2.4.10 Přenos proteinů na membránu (Western přenos)

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluoride) membránu Immobilon-P (Millipore) pomocí přístroje The Panther Semi-Dry Electrobloetter (Owl Scientific). Při sestavování aparatury jsme se řídili pokyny výrobce. Přenos probíhal 2 hodiny v přenosovém pufru (39 mM glycin; 48 mM Tris; 0,0375% SDS; 20% methanol) za podmínek stanovených výrobcem (0,8 A/cm² membrány).

4.2.4.11 Imunodetekce

Pro imunodetekci epitopem značených proteinů jsme použili monoklonální myší protilátku proti histidinové kotvě (Sigma) a sekundární protilátku proti myším IgG konjugovanou s křenovou peroxidasou (Amersham). PVDF membránu s imobilizovanými proteiny jsme smočili, opláchli roztokem TBS (50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7.5) a 1 hodinu inkubovali v pufru TBS s 5% BSA při pokojové teplotě (vysycení membrány v místech, kde nebyly přítomny proteiny). Membránu jsme promyli 3 x 5 minut v pufru TBS a poté inkubovali přes noc s primární protilátkou ve 4°C (protilátka byla naředěna 2000 x v pufru TBS s 1% BSA). Nenavázanou protilátku jsme odmyli promytím 5 x 5 minut pufrům TBS. Následovala 1 hodinová inkubace membrány se sekundární protilátkou (ředěna 1000 x). Po promytí membrány 3 x 5 minut pufrům TBS jsme provedli detekci pomocí komerční soupravy Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce) podle pokynů výrobce.

4.2.4.12 *In vitro* kinázová reakce

Kinázová reakce byla provedena podle Makino a kol. (1989) a Janeček a kol. (1995). Připravili jsme reakční směs (50 mM Tris; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT) a k ní přidali vzorek, který obsahoval 30 µg proteinů. K nosičovému ATP o výsledné koncentraci 10 µM jsme přidali 1µCi [γ -³²P]ATP. Přidáním ATP k reakční směsi jsme nastartovali kinázovou reakci, kterou jsme po 15 minutách ukončili přidáním 5 µl STOP pufru (0,125 M Tris, pH 6.8; 4% SDS; 20% glycerol; 10% β -merkaptoethanol; 0,02% BPB). Vzorky jsme povařili 3 min při 100°C a elektroforeticky rozdělili. Proteiny v gelu jsme obarvili, gel usušili a nechali exponovat na citlivou fólii

(Fuji). Radioaktivní proteiny byly vizualizovány na přístroji Phosphoimager BAS 5000 (Fuji) a analyzovány pomocí programu Aida 3.28.

4.2.4.13 Příprava vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií

Vybrané proteinové spoty ze 2D gelů byly skalpelem vyřezány z gelu a zpracovány následujícím způsobem. Gel byl odbarven roztokem 100 mM hydrogenuhličitanu amonného (ABC-ammonium bicarbonate) v 50% acetonitrilu (ACN). Poté byl gel promyt 100% ACN a vysušen ve SpeedVacu. Gel byl rehydratován v roztoku 50 mM ABC 4 minuty při 37°C. K roztoku byla přidána endoproteasa Glu-C (33,3 ng/μl) a štěpení probíhalo přes noc při 37°C.

Peptidy byly extrahovány roztokem 60% ACN/5% kyselina trifluoroctová (TFA). Následovala sonikace 15 min v ledové lázni. Vzorky byly vysušeny ve SpeedVacu.

Analýza vzorků probíhala na přístroji ESI-ION-TRAP (Agilent). K ionizaci elektrosprejem docházelo po koncentraci vzorků na chromatografické koloně ZORBAX 300SB-C18 v nano uspořádání.

4.2.5 Enzymatické reakce

4.2.5.1 Enzymatické reakce pro určení aktivity fosfoglukosaminmutasy GImM

Fosfoglukosaminmutázová reakce (6P-1P) (Mengin-Lecreulx, 1996)

Reakční směs (20 μl) obsahovala 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM MgCl₂, 1 mM glukosamin-6-fosfát (substrát), 0,4 mM [¹⁴C] acetylkoenzym A (700 Bq), 10 mM UTP, 0,7 mM glukosa-1,6-difosfát, 4 μg GImU (bifunkční enzym glukosamin-1-fosfát acetyltransferasa, UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasa *S. pneumoniae*) a 10 μg GImM (fosfoglukosaminmutasa *S. pneumoniae*). Reakce probíhala 30 minut při 37°C a byla zastavena přidáním 4 μl kyseliny octové. Vzorek byl vysušen, resuspendován ve 100 μl 50 mM triethylaminu, pH 4.77 a produkty reakce byly děleny na chromatografické koloně (Nucleosil 100) pomocí HPLC.

Fosfoglukosaminmutázová reakce (1P-6P) (Jolly *et al*, 1999)

Reakční směs (100 μ l) obsahovala 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM glukosamin-1-fosfát (substrát), 0,7 mM glukosa-1,6-difosfát, 1,5 mM NAD, 80 ng GlmM (fosfoglukosaminmutasa *S. pneumoniae*), 2 μ g NagB (glukosamin-6-fosfátdeaminasa, Altamirano *et al.*, 1993 poskytl Dr. Calcagno), 2 μ g PGI (fosfoglukoisomerasa), 2 μ g GDH (glukosa-6-fosfátdehydrogenasa). Reakce probíhala při 37°C a substrát (glukosamin-1-fosfát) byl pomocí GlmM přeměněn na glukosamin-6-fosfát, který byl následně deaminován (NagB) na fruktosa-6-fosfát. V přítomnosti PGI došlo k izomeraci za vzniku glukosa-6-fosfátu, který byl poté pomocí GDH přeměněn na 6-fosfoglukonát za současné hydrogenace NAD a množství vznikajícího NADH bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm (PlateReader TECAN).

Fosfoglukomutázová reakce (1P-6P) (Jolly *et al*, 1999)

Reakční směs (100 μ l) obsahovala 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM glukosa-1-fosfát (substrát), 0,7 mM glukosa-1,6-difosfát, 1,5 mM NAD, 4 μ g GlmM (fosfoglukosaminmutasa *S. pneumoniae*), 2 μ g GDH (glukosa-6-fosfátdehydrogenasa). Reakce probíhala při 37°C a substrát (glukosa-1-fosfát) byl pomocí GlmM přeměněn na glukosa-6-fosfát, který byl poté pomocí GDH přeměněn na 6-fosfoglukonát za současné hydrogenace NAD a množství vznikajícího NADH bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm.

Fosfomannomutázová reakce (1P-6P) (Tavares *et al*, 2000)

Reakční směs (100 μ l) obsahovala 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 1 mM mannosu-1-fosfát (substrát), 0,7 mM glukosa-1,6-difosfát, 1 mM NAD, 1 μ g GlmM (fosfoglukosaminmutasa *S. pneumoniae*), 2 μ g PMI (fosfomannoisomerasa), 2 μ g GDH (glukosa-6-fosfátdehydrogenasa). Reakce probíhala při 37°C a substrát (mannosu-1-fosfát) byl pomocí GlmM přeměněn na mannosu-6-fosfát. V přítomnosti PMI došlo k izomeraci na glukosa-6-fosfát, který byl poté pomocí GDH přeměněn na 6-fosfoglukonát za současné hydrogenace NAD a množství vznikajícího NADH bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm.

4.2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography- HPLC)

Produkty fosfoglukosaminmutázové reakce (6P-1P) byly děleny na chromatografické koloně (Nucleosil 100, C18 (reverzní fáze), 5 μ , 150 mm x 4.6 mm, Alltech) na kapalinovém chromatografu BIO-TEK Instruments System 522 se softwarem Kromasystem 3000. Jako mobilní fáze byl použit 50 mM triethylamin, pH 4.77 s gradientem methanolu. Separace produktů jedné reakce probíhala 65 minut za následujících podmínek (Dr. D. Mengin-Lecreulx, ústní sdělení):

čas	A	B
0	100%	0%
10	100%	0%
25	0%	100%
45	0%	100%
50	100%	0%
65	100%	0%

Mobilní fáze A byla tvořena roztokem 50 mM triethylaminu, pH 4.77 a k vymytí produktů enzymatické reakce docházelo gradientem methanolu, jež byl součástí mobilní fáze B (50 mM triethylamin, pH 4.77 : methanol, 1:1). Průtok byl nastaven na hodnotu 0,6 ml/min.

Eluované frakce byly v minutových intervalech odebírány, smíseny se scintilačním roztokem Optiphase 3 HiSafe (Perkin-Elmer) a proměřeny na scintilačním přístroji (Wallac DSA 1409, Perkin-Elmer).

5 Výsledky

5.1 Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy StkP

Jak již bylo zmíněno v úvodu, první část této dizertační práce navazuje na výsledky publikované v diplomové práci autorky. Kapitola 5.1.1 je tedy stručným souhrnem dostupných informací o proteinkinase StkP a výsledků zmiňované práce.

5.1.1 Proteinkinasa StkP

Analýzou sekvence genomu *S. pneumoniae* R6 byla zjištěna přítomnost jednoho genu homologního s eukaryotními Ser/Thr proteinkinasy a gen byl nazván *stkP*. Ve stejném operonu byla také zjištěna přítomnost genu homologního s eukaryotními Ser/Thr proteinfosfatasami a tento gen byl nazván *phpP*. Geny mají dvounukleotidový překryv.

Katalytická doména proteinkinasy StkP obsahuje všech 11 konzervovaných subdomén charakteristických pro eukaryotní Ser/Thr proteinkinasy. Katalytická doména tvoří N-terminální část proteinu. C-terminální oblast obsahuje 4 opakování PASTA (PBP and Serine/Threonine kinase Associated domain) motivu (Yeats *et al.*, 2002). Jak již název vypovídá, tento motiv se vyskytuje u penicilin vazebných proteinů (PBP-penicillin binding protein) a u Ser/Thr proteinkinasy. Ve výše citovaném článku byla vyslovena hypotéza, že tyto domény by mohly vázat podjednotky peptidoglykanu. Jestliže PASTA doména váže peptidoglykan, mohla by proteinkinasa hrát roli senzoru koncentrace peptidoglykanu a regulovat biosyntézu proteinů účastnících se tvorby buněčné stěny, včetně penicilin vazebných proteinů. PASTA doména penicilin vazebných proteinů představuje také důležitou determinantu rezistence k antibiotikům.

Katalytická a senzorová doména jsou spojeny úsekem 18 hydrofobních aminokyselin, který, jak jsme prokázali, zajišťuje membránovou lokalizaci proteinu (Pallová, 2003, Nováková *et al.*, 2005).

Inaktivace genu *stkP* na chromozómu avirulentního neopouzdrěného kmene *S. pneumoniae* inzerční mutagenézou vedla ke ztrátě schopnosti přirozené kompetence a k předčasné lyzi v podmínkách *in vitro* (Echenique *et al.*, 2004). Inaktivace genu *stkP* byla provedena i ve virulentních kmenech *S. pneumoniae* D39 a 23477. *In vivo* bylo na myším modelu prokázáno, že mutace v genu *stkP* téměř úplně ruší virulenci obou kmenů během intranasální infekce. U sérotypu 6 (kmen 23477) tato mutace zabraňuje invazi bakterií skrz epiteliální bariéru (Echenique *et al.*, 2004).

Biochemickou analýzou rekombinantního proteinu StkP bylo potvrzeno, že se jedná o aktivní protein schopný autofosforylace na serinu a zejména threoninu v přítomnosti manganatých a hořečnatých iontů (Nováková *et al.*, 2005). Dále bylo zjištěno, že rekombinantní protein sestávající pouze z katalytické domény je sice funkční, nicméně jeho aktivita je snížena zhruba o 50% oproti úplné formě proteinu. Tato skutečnost znamená, že obě formy proteinu katalyzují reakci s rozdílnými kinetickými parametry (Nováková *et al.*, 2005).

Pomocí alelické výměny byl připraven kmen *S. pneumoniae*, který ve svém genomu kóduje epitopem (histidinová kotva) značenou Ser/Thr proteinkinasu StkP. Rovněž byl připraven kmen exprimující epitopem značenou zkrácenou formu této proteinkinasy (epitopem značená kinázová doména) (Pallová, 2003).

Pomocí *in vitro* kinázové reakce byla testována schopnost autofosforylace značených proteinů. Nezkrácený protein byl aktivní a nacházel se v membránové frakci. Autofosforylační aktivitu zkráceného proteinu se nám detekovat nezdařilo.

Imunochemickými metodami byla určena lokalizace Ser/Thr proteinkinasy StkP. Úplná forma enzymu byla pomocí monoklonální protilátky proti histidinové kotvě detekována v membránové frakci, jedná se tedy o membránový protein. Zkrácenou formu proteinkinasy jsme nebyli schopni prokazatelně detekovat ani v cytoplazmatické, ani v membránové frakci (Pallová, 2003).

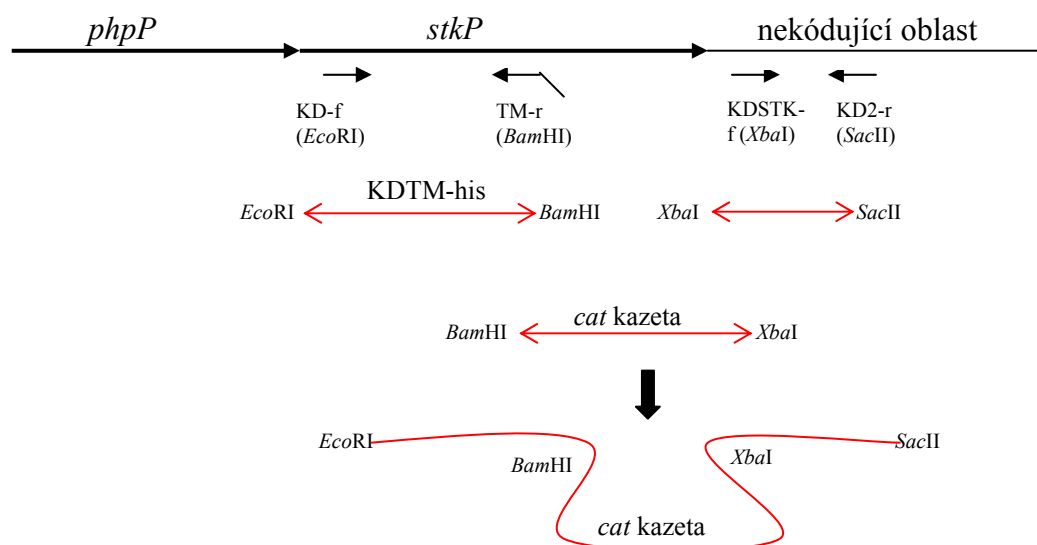
Studiem fenotypových projevů kmene s delecí C-terminální oblasti včetně transmembránové domény jsme zjistili značnou podobnost s kmenem s inaktivovaným genem *stkP* pomocí inzerční mutageneze (Echenique *et al.*, 2004). Oba kmeny vykazovaly sníženou schopnost navození stavu přirozené kompetence a zvýšenou citlivost k antibiotikům inhibujícím tvorbu buněčné stěny, penicilinu G a vankomycinu (Pallová, 2003, Nováková, 2004).

Z těchto výsledků by se dalo usuzovat, že k expresi zkrácené formy StkP buď nedochází, nebo je tato forma pravděpodobně nefunkční a tudíž je buňkou degradována. Pro ověření této hypotézy jsme připravili kmen *S. pneumoniae*, exprimující kinázovou doménu ukotvenou v membráně pomocí transmembránové domény, a testovali enzymatické vlastnosti proteinu.

5.1.2 Příprava epitodem značené membránově ukotvené kinázové domény proteinkinasy StkP

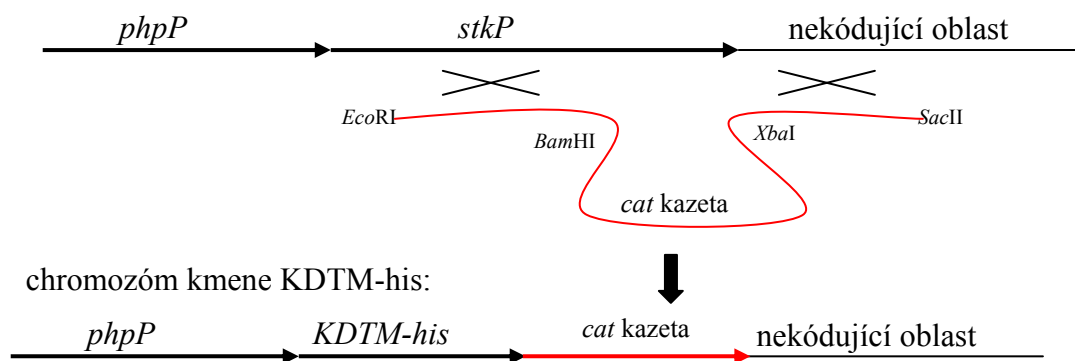
Strategie přípravy konstruktů pro transformaci *S. pneumoniae* Cp1015, s cílem připravit epitodem značenou membránově ukotvenou kinázovou doménu proteinkinasy StkP, byla stejná jako v diplomové práci (Pallová, 2003). Fragment odpovídající sekvenci části kinázové domény včetně domény transmembránové byl amplifikován pomocí oligonukleotidů KD-f (*EcoRI*) a TM-r (*BamHI*) s použitím chromozomální DNA kmene Cp1015 jako templátu. Reverzní oligonukleotid navíc obsahoval sekvenci kódující histidinovou kotvu (10 x His). Fragment homologní k sekvenci za genem *stkP* byl syntetizován oligonukleotidy KDSTK-f (*XbaI*) a KD2-r (*SacII*). Fragments po naštěpení příslušnými restriktčními endonukleasami byly klonovány do vektoru pBluescript II KS⁻ (Stratagene) spolu s rezistenční kazetou (*cat*- chloramfenikol acetyltransferasa) amplifikovanou pomocí oligonukleotidů CAT1 (*BamHI*) a CAT2 (*XbaI*) podle templátu pEVP3. Finální fragment obsahující požadované úseky DNA byl z vektoru vyštěpen restriktčními enzymy *EcoRI* a *XbaI* (Obr. 5.1) a použit pro transformaci *S. pneumoniae* Cp1015. Po dvojitém crossing-overu došlo k výměně genetického materiálu za vzniku mutantního kmene *S. pneumoniae* KDTM-his (Obr. 5.2). Metoda byla inspirována prací (Lau *et al.*, 2002).

chromozóm kmene Cp1015:



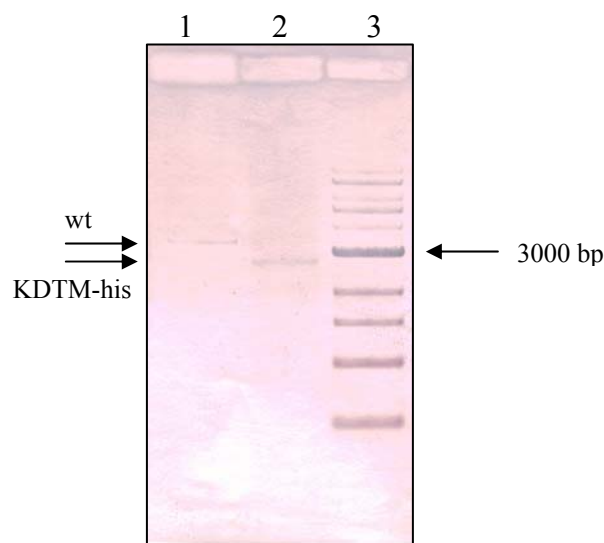
Obr. 5.1: Schématické znázornění přípravy konstruktů pro transformaci *S. pneumoniae* Cp1015. Popis v textu.

chromozóm kmene Cp1015:



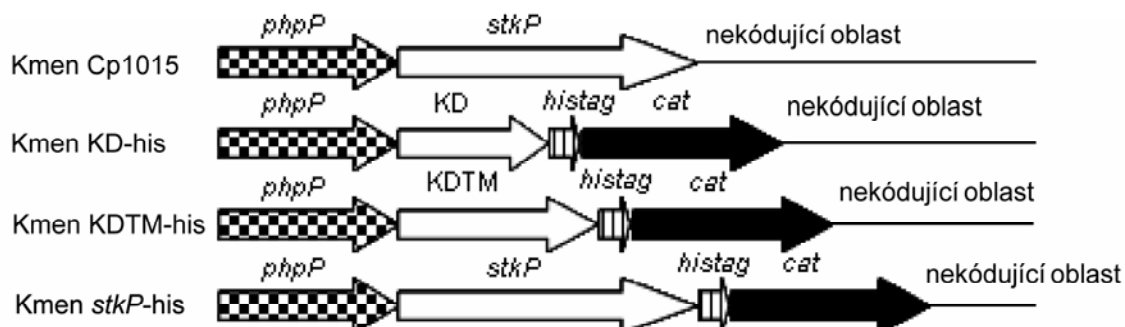
Obr. 5.2: Schématické znázornění alelické výměny za vzniku kmene *S. pneumoniae* KDTM-his. Popis v textu.

Delece C-terminální části genu *stkP* byla ověřena pomocí PCR a DNA hybridizací dle Southerna (Obr. 5.3). Chromozomální DNA izolovanou z kmene *S. pneumoniae* KDTM-his a kmene Cp1015 jsme štěpili restrikcí endonukleasami *StuI* a *EcoRI*. Štěpenou DNA jsme rozdělili pomocí agarózového gelu, DNA přenesli na membránu a provedli detekci pomocí sondy KD proti oblasti kinázové domény StkP (Pallová, 2003). Předpokládaná velikost DNA fragmentu detekovaného u kmene Cp1015 činila 3500 bp a velikost DNA fragmentu detekovaného u kmene KDTM-his činila 2890 bp, což odpovídá velikosti fragmentů detekovaných na Obr. 5.3. Dále jsme sekvenováním ověřili sekvence chromozómu kmene KDTM-his v okrajových oblastech výměny. Tímto způsobem jsme opět ověřili úspěšnost delece C-terminální části genu *stkP* a přítomnost sekvence kódující oligohistidinovou kotvu.



Obr. 5.3: DNA hybridizace se sondou proti kinázové doméně proteinkinasy *StkP*. Dráha 1-DNA kmene Cp1015, dráha 2-DNA kmene KDTM-his, dráha 3- DNA 1 kb standard značený DIG-11-dUTP (NEB).

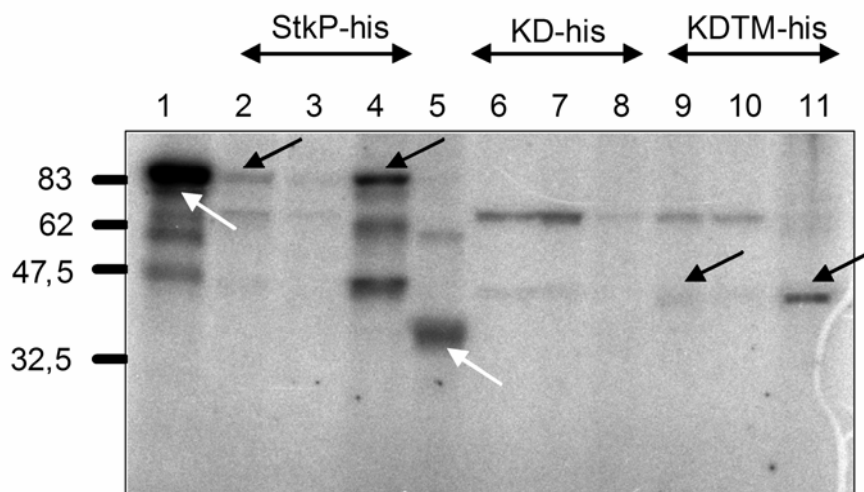
Schéma organizace *stkP* lokusu mutantních kmenů KD-his, KDTM-his a StkP-his v porovnání s divokým kmenem znázorňuje Obr. 5.4.



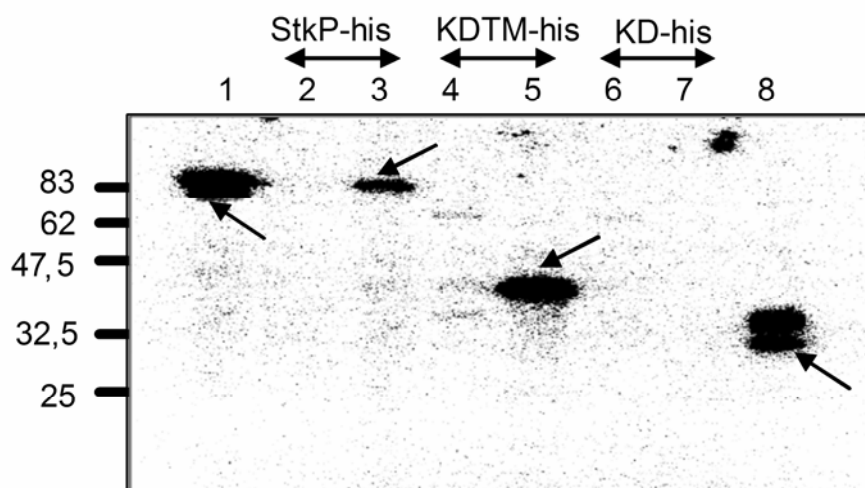
Obr. 5.4: Schéma organizace *stkP* lokusu mutantních kmenů v porovnání s divokým kmenem. *phpP*-gen pro proteinfosfatasu *PhpP*, *stkP*-gen pro proteinkinasy *StkP*, KD-kinázová doména proteinkinasy *StkP*, KDTM-membránově ukotvená kinázová doména proteinkinasy *StkP*, *histag*-histidinová kotva (10 x His), *cat*-chloramfenikol acetyltransferasa.

Subcelulární frakce kmene KDTM-his a kmenů KD-his a Stk-his (Pallová, 2003) byly použity pro *in vitro* kinázové reakce. Jako pozitivní kontroly byly použity rekombinantní proteiny rStkP a rKD izolované z kmenů *E. coli* BL21(DE3) (pEXstkP) a BL21(DE3) (pEXstkP-T) (Nováková *et al.*, 2005). Jak vyplývá z Obr. 5.5 epitopem značená úplná forma proteinkinasy *StkP* je aktivní a autofosforyluje se převážně v membránové frakci (Obr. 5.5- dráha 4), kinázová aktivita epitopem značené zkrácené formy proteinu nebyla detekována (Obr. 5.5- dráhy 6-8) a konečně ukotvení kinázové domény vedlo k obnovení autofosforylační aktivity proteinu (Pallová *et al.*, 2007). Membránově ukotvený protein, podobně jako úplná forma proteinkinasy *StkP*, se nacházel v membránové frakci (Obr. 5.5- dráha 11). Lokalizace proteinu byla následně ověřena protilátkovou detekcí s monoklonální protilátkou proti histidinové kotvě (Obr. 5.6- dráha 5) (Pallová *et al.*, 2007).

Opět se nám nezdařilo detekovat samotnou kinázovou doménu proteinkinasy *StkP* (Obr. 5.6- dráhy 6, 7), a proto jsme se pokusili izolovat epitopem značené formy proteinkinasy *StkP* pomocí afinitní chromatografie s použitím suspenze nosiče určeného k purifikaci proteinů s histidinovou kotvou. Úplnou formu proteinkinasy *StkP* a kinázovou doménu ukotvenou v membráně jsme úspěšně izolovali, kdežto izolace zkráceného proteinu (kinázová doména) se opakovaně nezdařila (data neuvedena), což potvrzuje prvotní hypotézu, že pravděpodobně dochází k proteolytické degradaci proteinu.

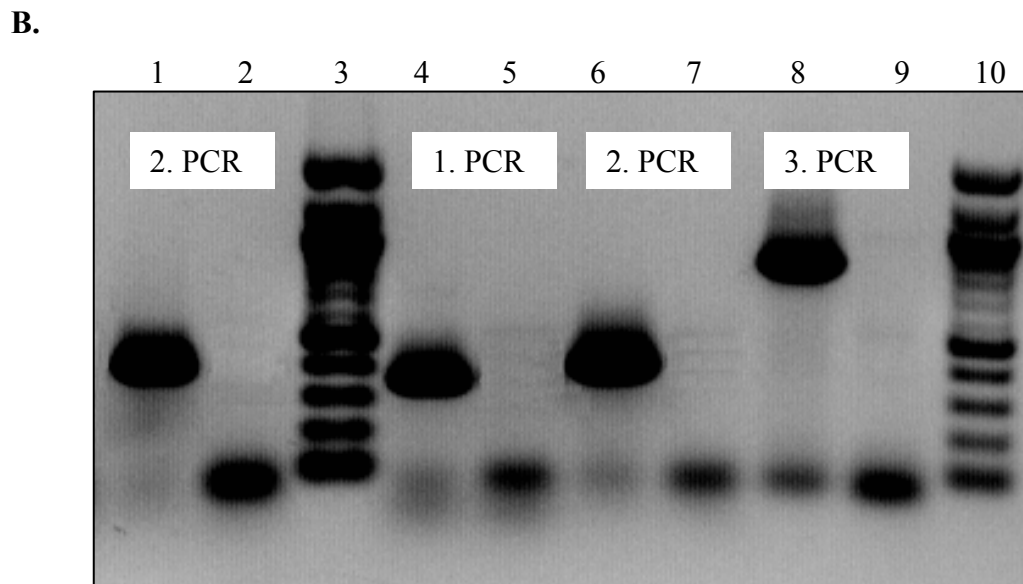
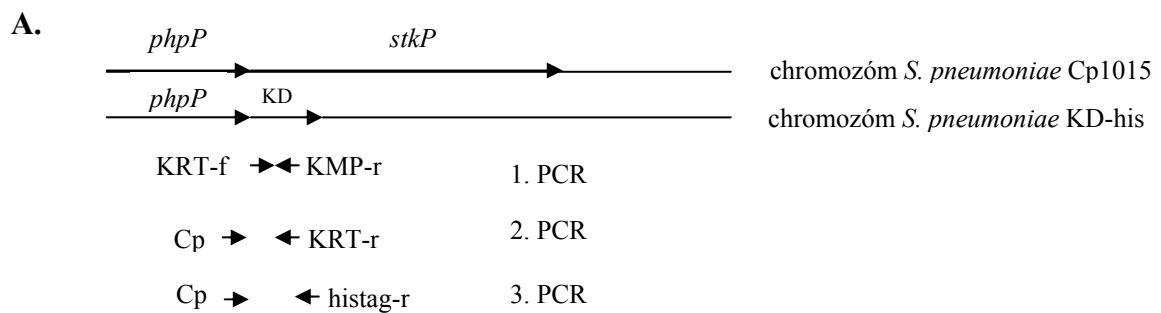


Obr. 5.5: Kinázová aktivita mutantních forem proteinkinasy StkP v subcelulárních frakcích *S. pneumoniae*. Dráhy 2, 6 a 9 představují celkový lyzát, dráhy 3, 7 a 10 představují cytoplazmatickou frakci, dráhy 4, 8 a 11 představují membránovou frakci. Rekombinantní proteiny rStkP a rKD (dráhy 1 a 5) byly použity jako pozitivní kontrola. Šipky naznačují polohu proteinů. StkP-his-kmen exprimující epitopem značenou úplnou formu StkP, KD-his-kmen exprimující epitopem značenou kinázovou doménu StkP, KDTM-his- kmen exprimující epitopem značenou membránově ukotvenou kinázovou doménu StkP. Nalevo jsou vyznačeny pozice molekulových standardů (v kDa).



Obr. 5.6: Imunologická detekce mutantních forem proteinkinasy StkP v subcelulárních frakcích *S. pneumoniae* monoklonální protilátkou proti histidinové kotvě. Dráhy 2, 4 a 6 představují cytoplazmatickou frakci, dráhy 3, 5 a 7 představují membránovou frakci. Rekombinantní proteiny rStkP a rKD (dráhy 1 a 8) byly použity jako pozitivní kontrola. Šipky naznačují polohu proteinů. StkP-his-kmen exprimující epitopem značenou úplnou formu StkP, KD-his-kmen exprimující epitopem značenou kinázovou doménu StkP, KDTM-his- kmen exprimující epitopem značenou membránově ukotvenou kinázovou doménu StkP. Nalevo jsou vyznačeny pozice molekulových standardů (v kDa).

Abychom mohli říci, zda to, že nejsme schopni zkrácený protein izolovat, je způsobeno nestabilitou mRNA a nebo, zda je degradován až produkt proteosyntézy, izolovali jsme celkovou RNA z kmenů Cp1015 a KD-his. Následně jsme provedli reverzní transkripci a RNA byla převedena do formy cDNA. PCR reakce provedené na cDNA prokázaly, že RNA transkript odpovídající samotné kinázové doméně proteinkinasy StkP je v buňkách přítomen (Obr. 5.7- dráhy 4, 6, 8). Izolace celkové RNA byla provedena při $OD_{400} = 0,5$ a $OD_{400} = 1$, RNA transkript odpovídající samotné kinázové doméně byl přítomen v obou případech. Reverzní transkripce byla provedena pomocí náhodného hexameru (Promega). Jako kontrola čistoty RNA sloužila reakce bez reverzní transkriptasy. cDNA sloužila jako templát pro následné PCR reakce s použitím oligonukleotidů: KRT-f a KMP-r (~330 bp), Cp a KRT-r (~410 bp), Cp a histag-r (~850 bp).



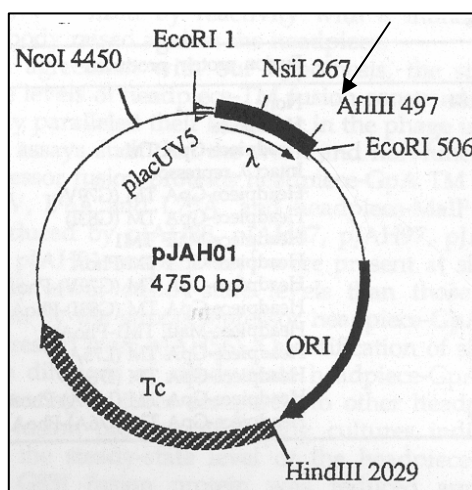
Obr. 5.7: Schéma RT-PCR (A) a RT-PCR analýza exprese kinázové domény proteinkinasy StkP v mutantním kmeni KD-his (B). Dráhy 1-2 *S. pneumoniae* Cp1015, dráhy 4-9 *S. pneumoniae* KD-his. Dráhy 1, 4, 6, 8- RT-PCR, dráhy 2, 5, 7, 9- reakce bez předchozí reverzní transkripce. DNA standard je nanesen v dráze 3 a 10 (100 bp standard, NEB).

5.1.3 Homodimerizace proteinkinasy StkP

Homologem proteinkinasy StkP je proteinkinasa PrkC *B. subtilis*. Topologie obou enzymů připomíná eukaryotní receptorové kinasy, jakou je např. TGF- β . O těchto receptorech je známo, že v přítomnosti ligandu tvoří stabilní dimery, které usnadňují autofosforylaci enzymu (Massagué, 1998). Madec a kol. (2002) prokázali, že Ser/Thr proteinkinasa PrkC je taktéž schopná tvořit dimery, a že se na tomto procesu podílí transmembránová a extracelulární doména.

Pomocí reportérového systému založeného na represoru cI bakteriofága λ jsme studovali, zda i proteinkinasa StkP má schopnost dimerizovat. Represor cI je tvořený dvěma doménami. N-terminální doména je zodpovědná za represorovou aktivitu a vazbu na DNA, C-terminální doména za dimerizaci. Represor je aktivní pouze ve formě dimeru.

Do plazmidu pJAH01 (Leeds a Beckwith, 1998) nesoucího N-terminální doménu (zodpovědnou za DNA vazbu a represorovou aktivitu) represoru cI jsme pomocí unikátního *AflIII* restrikčního místa (Obr. 5.8) klonovali jednotlivé domény proteinkinasy StkP. Kinázová doména KD byla amplifikována pomocí oligonukleotidů StkP-f (*AflIII*) a KD-r (*AflIII*), kinázová doména včetně transmembránové domény pomocí oligonukleotidů StkP-f (*AflIII*) a KDTM-r (*AflIII*) a C-terminální doména pomocí oligonukleotidů C-term-f (*AflIII*) a StkP-r (*AflIII*). Fúzní konstrukty byly nazvány KD(pJAH01), KDTM(pJAH01) a Cterm(pJAH01).



Obr. 5.8: Plazmid pJAH01 nesoucí N-terminální doménu cI represoru bakteriofága λ . Šipkou je naznačeno unikátní *AflIII* restrikční místo. Převzato z Leeds a Beckwith, 1998.

Fúzními konstrukty jsme transformovali buňky *E. coli* 61F a kultury jsme kultivovali v NZY médiu s antibiotikem, s přidavkem maltosy (0,2%, růst v přítomnosti maltosy vyvolá produkci receptoru lambda fága, LamB, který je nezbytný pro transport maltosy) v přítomnosti či nepřítomnosti IPTG (10 mM, fúzní protein je pod kontrolou inducibilního promotoru *placUV5*) do $OD_{600} = 0,65-0,7$. Poté jsme 100 μ l kultury smíchali s 3 ml NZY top agaru a 10 μ l bakteriofága lambda (λ cI nebo λ vir, ředěného 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) a vyseli na NZY agar (+/- IPTG). Plotny jsme inkubovali přes noc při 37°C a druhý den počítali množství plaků na plotnách.

Jako pozitivní kontrolu jsme použili fúzní konstrukt nesoucí transmembránovou doménu glykoforinu A (GpA), která dimery tvoří (Leeds a Beckwith, 1998). Transmembránová doména TM1 MalF proteinu, která dimery netvoří (Leeds a Beckwith, 1998), byla použita jako negativní kontrola.

Buňky nesoucí fúzní konstrukt s C-terminální doménou proteinkinasy StkP a rovněž buňky nesoucí fúzní konstrukt s ukotvenou kinázovou doménou proteinkinasy StkP byly podobně jako pozitivní kontrola plně rezistentní k infekci bakteriofágem λ cI (Tab. 5.1). Naopak buňky nesoucí pouze kinázovou doménu proteinkinasy StkP fúzovanou s N-terminální doménou represoru cI byly k infekci bakteriofágem λ cI senzitivní (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Represorová aktivita fúzních konstruktů.

Plazmid	Represorový konstrukt	Efektivita výsevu *
pJAH56	cI N-terminální doména+GpA TM	$\leq 10^{-6}$
pJAH91	cI N-terminální doména +MalF TM1	$0,830 \pm 0,079$
pJAH-kd	cI N-terminální doména +StkP-KD	$0,925 \pm 0,075$
pJAH-kdtm	cI N-terminální doména + StkP-KDTM	$< 10^{-6}$
pJAH-C-term	cI N-terminální doména + StkP C-terminální doména	$\leq 10^{-6}$

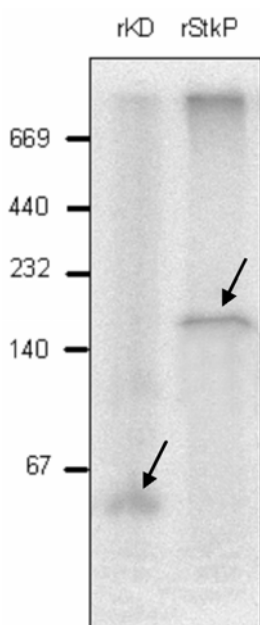
*Efektivita výsevu (počet plaků/počet fágových partikulí \pm standardní odchylka) je uvedena jako průměrná hodnota získaná ze čtyř nezávislých experimentů.

Z těchto výsledků zřetelně vyplývá, že proteinkinasa StkP má schopnost tvořit dimery, a že tohoto procesu se účastní, jak transmembránová doména, tak i C-terminální doména (Pallová *et al.*, 2007).

5.1.4 Nativní elektroforéza (Blue native)

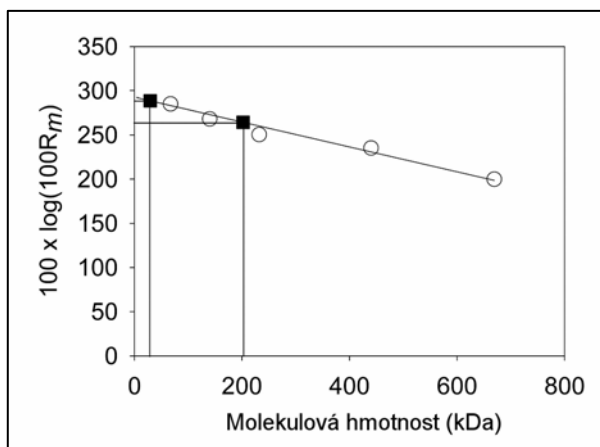
Tvorba dimerů proteinkinasy StkP byla následně ověřena pomocí nativní polyakrylamidové elektroforézy. Podstatou této metody je to, že proteiny nejsou během migrace v polyakrylamidovém gelu vystaveny denaturujícím účinkům SDS (dodecylsulfát sodný) a pohyblivost proteinů v elektrickém poli je zajištěna navázáním barvy Coomassie Blue G-250, která uděluje proteinům záporný náboj. K experimentu jsme využili rekombinantní purifikované proteiny StkP-GST a rKD (katalytická doména fúzovaná s histidinovou kotvou) (Nováková *et al.*, 2005).

Purifikované proteiny byly dialyzovány proti pufru o složení 50 mM BisTris, pH 7.0, 15% glycerol a zakoncentrovány. Byly podrobeny *in vitro* kinázové reakci a nanесeny na gradientový gel. Jak je zřejmé z autoradiogramu (Obr. 5.9), porovnání s molekulovým standardem ukázalo, že proteinkinasa StkP putovala v gelu ve formě dimeru, kdežto zkrácená forma (katalytická doména) putovala jako monomer (Pallová *et al.*, 2007). Je možné, že proteinkinasa StkP se seskupuje i ve větší oligomery, neboť jsme detekovali proteinový pruh o molekulové hmotnosti větší než 669 kDa, který se nacházel u horního okraje gelu (Obr. 5.9- dráha rStkP).



Obr. 5.9: Autoradiogram separace autofosforylovaných rekombinantních proteinů rKD (katalytická doména fúzovaná s histidinovou kotvou) a rStkP-GST pomocí nativní elektroforézy. Pozice molekulových standardů je vyznačena vlevo. Šipky indikují pozici zkoumaného proteinu.

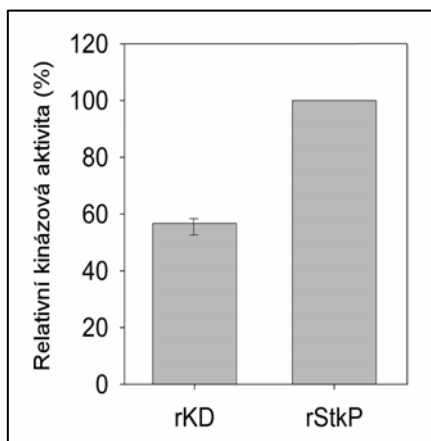
Molekulová hmotnost (M_r) proteinů byla vypočtena v závislosti na jejich relativní pohyblivosti v gelu. Tuto závislost ukazuje *Graf 5.1*.



Graf 5.1: Závislost relativní pohyblivosti proteinů v gelu na jejich molekulové hmotnosti. R_m -relativní pohyblivost v gelu, prázdná kolečka (○) odpovídají molekulovým standardům, plné čtverečky (■) odpovídají testovaným proteinům rKD a rStkP-GST.

Z tohoto grafu jsme vypočítali molekulovou hmotnost $M_r = 29,5$ kDa pro rKD, což koresponduje s molekulovou hmotností monomerní formy. Pro rStkP-GST byla vypočtena hodnota $M_r = 202$ kDa, což odpovídá dimerní molekule proteinkinasy StkP fúzované s GST (Pallová *et al.*, 2007).

Porovnáním denzity radioaktivního signálu obou forem proteinu jsme zjistili, že autofosforylační aktivita monomerní kinázové domény je snížena. Kvantifikace pomocí vyhodnocovacího softwaru AIDA verze 3.28 ukázala, že účinnost inkorporace [32 P] kinázové domény rKD byla oproti proteinkinase StkP přibližně dvojnásobně snížena a dosahovala hodnoty 57% účinnosti inkorporace rStkP-GST (*Graf 5.2*) (Pallová *et al.*, 2007).



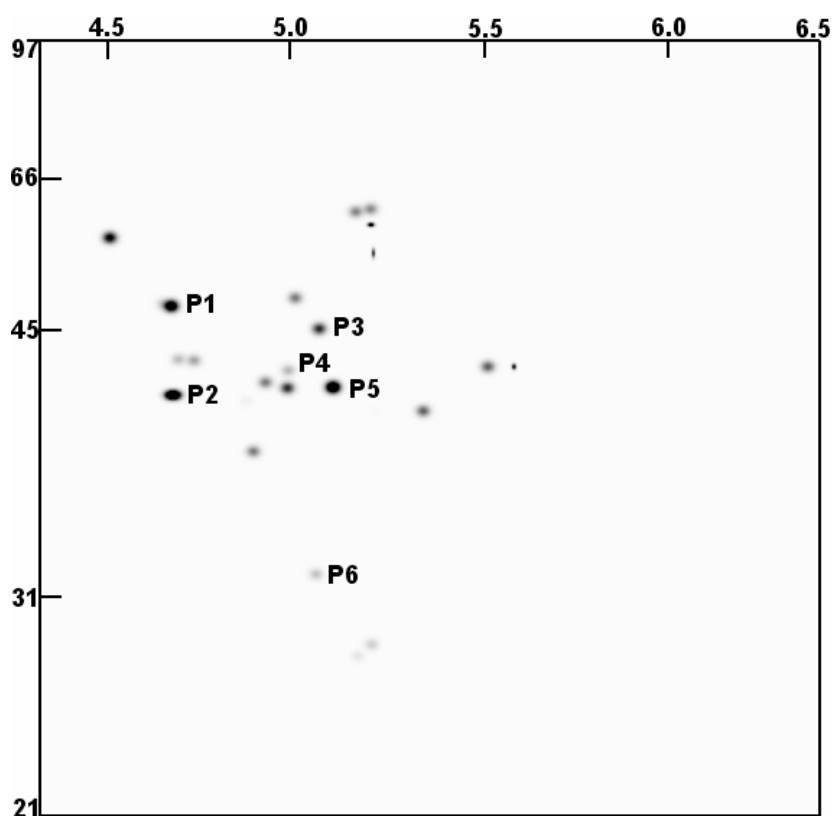
Graf 5.2: Relativní aktivity proteinů rKD a rStkP-GST měřené pomocí inkorporace [32 P].

Tyto výsledky korespondují s výsledky uvedenými v práci (Nováková *et al.*, 2005), kde bylo pro kinázovou doménu popsáno 50% snížení inkorporace [³²P] vzhledem k intaktní proteinkinase StkP. V citované práci byla navržena hypotéza, že tento rozdíl je způsoben odlišnými kinetickými parametry autokatalytické reakce. Výsledky předkládané práce naznačují, že tvorba homodimeru je významným faktorem ovlivňujícím aktivitu proteinkinasy. Jako pravděpodobné se jeví, že tvorba homodimeru umožňuje transfosforylaci.

5.2 Charakterizace fosfoglukosaminmutasy *S. pneumoniae*

5.2.1 Fosfoglukosaminmutasa GlmM jako substrát proteinkinasy StkP

Ve snaze identifikovat substrát(y) proteinkinasy StkP jsme provedli *in vivo* značení kultur divokého kmene a mutantního kmene $\Delta stkP$ [^{33}P] kyselinou fosforečnou. Pomocí dvourozměrné elektroforézy byly analyzovány fosfoproteinové profily obou kmenů. 6 fosfoproteinových skvrn bylo identifikováno hmotnostní spektrometrií (Obr. 5.10), z toho dva proteiny, fosfoglukosaminmutasa GlmM a α -podjednotka RNA polymerasy, byly identifikovány jako potenciální substráty proteinkinasy StkP, neboť byly nalezeny pouze v divokém kmeni (Nováková *et al.*, 2005).



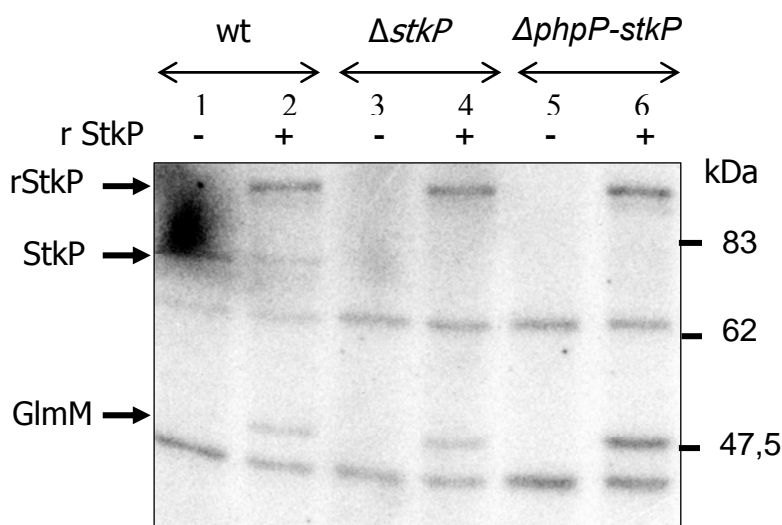
Obr. 5.10: Digitalizovaná fosfoproteomová mapa kmene *S. pneumoniae* Cp1015. Proteinové skvrny, které byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie, jsou označeny P1-P6 (P1-fosfoglukosaminmutasa GlmM). Nahoře vyznačeno rozmezí pH, vlevo vyznačeny pozice proteinových standardů.

Druhá část předkládané dizertační práce vychází z těchto výsledků laboratoře a věnuje se biochemické charakterizaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*.

5.2.2 Ověření fosfoglukosaminmutasy GlmM jako substrátu proteinkinasy StkP v buněčných lyzátech *S. pneumoniae*

Bezbuňčné lyzáty kmenů *S. pneumoniae* Cp1015, delečního mutantu $\Delta stkP$ a dvojitého delečního mutantu $\Delta phpP-stkP$ (deleční mutanty v naší laboratoři připravila L. Sasková) jsme použili pro potvrzení fosfoglukosaminmutasy GlmM jako substrátu proteinkinasy StkP v *in vitro* kinázové reakci v přítomnosti či absenci rekombinantní proteinkinasy StkP fúzované s GST (Obr. 5.11).

V drahách číslo 2, 4 a 6 je vidět fosforylace rekombinantního proteinu (rStkP), v dráze číslo 1 a 2 můžeme pozorovat fosforylaci endogenní proteinkinasy StkP. V drahách 2, 4 a 6, tedy v přítomnosti rekombinantního proteinu StkP-GST (rStkP), se objevuje fosforylovaný protein o molekulové hmotnosti odpovídající fosfoglukosaminmutase GlmM. Intenzita fosforylace tohoto proteinu je největší v bezbuňčném lyzátu dvojitého delečního mutantu, což ukazuje, že fosfoglukosaminmutasa by mohla být i substrátem proteinfosfatasy PhpP. Tyto výsledky podporují zjištění, že fosfoglukosaminmutasa GlmM by mohla být skutečným substrátem proteinkinasy StkP.



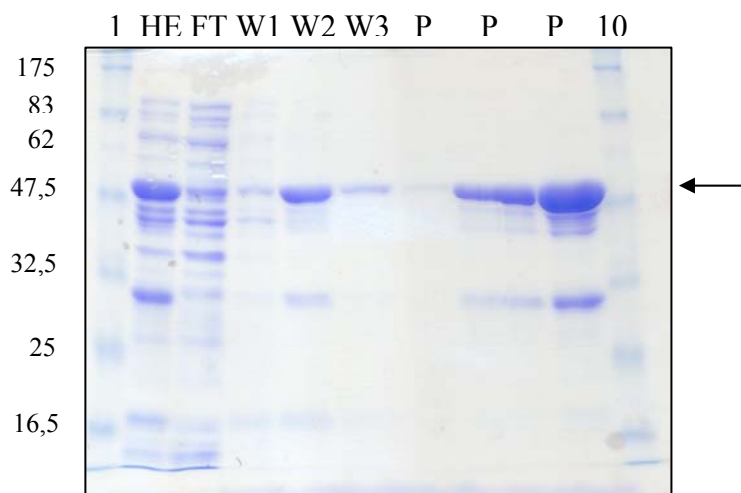
Obr. 5.11: *In vitro* kinázová reakce na lyzátech *S. pneumoniae* Cp1015 (WT), $\Delta stkP$, $\Delta phpP-stkP$ v přítomnosti (+) či absenci (-) rekombinantního proteinu StkP-GST (rStkP). Šipky ukazují pozici proteinů. Napravo je vyznačena pozice proteinových standardů.

5.2.3 Příprava rekombinantního proteinu GlmM

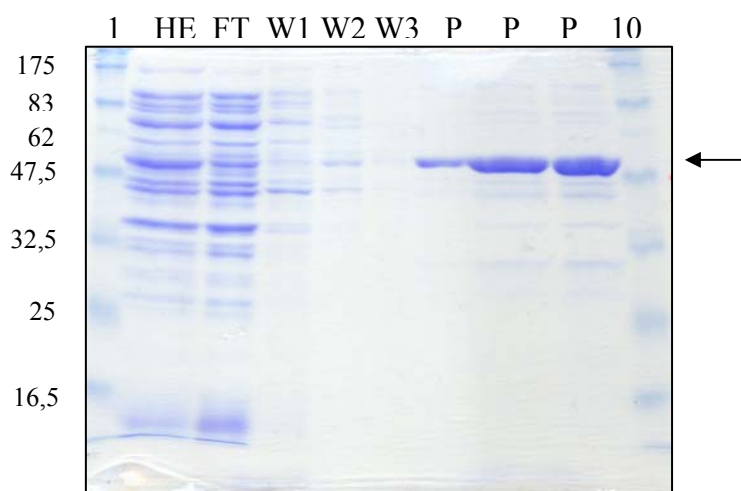
Gen kódující fosfoglukosaminmutasu GlmM jsme amplifikovali s použitím chromozomální DNA *S. pneumoniae* Cp1015 jako templátu pomocí oligonukleotidů

GlmM-f (*NdeI*) a GlmM-r (*XhoI*), respektive GlmM-r term (*XhoI*). Reverzní oligonukleotidy se lišily přítomností sekvence odpovídající terminačnímu kodonu. Vzniklé fragmenty jsme po opracování příslušnými restrikčními endonukleasami klonovali do expresního vektoru pET42b, respektive pET28b. Výsledný rekombinantní protein byl pak fúzován s histidinovou kotvou na C- nebo N- konci. Expresní plazmidy byly transformovány do buněk *E. coli* vhodných pro nadprodukcí proteinu, tj. *E. coli* BL21(DE3). Nadprodukované proteiny byly přítomny v rozpustné frakci a pomocí afinitní chromatografie byly izolovány z hrubého extraktu (Obr. 5.12). Vyšší účinnost purifikace byla dosažena u proteinu exprimovaného z vektoru pET28b, tedy s histidinovou kotvou na N-konci proteinu.

A.



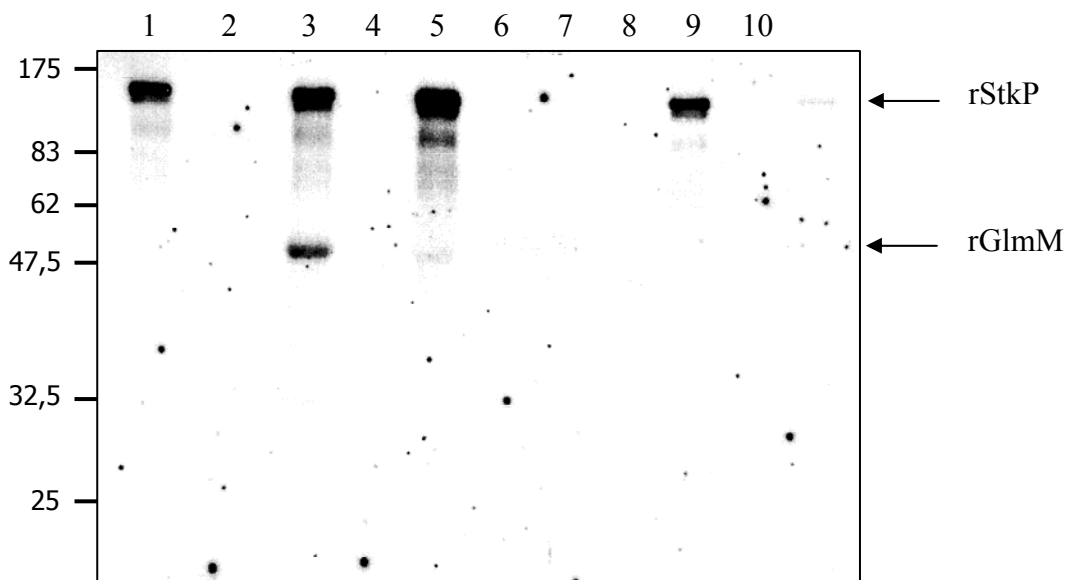
B.



Obr. 5.12: Purifikace proteinů GlmM s histidinovou kotvou na N- (A) nebo C- konci (B). HE- hrubý extrakt, FT-flowthrough, W1- W3- promývací kroky, P- purifikovaný protein (0,2; 0,5; 1 μ l). Proteinové standardy jsou nanášeny v drahách 1 a 10 (v kDa). Šipkou je znázorněna pozice nadprodukovaného proteinu.

5.2.4 *In vitro* kinázová reakce s rekombinantními proteiny

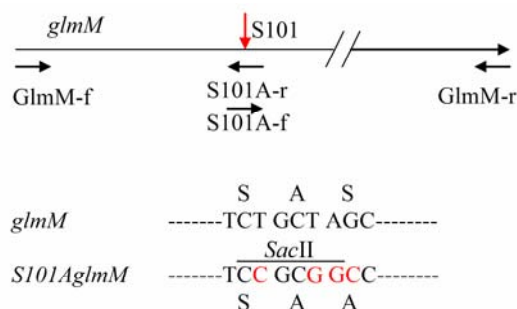
Pomocí *in vitro* kinázové reakce s izolovanými rekombinantními proteiny jsme chtěli prokázat, že fosfoglukosaminmutasa GlmM je skutečně substrátem proteinkinasy StkP (Obr. 5.11). Nejprve jsme reakci provedli za podmínek, které byly popsány pro autofosforylaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* (Jolly *et al.*, 2000), tedy v přítomnosti hořečnatých iontů, nicméně k autofosforylaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* či k její fosforylaci prostřednictvím proteinkinasy StkP nedošlo. Z tohoto důvodu jsme dále testovali závislost fosforylace na přítomnosti různých iontů (Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}). Jelikož proteinkinasa StkP pro svou aktivitu vyžaduje přítomnost hořečnatých iontů, tyto ionty byly zastoupeny ve všech testovaných reakcích. Z Obr. 5.13 je zřejmé, že fosfoglukosaminmutasa GlmM není schopna autofosforylace v přítomnosti ani jednoho ze zkoumaných iontů (dráhy 2, 4, 6, 8 a 10). Dále jsme prokázali, že tento protein je substrátem proteinkinasy StkP v přítomnosti kobaltnatých iontů (Nováková *et al.*, 2005) (dráha 3). Slabě dochází k jeho fosforylaci i v přítomnosti manganatých iontů (dráha 5). Tento trend byl společný pro protein s histidinovou kotvou na N- i na C- konci. Zinečnaté a vápenaté ionty v kombinaci s hořečnatými ionty úplně ruší autofosforylační aktivitu proteinkinasy StkP.



Obr. 5.13: Autoradiogram fosforylace rekombinantního proteinu rGlmM prostřednictvím rekombinantního proteinu StkP-GST (rStkP). Dráha 1- autofosforylace proteinkinasy rStkP, dráhy 2, 4, 6, 8 a 10 autofosforylace rGlmM v přítomnosti Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , dráhy 3 a 5 transfosforylace rGlmM proteinkasou rStkP v přítomnosti Co^{2+} a Mn^{2+} . V přítomnosti ostatních iontů k transfosforylaci nedochází (dráhy 7, 9, 11). Pozice proteinových standardů je vyznačena vlevo (v kDa). Šipky znázorňují polohu zkoumaných proteinů.

5.2.5 Cílená mutagenese fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*

Jak bylo zmíněno v literárním přehledu, u fosfoglukosaminmutasy *E. coli* byl identifikován serin v pozici 102 jako jediné místo fosforylace (Jolly *et al.*, 2000). Tomuto aminokyselinovému zbytku ve fosfoglukosaminmutase *S. pneumoniae* odpovídá serin v pozici 101. Rozhodli jsme se proto pro cílenou mutagenesi tohoto místa a jeho záměnu za strukturně příbuzný alanin (S101A) (Obr. 5.14).



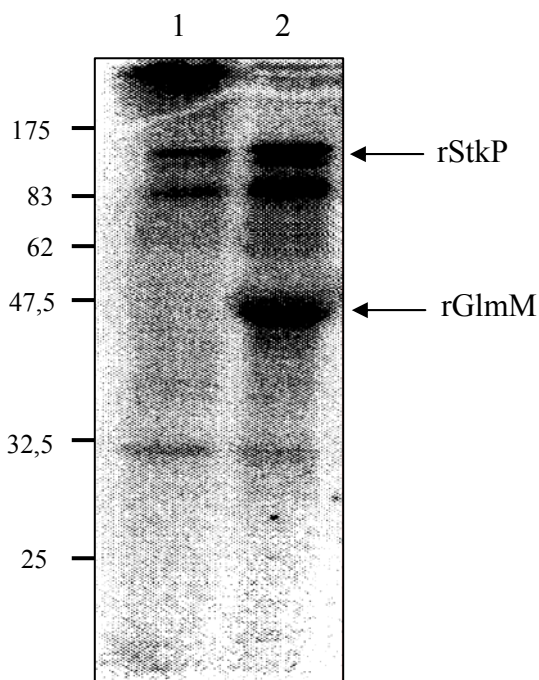
Obr. 5.14: Schéma cílené mutagenese serinu v pozici 101. Popis v textu.

Nejprve jsme pro tento účel zvolili metodu „megaoligonukleotidu“ (Ekici *et al.*, 1997). Pro amplifikaci části genu s vnášenou mutací jsme použili oligonukleotidy GlmM-f (*NdeI*) a S101A-r (*SacII*). V reverzním oligonukleotidu byla sekvence kodonu AGC (Ser101) zaměněna za GCC (Ala) a zároveň jsme zaměnili sekvenci předcházejících kodonů TCT (Ser99) na TCC (Ser) a GCT (Ala100) na GCG (Ala) tak, aby vzniklo unikátní restrikční místo *SacII*, které mělo umožnit snadnou detekci vzniklé mutace (Obr. 5.14). Produkt PCR reakce, tzv. „megaoligonukleotid“, jsme použili jako v následující PCR reakci společně s oligonukleotidem GlmM-r (*XhoI*) pro amplifikaci celého genu *glmM*. Tato metoda však nebyla úspěšná. Délka „megaoligonukleotidu“ je limitujícím faktorem této metody a doporučuje se délka maximálně do 300 bp. Délka použitého megaoligonukleotidu lehce překročila výše zmíněnou hranici a pravděpodobně z tohoto důvodu se nezdařila amplifikace sekvence celého genu.

Nicméně jsme využili toho, že oligonukleotid S101A-r obsahoval unikátní restrikční místo *SacII*, a rozhodli jsme se vytvořit mutantní protein postupným klonováním. Pomocí oligonukleotidů S101A-f (*SacII*) a GlmM-r (*XhoI*) jsme syntetizovali zbývající část genu. Výsledné fragmenty obou PCR reakcí jsme postupně klonovali do vektoru pET42b. Vnesení bodové mutace do genu bylo ověřeno sekvenováním. Fragment

odpovídající mutantní formě fosfoglukosaminmutasy S101AGlmM byl z vektoru vyštěpen restrikcími endonukleasami *NdeI* a *XhoI* a klonován do vektoru pET28b. Protein byl nadprodukován a purifikován stejně jako protein nemutovaný.

Protein S101AGlmM jsme použili *in vitro* kinázové reakci jako substrát proteinkinasy StkP a zjistili jsme, že proteinkinasa StkP nadále fosfoglukosaminmutasu fosforyluje (Obr. 5.15).



Obr. 5.15: *In vitro* fosforylace mutantního proteinu S101AGlmM proteinkinásou StkP. Dráha 1- autofosforylace StkP, dráha 2- transfosforylace proteinu S101AGlmM proteinkinásou StkP (v přítomnosti Co^{2+}). Vlevo jsou vyznačeny pozice proteinových standardů (v kDa). Šipka znázorňuje polohu zkoumaných proteinů.

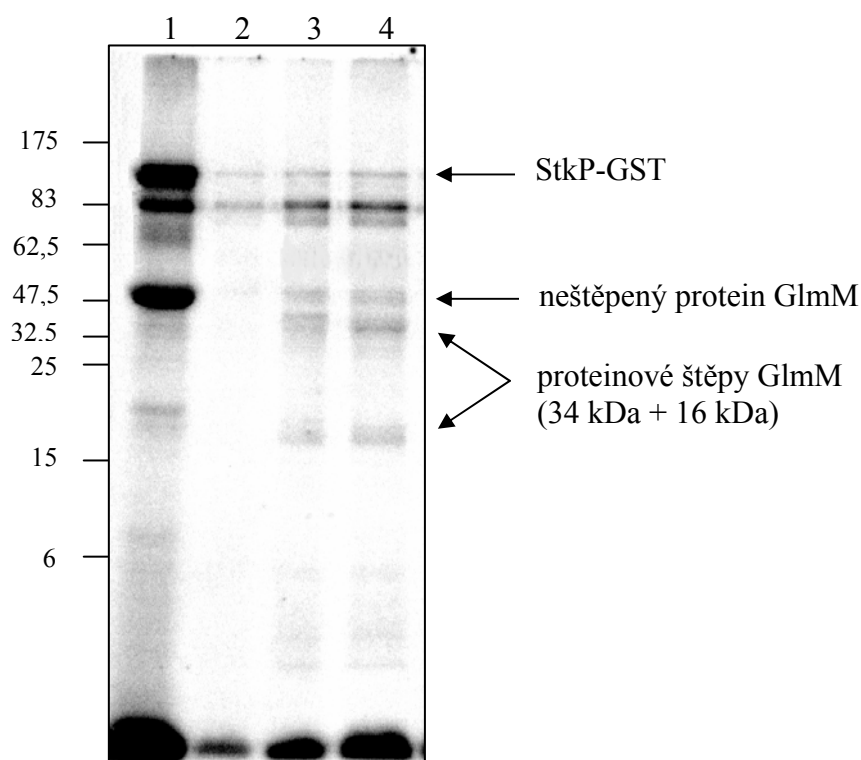
Výsledek tohoto experimentu znamená, že místem fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* je buď jiný aminokyselinový zbytek než konzervovaný serin v pozici 101, anebo že míst fosforylace je více.

5.2.6 Štěpení fosfoglukosaminmutasy thrombinem

Pro předběžnou představu lokalizace místa modifikace jsme fosforylovaný protein GlmM i mutantní protein S101AGlmM štěpili thrombinem. Tato sekvenčně specifická proteasa štěpí GlmM v pozici 141. Nejprve bylo nutné zjistit podmínky, za kterých dojde ke štěpení co největšího množství proteinu (data neuvedena). Jako nejvhodnější se ukázalo

použití 0,04 jednotek thrombinu pro štěpení 20 µg proteinu přes noc při 37°C. Proteiny GlmM a S101AGlmM jsme v *in vitro* kinázové reakci fosforylovali proteinkinasou StkP v přítomnosti [³²P] a poté podrobili proteolytickému štěpení. Proteinové štěpy jsme analyzovali pomocí jednorozměrné elektroforézy s využitím gradientového gelu a fosforylované štěpy vizualizovali pomocí PhosphorImageru Bas5000 (Fuji).

Obr. 5.16 ukazuje, že oba proteinové štěpy obou proteinů jsou fosforylované a to znamená, že k fosforylaci dochází na více než jednom aminokyselinovém zbytku.



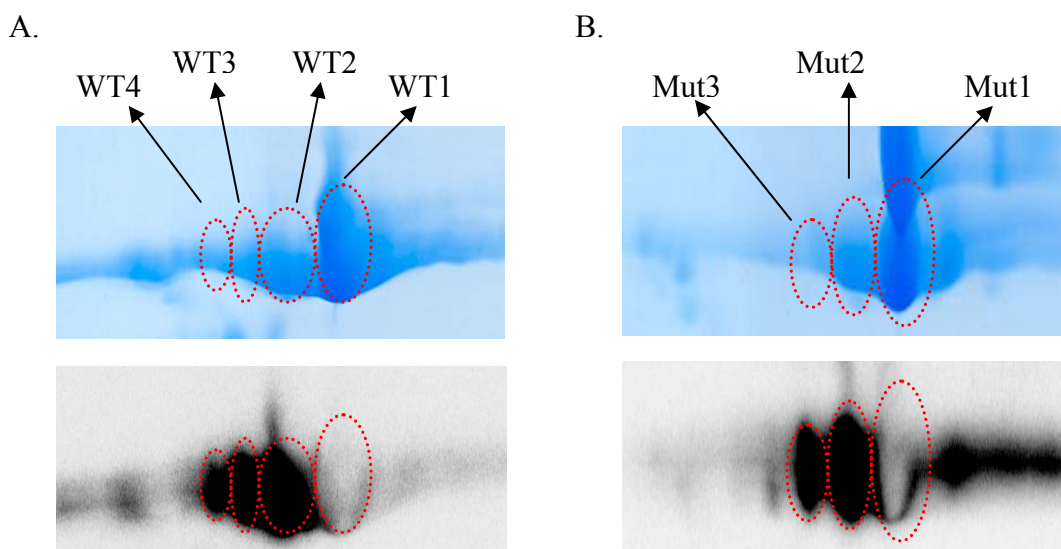
Obr. 5.16: Proteolytické štěpení radioaktivně fosforylované fosfoglukosaminmutasy GlmM (dráha 3) a mutantního proteinu S101AGlmM (dráha 4) sekvenčně specifickou proteasou thrombinem (autoradiogram). Dráha 1-fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM proteinkinasou StkP (bez následného štěpení), dráha 2-proteolytické štěpení autofosforylované proteinkinasy StkP. Dělení probíhalo na gradientovém gelu. Šipky naznačují pozice zkoumaných proteinů. Vlevo jsou vyznačeny pozice proteinových standardů.

5.2.7 Identifikace míst fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM

Na základě předchozích výsledků jsme se rozhodli pro přesnou identifikaci míst fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM, a to hmotnostní spektrometrií. Pro kvalitní rozdělení jednotlivých izoform proteinu jsme použili dvourozměrnou (2D) elektroforézu. Dělení fosforylované fosfoglukosaminmutasy GlmM v prvním rozměru, izoelektrická

fokusace, probíhalo v úzkém pH rozmezí 3-5,6 po dobu 48 hodin. Dělení v druhém směru probíhalo v 12,5% akrylamidovém gelu.

Z Obr. 5.17 vyplývá, že většina proteinu zůstává nefosforylovaná (WT1, Mut1). Rovněž je zřejmé, že protein GlmM se vyskytuje ve třech fosforylovaných izoformách (WT2-4), kdežto protein s bodovou mutací se vyskytuje pouze ve dvou fosforylovaných izoformách (Mut2 a 3).



Obr. 5.17: 2D elektroforéza radioaktivně fosforylované fosfoglukosaminmutasy GlmM (A) a mutantního proteinu S101AGlmM (B). Nahoře gel barvený koloidní Coomassie blue, dole autoradiogram. Jednotlivé izoformy jsou naznačeny červeně a popsány.

Mutace serinu v pozici 101 má tedy za následek ztrátu jedné fosforylované izoformy a tudíž je velmi pravděpodobné, že serin v pozici 101 je jedním z míst fosforylace.

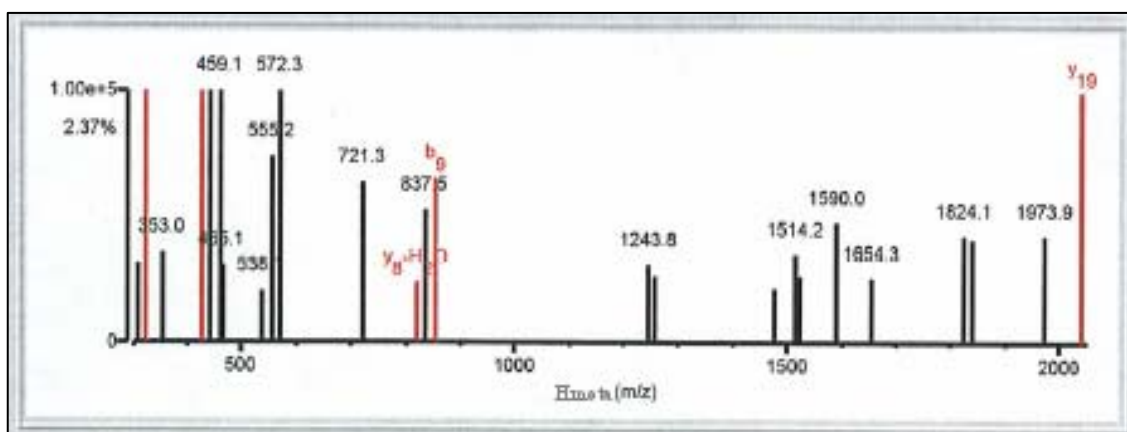
Jednotlivé proteinové skvrny jsme zpracovali pro následné štěpení endopeptidasou Glu-C. Tato serinová endopeptidasa štěpí peptidové vazby na C-konci kyseliny glutamové, případně asparagové, pokud za nimi nenásleduje prolin. Analýza modifikovaných aminokyselinových zbytků štěpených peptidů byla provedena na hmotnostním spektrometru ESI-ION-TRAP (XCT Ultra, Agilent).

Hmotnostní spektrometrií se podařilo identifikovat ve skvrně WT2 serin v pozici 99 jako jedno z míst fosforylace. Identifikované peptidy pokryly 53% sekvence proteinu (246 z 459 aminokyselin) (Obr. 5.18).

1	MSGKYFGTDG	VRGEANLELT	PELAFKLGRF	GGVLSQHET	EAPKVFVGRD	TRISGEMLES	ALVAGLLSVG	IHVYKLGVLA	80
81	TPAVAYLVET	EGASAGVMIS	ASHNPALDNG	IKFFGGDGFK	LDDEKEAEIE	ALLDAEEDTL	PRPSAEGGLI	LVDYPEGLRK	160
161	YEGYLVSTGT	PLDGMKVALD	TANGAASTSA	RQIFADLGAQ	LTVIGETPDG	LNINLNVGST	HPEALQEVVK	ESGSAIGLAF	240
241	DGDSRLIAV	DENGDIVDGD	KIMYIIGKYL	SKKQLAQNT	IVTVMSNLG	FHKALNREGI	NKAVTAVGDR	YVVEEMRKSG	320
321	YNLGGEQSGH	VILMDYNTTG	DGOLSAVQLT	KIMKETGKSL	SELAAEVTIY	POKLVNIRVE	NVMKEKAMEV	PAIKAIIEKM	400
401	EEEMAGNGRI	LVRPSGTEPL	LRVMAEAPT	EEVDYYVDTI	TDVVRAEIGI	DRSHHHHHH			459

Obr. 5.18: Znázornění identifikovaných peptidů po štěpení endopeptidasou Glu-C na hmotnostním spektrometru ESI-ION-TRAP. Červeně jsou znázorněny peptidy identifikované po štěpení. Serin v červeném rámečku byl identifikován jako místo fosforylace.

Naměřená hmota 2533,2140 Da odpovídající peptidu EGASAGVMISASH NPALDNGIKFFGGDG vykazovala odchylku od teoretické hmoty + 78,5814 Da, což odpovídá přítomnosti jedné fosfátové skupiny. Tento peptid obsahuje tři serinové zbytky, avšak pomocí fragmentační analýzy byl identifikován jako místo fosforylace serin v pozici 99 (Graf 5.3).



Graf 5.3: Fragmentační analýza peptidu.

5.2.8 Příprava proteinu se záměnou serinu v pozici 99 za alanin

Protein s touto mutací jsme připravili za použití komerční soupravy QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Pro amplifikaci a zavedení mutace jsme použili vektor GlnM(pTrcHis60). Pomocí oligonukleotidů WTS99A a WTS99A antisense jsme amplifikovali obě vlákna mateřského plazmidu. Reakční směs jsme následně inkubovali s restriční endonukleasou *DpnI*, jejíž činností došlo k rozštěpení metylovaného mateřského vektoru. Poté byla směs použita pro transformaci buněk *E. coli*

XL1-Blue. Pro amplifikaci s použitím vektoru S101AGlmM (pTrcHis60) byly využity oligonukleotidy S101AS99A a S101AS99A antisense.

Z neznámých důvodů se opakovaně nezdařilo vytvořit protein s dvojitou záměnou (serin v pozici 99 i 101 za alanin), během mutageneze vždy došlo k vyštěpení genu i s částí plazmidu. Plazmid nesoucí fosfoglukosaminmutasu s bodovou mutací serinu pouze v pozici 99 (S99A GlmM(pTrc60)) se připravit zdařilo, sekvence genu *glmM* byla ověřena sekvenováním.

5.2.9 Komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* GPM83 fosfoglukosaminmutasou GlmM *S. pneumoniae*

Dosud všechny charakterizované enzymy patřící mezi fosfoglukosaminmutasy byly schopny komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83, který má inaktivován gen *glmM* na chromozómu a kopii stejného genu nese na termosenzitivním plazmidu pGMM (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996).

I my jsme tedy chtěli prověřit schopnost proteinu GlmM *S. pneumoniae* komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83. Pro tento účel bylo nejprve nutné klonovat gen *glmM* do jiného expresního vektoru než pET28b (do vektoru, který nese jinou než kanamycinovou rezistenci). Použili jsme vektory pTrcHis30, respektive pTrcHis60 (Pompeo *et al.*, 1998). Tyto plazmidy jsou odvozené od vektoru pTrc99A (Pharmacia) a nesou rezistenci k ampicilinu a sekvenci kódující histidinovou kotvu na N-, respektive na C- konci. Gen *glmM* a jeho mutantní formu *S101AglmM* jsme amplifikovali pomocí oligonukleotidů GlmM-f (*Bsp*LU11I) a GlmM-r (*Bg*III). Fragменты jsme klonovali do vektoru pTrcHis60 štěpeného restrikčními endonukleasami *Nco*I a *Bg*III. Kohezní konec vzniklý restrikcí *Nco*I je kompatibilní s kohezním koncem vzniklým restrikcí *Bsp*LU11I. Pro zachování správného čtecího rámce jsme museli do sekvence oligonukleotidu GlmM-f (*Bsp*LU11I) přidat dva nukleotidy (CG), čímž došlo ke vzniku kodonu TCG kódujícího serin. Výsledné plazmidy byly nazvány GlmM(pTrcHis60) a S101AGlmM(pTrcHis60). Gen *glmM* jsme amplifikovali také pomocí oligonukleotidů GlmM-f (*Bam*HI) a GlmM-r (*Hind*III) a klonovali do vektoru pTrcHis30.

Připravili jsme kompetentní buňky *E. coli* GPM83 metodou podle Dagerta a Ehrlicha (1979), buňky transformovali připravenými vektory a schopnost komplementace jsme posuzovali podle růstu bakterií v nepermisivní teplotě 42°C. Buňky jsme rovněž

vyseli na plotny obsahující IPTG, a to v koncentraci 10 μ M, 100 μ M a 1 mM, abychom indukovali expresi daného proteinu. Jako pozitivní kontrola sloužil vektor *E. c.* GlmM(pTrcHis60), nesoucí gen kódující fosfoglukosaminmutasu GlmM *E. coli* (poskytl Dr. D. Mengin-Lecreulx). Jako negativní kontrola byl pro transformaci použit prázdný vektor pTrcHis60.

Protein GlmM s histidinovou kotvou na C-konci byl schopen komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* GPM83 i bez přítomnosti IPTG. Protein GlmM s histidinovou kotvou na N-konci však komplementoval pouze v přítomnosti IPTG, a to v koncentraci 10 μ M a 100 μ M. Histidinová kotva na N-konci proteinu tedy působí negativně, důvodem je pravděpodobně změna konformace aktivního místa, které se rovněž nachází na N-konci proteinu. Mutantní protein S101AGlmM nebyl komplementace schopný, ani v přítomnosti 1 mM IPTG.

Schopnost komplementace byla testována i u proteinu se záměnou serinu 99 za alanin a bylo zjištěno, že i tato mutace znemožňuje komplementaci (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Schopnost fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* a jejích mutantních forem komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83.

Protein	30°C	42°C	42°C +10 μ M IPTG	42°C +100 μ M IPTG	42°C +1 mM IPTG
GlmM-C-his*	+	+	+	+	+
GlmM-N-his*	+	-	+	+	-
S101A GlmM	+	-	-	-	-
S99A GlmM	+	-	-	-	-

*Proteiny se liší pozicí histidinové kotvy (C-his-histidinová kotva na C-konci proteinu, N-his-histidinová kotva na N-konci proteinu).

5.2.10 UDP-N-acetylglukosaminpyrofosforylasa GlmU

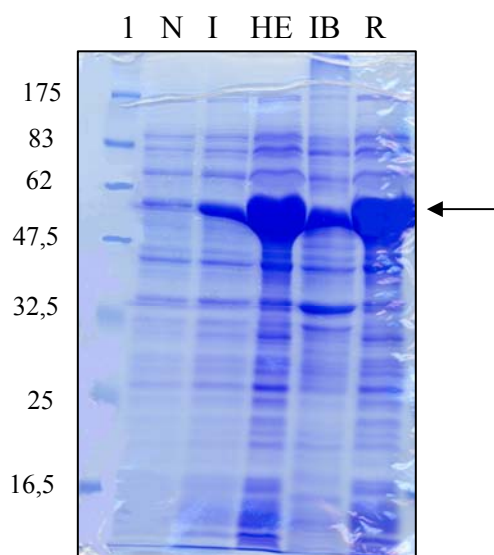
5.2.10.1 Příprava rekombinantního proteinu GlmU

Fosfoglukosaminmutázová aktivita proteinu GlmM se měří ve spřažených enzymatických systémech. Jedním z enzymů, jehož přítomnost v reakční směsi je nezbytná, je UDP-N-acetylglukosaminpyrofosforylasa GlmU. Tento enzym není komerčně dostupný, a tudíž jsme gen *glmU* klonovali do expresního vektoru, protein nadprodukovali a izolovali.

Gen pro GlmU byl amplifikován pomocí *Pfu* polymerasy (Stratagene) a chromozomální DNA *S. pneumoniae* jako templátu. Protože v databázi genomu *S. pneumoniae* (www.tigr.org) byly navrženy dva alternativní počátky genu, pro

amplifikaci byly použity oligonukleotidy GlnUT4-f (*NdeI*) a GlnUR6-f (*NdeI*) a reverzní oligonukleotid GlnU-r (*XhoI*). Produkty reakce PCR jsme podrobili působení restričních endonukleas a klonovali do příslušně štěpeného expresního vektoru pET28b. Přestože jsme se pokusili amplifikovat oba fragmenty, pouze kratší fragment (amplifikovaný pomocí oligonukleotidu GlnUT4-f) se nám podařilo úspěšně klonovat do vektoru.

Tímto vektorem jsme transformovali buňky *E. coli* BL21(DE3) a poté protein nadprodukovali. Nadprodukovaný protein se nacházel převážně v rozpustné frakci (Obr. 5.18), ze které byl následně purifikován podle klasického protokolu. Protože se ukázalo, že nadprodukovaný protein je funkční, amplifikací a klonováním delšího fragmentu jsme se dále nezabývali.



Obr. 5.18: Nadprodukce rekombinantního proteinu GlnU. N-neindukovaná kontrola, I-indukovaná kontrola, HE-hrubý extrakt, IB-inklúze, R-rozpustná frakce. V dráze 1 je nanesen proteinový standard (molekulové hmotnosti v kDa). Šipkou je naznačena poloha GlnU.

5.2.10.2 Komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* USG83 proteinem GlnU *S. pneumoniae*

Protein UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasa GlnU patří mezi esenciální enzymy a, podobně jako v případě GlnM, byl připraven podmíněně letální kmen *E. coli* USG83, který má inaktivován gen *glnU* na chromozómu a identickou kopii genu nese na termosenzitivním plazmidu pGMU (Mengin-Lecreux a van Heijenoort, 1993). Připravili jsme proto expresní konstrukt GlnU(pTrcHis30) a testovali schopnost proteinu GlnU

S. pneumoniae, fúzovaného s histidinovou kotvou, komplementovat kmen *E. coli* USG83 (Tab. 5.2). K dispozici jsme měli i konstrukt GlmU(pTrec99A), kde UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasa GlmU *S. pneumoniae* nebyla fúzovaná s histidinovou kotvou (poskytl Dr. D. Mengin-Lecreulx). Tento konstrukt sloužil jako pozitivní kontrola při testech komplementace, neboť již dříve bylo zjištěno, že komplementuje podmíněně letální kmen *E. coli* USG83 (Dr. D. Mengin-Lecreulx, ústní sdělení).

Prokázali jsme, že přítomnost histidinové kotvy na N-konci GlmU proteinu nikterak neovlivňuje jeho schopnost komplementovat kmen *E. coli* USG83 (Tab. 5.2), a tudíž nemá vliv na enzymovou aktivitu.

Tab. 5.2: Schopnost UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasy GlmU *S. pneumoniae* komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* USG83.

Protein	30°C	42°C
GlmU-N-his*	+	+

*Histidinová kotva se nachází na N-konci proteinu.

5.2.11 Testování fosfoglukosaminmutázové aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích mutantních forem

Mengin-Lecreulx a van Heijenoort (1996) popsali kopurifikaci endogenní epitopem neznačené fosfoglukosaminmutasy GlmM při pokusu o izolaci epitopem značené fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* nadprodukované v buňkách *E. coli* JM83.

Z tohoto důvodu jsme pro testy enzymatických aktivit fosfoglukosaminmutasu GlmM *S. pneumoniae* a její mutantní formy izolovali z buněk *E. coli* GPM83 získaných v komplementačních studiích, které nesly příslušné expresní vektory.

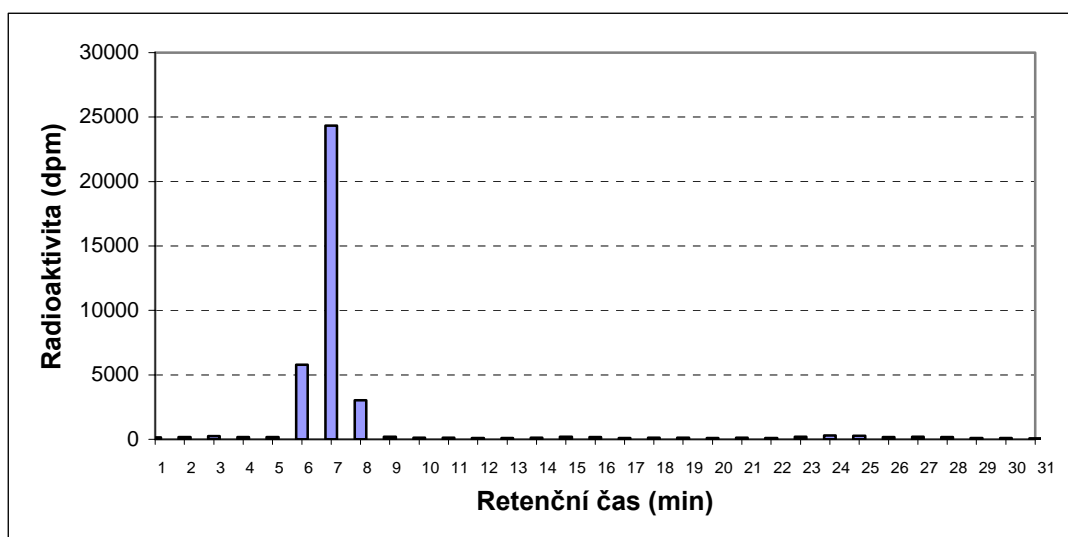
Pro nadprodukcii jsme použili proteiny s histidinovou kotvou na C-konci. Izolované proteiny jsme přes noc dialyzovali proti 20 mM fosfátovému pufru, který obsahoval 0,3 mM MgCl₂.

5.2.11.1 Přeměna glukosamin-6-fosfátu na glukosamin-1-fosfát

Aktivitu enzymu jsme nejprve testovali v enzymatickém systému spřaženém s enzymem GlmU (UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasa). Substrát reakce glukosamin-6-fosfát je aktivitou fosfoglukosaminmutasy GlmM přeměněn na glukosamin-

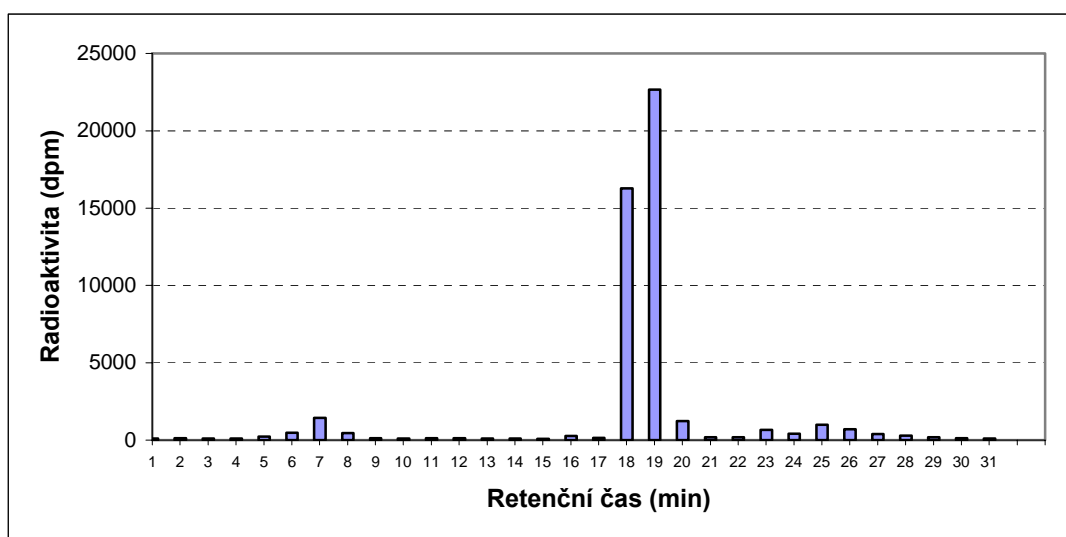
1-fosfát. Následuje jeho acetylace bifunkčním enzymem GlmU na *N*-acetyl-glukosamin-1-fosfát a uridylyace na konečný produkt reakce UDP-*N*-acetylglukosamin (viz kapitola 2.3.4.1, *Obr. 2.10*). Do reakce jsme jako zdroj acetylu přidali radioaktivně značený acetylkoenzym A [¹⁴C-acetyl]. Produkty reakce jsme separovali pomocí HPLC na koloně Nucleosil 100 (C18 reverzní fáze) za podmínek popsanych v kapitole 4.2.5.2. Během chromatografické analýzy jsme odebírali frakce v jednodominutových časových intervalech a proměřovali je na scintilačním přístroji (Wallac DSA 1409). Množství přeměněného AcCoA bylo použito pro výpočet specifické aktivity enzymu (nmol/min/mg proteinu).

Nejprve byla provedena orientační „kalibrace“ chromatografické kolony, která sloužila k identifikaci retenčního času možného meziprojektu GlcNAc-1P, konečného produktu reakce UDP-GlcNAc a do reakce přidaného substrátu AcCoA. Pro tuto analýzu jsme využili skutečnost, že protein GlmU v přítomnosti AcCoA a v nepřítomnosti UTP přeměňuje GlcN-1P pouze na GlcNAc-1P, jehož retenční čas jsme v našich podmínkách určili mezi šestou a osmou minutou (*Graf 5.3*). Pokud však do reakční směsi přidáme oba substráty, AcCoA i UTP, dojde k přeměně až na UDP-GlcNAc a retenční čas tohoto konečného produktu byl určen mezi sedmnáctou a osmnáctou minutou analýzy (*Graf 5.4*). Retenční čas nespoteřebovaného acetylkoenzymu A se pohyboval mezi 24. a 26. minutou (*Graf 5.4*). Z *Grafu 5.3* a *Grafu 5.4* zároveň zřetelně plyne, že jednotlivé radioaktivní látky v reakci vznikající (GlcNAc-1P, UDP-GlcNAc) nebo do reakce přidané (AcCoA) se liší svým retenčním časem natolik, že nemůže docházet k jakékoli jejich záměně.



Graf 5.3: Retenční čas *N*-acetylglukosamin-1-fosfátu.

V prvním případě došlo k úplnému vyčerpání AcCoA a vzniku GlcNAc-1P. V druhém případě jsme byli schopni detekovat malé množství nespotřebovaného AcCoA a rovněž jsme zaznamenali kromě konečného produktu reakce UDP-GlcNAc i přítomnost GlcNAc-1P. Tyto výsledky by mohly naznačovat, že acetylázová aktivita proteinu GlmU je vyšší než aktivita uridilační.



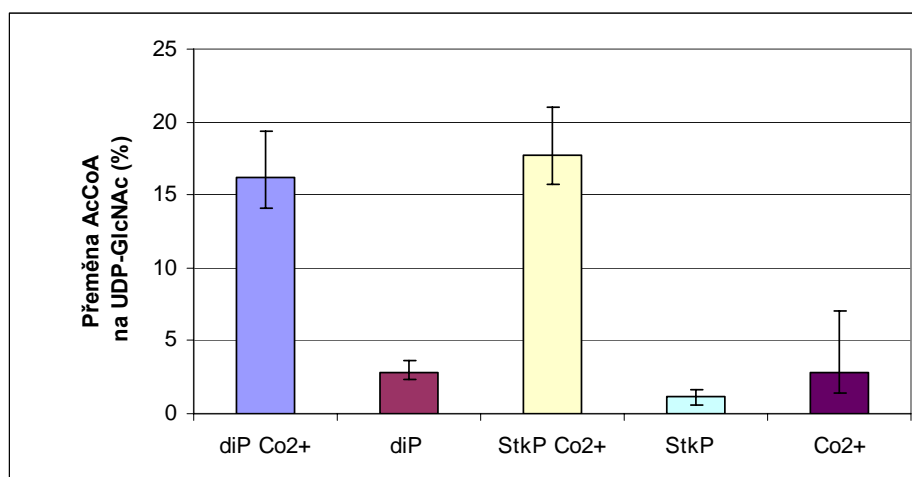
Graf 5.4: Retenční čas UDP-N-acetylglukosaminu.

Aktivitu enzymu jsme měřili v několika uspořádáních, ve kterých jsme jako zdroj fosfátové skupiny testovali glukosa-1,6-difosfát a ATP. Glukosa-1,6-difosfát nahrazuje komerčně nedostupný intermediát reakce GlcN-1,6-diP, a reakce probíhala v přítomnosti nebo nepřítomnosti kobaltnatých iontů (diP + Co²⁺; diP). Roli ATP jsme studovali v přítomnosti proteinkinasy StkP a kobaltnatých iontů (StkP + Co²⁺), v přítomnosti StkP (StkP) a v přítomnosti kobaltnatých iontů (Co²⁺).

Z *in vitro* kinázových reakcí víme, že protein GlmM není schopný autofosforylace, a že není proteinkinásou StkP fosforylován bez účasti kobaltnatých iontů, poslední dvě testované reakce tedy měly sloužit jako negativní kontroly. V *Grafu 5.5* je znázorněno množství AcCoA přeměněného enzymem GlmM za jednotlivých reakčních podmínek. Data použitá pro tvorbu grafu pocházejí z pěti nezávislých měření a rozptyl hodnot je znázorněn chybovými úsečkami.

Z *Grafu 5.5* vyplývá, že enzym je funkční a vykazuje aktivitu, pokud je zdrojem fosfátové skupiny v přítomnosti kobaltnatých iontů glukosa-1,6-difosfát. Protein je také aktivován fosforylací prostřednictvím proteinkinasy StkP, rovněž v přítomnosti

kobaltnatých iontů, v tomto případě je zdrojem fosfátové skupiny ATP. Specifická aktivita enzymu byla spočítána jako množství acetylkoenzymu A spotřebovaného za minutu na mg proteinu. Hodnoty specifických aktivit fosfoglukosaminmutasy GlnM v testovaných uspořádáních ukazuje *Tab. 5.3*.



Graf 5.3: Přeměna acetylkoenzymu A na UDP-N-acetylglukosamin činností fosfoglukosaminmutasy GlnM v závislosti na zdroji fosfátové skupiny a přítomnosti kobaltnatých iontů. Chybové úsečky naznačují rozptyl hodnot mezi jednotlivými měřeními.

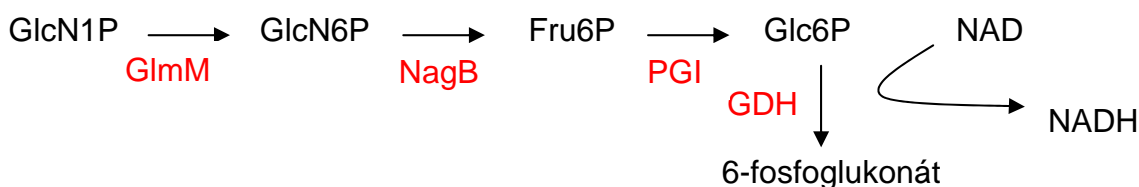
Tab. 5.3: Specifická aktivita fosfoglukosaminmutasy při přeměně glukosamin-6-fosfátu na glukosamin-1-fosfát v závislosti na zdroji fosfátové skupiny a přítomnosti kobaltnatých iontů.

Zdroj fosfátu	Specifická aktivita (nmol/min/mg)
diP + Co ²⁺	1,72 ± 0,25
diP	0,29 ± 0,06
StkP + Co ²⁺ +ATP	1,88 ± 0,26
StkP +ATP	0,13 ± 0,05
Co ²⁺ +ATP	0,30 ± 0,13

Rovněž jsme testovali aktivitu obou mutantních forem GlnM, nicméně ani v jednom případě nebyla jejich enzymatická aktivita detekována.

5.2.11.2 Přeměna glukosamin-1-fosfátu na glukosamin-6-fosfát

Zpětná reakce byla testována v jiném, rovněž spřaženém systému enzymatických reakcí. Substrát, tentokrát glukosamin-1-fosfát, je aktivitou fosfoglukosaminmutasy GlmM přeměněn na glukosamin-6-fosfát. Ten je následně deaminován glukosamin-6-fosfát-deaminasou (NagB, Altamirano *et al.*, 1993) za vzniku fruktosa-6-fosfátu. Činností dalšího enzymu, fosfoglukoisomerasy PGI dojde k izomeraci na glukosa-6-fosfát a aktivitou glukosa-6-fosfátdehydrogenasy vzniká 6-fosfoglukonát a uvolněné vodíkové kationty reagují s NAD, přičemž vzniká NADH, které absorbuje světlo při vlnové délce $\lambda = 340$ nm (Obr. 5.19). Specifická aktivita fosfoglukosaminmutasy GlmM je pak počítána jako množství molů NADH vznikajícího za minutu na mg proteinu. Extinkční koeficient NADH $\varepsilon = 6,2$.



Obr. 5.19: Schématické znázornění reakčních kroků při přeměně glukosamin-1-fosfátu na 6-fosfoglukonát.

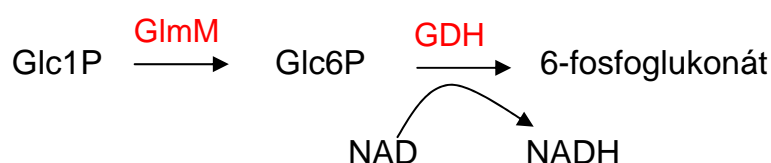
Vypočtené specifické aktivity GlmM i mutantních forem proteinu jsou uvedeny v Tab. 5.4. Opět se ukazuje esenciální role serinu v pozici 101, neboť protein s bodovou mutací této aminokyseliny nevykazuje měřitelnou aktivitu. Aktivitu proteinu s mutací serinu v pozici 99 jsme byli schopni zaznamenat. Protein vykazoval nízkou aktivitu, pouze však po aktivaci fosforylací proteinkinásou StkP. Zdá se tedy, že rovněž fosforylace serinu v pozici 99 je pro aktivitu enzymu ve zpětné reakci potřebná, i když ne esenciální.

Tab. 5.4: Fosfoglukosaminmutázová aktivita GlmM, S101AGlmM a S99AGlmM.

Zdroj fosfátu	Specifická aktivita ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		
	GlmM	S101AGlmM	S99AGlmM
StkP + Co^{2+} + ATP	$0,300 \pm 0,052$	0,000	$0,011 \pm 0,002$
diP + Co^{2+}	$0,067 \pm 0,014$	0,000	0,000
diP	$0,013 \pm 0,008$	0,000	0,000

5.2.12 Testování fosfoglukomutázové aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích mutantních forem

Schopnost fosfoglukosaminmutasy GlmM rozeznat glukosa-1-fosfát jako svůj substrát byla testována ve spráženém enzymatickém systému a opět bylo měřeno množství vznikajícího NADH změnou absorbance při vlnové délce $\lambda = 340$ nm. Glukosa-1-fosfát je fosfoglukosaminmutasou GlmM přeměněna na glukosa-6-fosfát a činností glukosa-6-fosfátdehydrogenasy vzniká 6-fosfoglukonát a NADH (Obr. 5.20). Tab. 5.5 uvádí hodnoty specifických aktivit proteinu GlmM i jeho mutantních forem.



Obr. 5.20: Schématické znázornění reakčních kroků při přeměně glukosa-1-fosfátu na 6-fosfoglukonát.

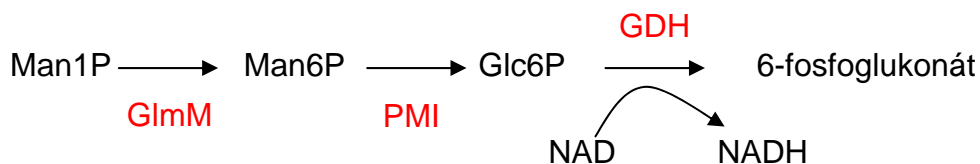
Tab. 5.5: Fosfoglukomutázová aktivita GlmM, S101AGlmM a S99AGlmM.

Zdroj fosfátu	Specifická aktivita ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		
	GlmM	S101AGlmM	S99AGlmM
StkP + Co^{2+} + ATP	$0,053 \pm 0,003$	0,000	$0,007 \pm 0,001$
diP + Co^{2+}	$0,006 \pm 0,002$	0,000	0,000
diP	$0,001 \pm 0,0005$	0,000	0,000

Jak je z Tab. 5.5 zřejmé, fosfoglukosaminmutasa GlmM umí rozpoznat glukosa-1-fosfát jako svůj substrát. Vzhledem ke specifické fosfoglukosaminmutázové (1P \rightarrow 6P) aktivitě je však patrný pokles aktivity v rozsahu jednoho řádu u všech testovaných uspořádání. Mutantní forma S101AGlmM tuto aktivitu nevykazuje, protein S99AGlmM si po fosforylaci proteinkinasou StkP částečně aktivitu zachoval, došlo k poklesu o jeden řád oproti aktivitě nemutované formy.

5.2.13 Testování fosfomannomutázové aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM a jejích mutantních forem

Fosfomannomutázovou aktivitu fosfoglukosaminmutasy GlmM jsme testovali pomocí reakčního sledu vedoucího od mannosy-1-fosfátu k 6-fosfoglukonátu za účasti GlmM, fosfomannoisomerasy a glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (Obr. 5.21).



Obr. 5.21: Schématické znázornění reakčních kroků při přeměně mannosu-1-fosfátu na 6-fosfoglukonát.

Množství vznikajícího NADH opět sloužilo k výpočtu specifické aktivity enzymu, která je uvedena v Tab. 5.6.

Tab. 5.6: Fosfomannomutázová aktivita GlmM, S101AGlmM a S99AGlmM.

Zdroj fosfátu	Specifická aktivita ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		
	GlmM	S101AGlmM	S99AGlmM
StkP + Co^{2+} + ATP	0,007 \pm 0,001	0,000	0,002 \pm 0,0005
diP + Co^{2+}	0,002 \pm 0,0003	0,000	0,000
diP	0,000	0,000	0,000

Fosfoglukosaminmutasa GlmM rozeznává jako svůj substrát i mannosu-1-fosfát. Na rozdíl od fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* je však tato aktivita velmi nízká, oproti hodnotě fosfoglukosaminmutázové (1P \rightarrow 6P) aktivitě došlo k poklesu o dva řády. Protein s mutací serinu v pozici 101 je neaktivní, protein se záměnou serinu 99 za alanin je aktivní po aktivaci fosforylací proteinkinásou StkP a jeho aktivita je řádově srovnatelná s aktivitou nemutovaného proteinu.

5.2.14 Srovnání enzymatických aktivit fosfoglukosaminmutas GlmM *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. pneumoniae*

Fosfoglukosaminmutasa GlmM *E. coli* byla prvním charakterizovaným enzymem této skupiny a hodnoty specifických aktivit pro jednotlivé enzymatické vlastnosti tohoto enzymu byly určeny nejdříve (Jolly *et al.*, 1999). Bylo ukázáno, že fosfoglukosaminmutasa GlmM *E. coli* efektivně přeměňuje glukosa-1-fosfát na glukosa-6-fosfát v přítomnosti glukosa-1,6-difosfátu. Nicméně rychlost reakce byla 1400-krát nižší než rychlost reakce fosfoglukosaminmutázové (1P \rightarrow 6P) (0,007 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ vs. 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ -protein bez histidinové kotvy). Hodnota fosfoglukosaminmutázové aktivity byla určena i pro protein

s histidinovou kotvou a činí 3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Druhým enzymem, u něž byly tyto enzymatické aktivity testovány, byla fosfoglukosaminmutasa GlmM *P. aeruginosa* (Tavares *et al.*, 2000). Fosfoglukosaminmutázová aktivita tohoto enzymu byla určena 2,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (protein s histidinovou kotvou), což byla hodnota téměř totožná s hodnotou určenou pro fosfoglukosaminmutasu *E. coli* s histidinovou kotvou. Fosfoglukomutázová aktivita proteinu GlmM *P. aeruginosa* dosahovala 2,3% fosfoglukosaminmutázové aktivity (0,06 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Poprvé byla měřena i aktivita fosfomannomutázová, která dosahovala dokonce vyšších hodnot než aktivita fosfoglukomutázová, 0,55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (22% fosfoglukosaminmutázové aktivity). Dodatečně tedy byla testována schopnost GlmM *E. coli* přeměňovat mannosu-1-fosfát na mannosu-6-fosfát a bylo zjištěno, že fosfomannomutázová aktivita reprezentuje téměř 18% aktivity fosfoglukosaminmutázové (1,75 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Z našich měření vyplývá, že fosfoglukosaminmutázová aktivita (1P \rightarrow 6P) GlmM *S. pneumoniae* má hodnotu 0,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Oproti fosfoglukosaminmutase *E. coli* a *P. aeruginosa* protein GlmM *S. pneumoniae* vykazuje velmi nízkou hodnotu fosfomannomutázové aktivity (0,007 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), která činí zhruba 2,3% fosfoglukosaminmutázové aktivity a poměrně vysokou fosfoglukomutázovou aktivitu (0,053 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), která činí zhruba 18% fosfoglukosaminmutázové aktivity.

5.2.15 Analýza složení buněčné stěny kmene *S. pneumoniae* Cp1015 a delečního mutantu ΔstkP

5.2.15.1 Obsah peptidoglykanu a množství jeho prekurzorů

Kmen *S. pneumoniae* Cp1015 a deleční kmen ΔstkP byly porovnávány z hlediska složení buněčné stěny. V Tab. 5.7 je uvedeno množství peptidoglykanu obou kmenů, a jak je z porovnání zřejmé, obsah peptidoglykanu se téměř neliší (rozdíl činí pouhých 7,5%). Poměr glukosaminu ku kyselině muramové je u obou kmenů 1,78. Poměr těchto dvou složek peptidoglykanu v buňce za normálních okolností činí 1. Nadbytek glukosaminu tedy svědčí o přítomnosti jiného polymeru kovalentně vázaného k peptidoglykanu. Tento polymer byl identifikován jako galaktosamin pocházející z teichoových kyselin.

Poměr mezi množstvím galaktosaminu a glukosaminu v případě mutantního kmene činí 1,15, zatímco u divokého kmene poměr činí 0,67. Tato odchylka je jediným významným rozdílem obou zkoumaných kmenů. Z těchto měření můžeme tedy vyvozovat,

že mutantní kmen *S. pneumoniae* Δ stkP se vyznačuje vyšším množstvím teichoových kyselin na svém povrchu, či jejich odlišným složením.

Dále jsme analyzovali množství prekurzorů peptidoglykanu u obou kmenů. Výsledky jsou shrnuty v *Tab. 5.7*. Obecně lze říci, že množství prvních prekurzorů peptidoglykanu, UDP-GlcNAc a UDP-MurNAc, jsou velmi malá, nicméně v případě mutantního kmene vyšší. Množství pozdních prekurzorů, počínaje UDP-MurNAc-L-Ala a konče UDP-MurNAc-pentapeptidem, jsou u mutantního kmene jednoznačně snížena. Jediným výrazným rozdílem mezi kmeny, je poměr mezi UDP-GalNAc (pocházejícího z teichoových kyselin) a UDP-MurNAc-pentapeptidem (složka peptidoglykanu), který je 6,8-krát vyšší u mutantního kmene v porovnání s kmenem divokým. V *Tab. 5.7* je rovněž uveden UDP-MurNAc- L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala, což není skutečný prekurzor peptidoglykanu, spíše se jedná o degradační produkt UDP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala cytoplazmatickou D,D karboxypeptidasou.

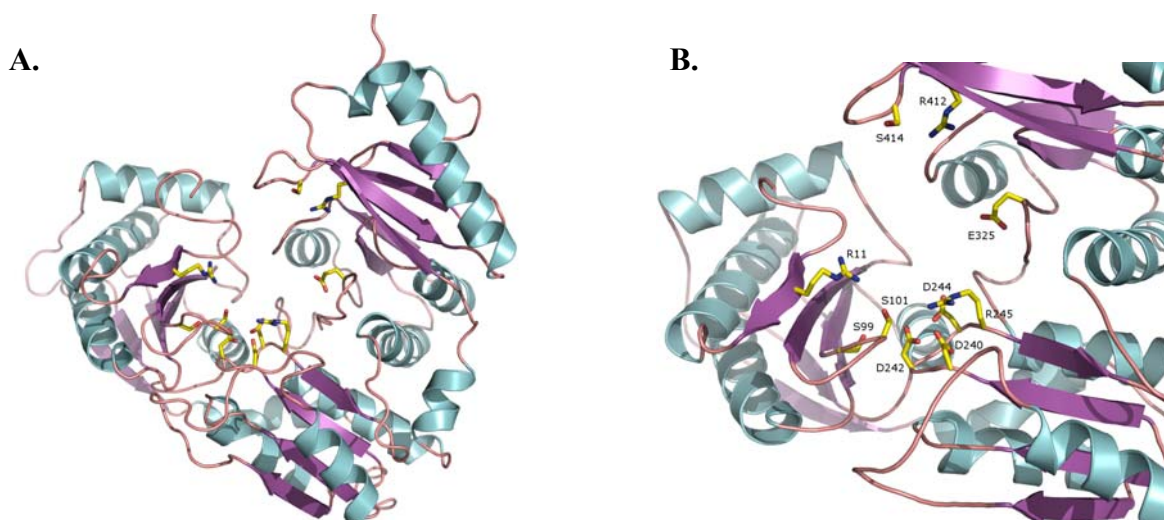
Tab. 5.7: Obsah peptidoglykanu a jeho prekurzorů v buněčné stěně *S. pneumoniae* Cp1015 a Δ stkP. Množství jednotlivých složek jsou udávána v nanomolech na gram mokrě váhy.

Prekurzory:	Cp1015	Δ stkP
UDP-GlcNAc	6	25
UDP-MurNAc	5	15
UDP-MurNAc-L-Ala	30	3
UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu	150	10
UDP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys	120	40
UDP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala	300	130
UDP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala	1430	580
UDP-GalNAc	2,5	7
Peptidoglykan	4050	3750
Glukosamin (v peptidoglykanu + v ostatních částech buněčné stěny)	7200 (4050 + 3150)	6700 (3750 + 2950)
Glukosamin/kyselina muramová	1,78	1,78
Galaktosamin (v jiných částech buněčné stěny)	4800	7700
UDP-GalNAc/UDP-MurNAc-pentapeptid	$1,75 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$

5.2.16 Simulace 3-D struktury fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*

Strukturní model GlmM *S. pneumoniae* (Obr. 5.22A) byl vytvořen metodou homologního modelování pomocí programu DeepView (Swiss PDB viewer) verze 3.7 a serveru SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Na základě nejvyšší sekvenční homologie (sekvenční identita 33%, sekvenční podobnost 50%) byla jako templát vybrána krystalová struktura fosfomannomutasy/fosfoglukomutasy PMM/PGM archaebakterie *Pyrococcus horikoshii* (PDB kód 1WQA) (Akutsu *et al.*, 2005). Výběr vhodného templátu byl proveden pomocí nástroje „Template Identification“, který je součástí SWISS MODEL WORKSPACE (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_target_identification1).

Vysoce konzervované aminokyselinové zbytky, které hrají důležitou roli v aktivním centru fosfohexomutasy (Shackelford *et al.*, 2004), byly nalezeny v aktivním centru fosfoglukosaminmutasy GlmM v těsné blízkosti serinu v pozici 99 a serinu v pozici 101 (Obr. 5.22B).



Obr. 5.22: (A). 3-D struktura fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*. (B). Detail aktivního centra proteinu s vyznačenými vysoce konzervovanými aminokyselinovými zbytky.

6 Diskuze

6.1 Ser/Thr proteinkinasa StkP funguje *in vivo* ve formě dimeru

V současné době je prokázáno, že Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu se nacházejí u mnoha bakterií, kde regulují četné buněčné procesy (Krupa *et al.*, 2005). Funkce mnoha těchto proteinů již byla zčásti osvětlena, nicméně stále je známo jen velmi málo o mechanismu vedoucím k jejich aktivaci.

Senzorové receptory eukaryotních organismů jsou prozkoumány lépe a bylo popsáno, že Ser/Thr receptorová proteinkinasa TGF- β po vazbě ligandu tvoří stabilní dimery. Dimerizace TGF- β pak usnadňuje autofosforylaci katalytické domény (Massagué, 1998). Nedávno byla dimerizace prokázána u bakteriální transmembránové Ser/Thr proteinkinasy PrkC *B. subtilis* (Madec *et al.*, 2002). Autorům se ovšem nepodařilo připravit fúzní konstrukt, který by nesl kinázovou doménu proteinkinasy PrkC a tudíž schopnost kinázové domény tvořit dimery nemohla být testována. Problémy s přípravou konstruktů autoři vysvětlují velkou nestabilitou kinázové domény pokud je v hostitelském organismu syntetizována samotná (Madec *et al.*, 2002). Souvislost mezi aktivitou proteinkinasy PrkC a tvorbou dimerů nebyla v této práci analyzována. V současné době se objevují publikace zabývající se krystalografickými studiemi Ser/Thr proteinkinasy PknB a PknE patogenní bakterie *M. tuberculosis* (Youth *et al.*, 2003, Gay *et al.*, 2006). Tyto studie podporují hypotézu, že dimerizace je pro funkci enzymu rozhodující. Greenstein a kol. (2006) navrhuje, že dimerizace vede k regulaci aktivity Ser/Thr proteinkinasy, a že tento jev je univerzální pro celou rodinu bakteriálních Ser/Thr proteinkinasy, obdobně jako u jejich eukaryotních homologů.

Dřívější výsledky publikované v diplomové práci (Pallová, 2003) vedly k závěru, že delece C-terminální domény proteinkinasy StkP včetně transmembránové domény má velký dopad na fenotypové projevy mutantního kmene. Tyto projevy byly totožné jako u kmene s delecí celého genu kódujícího proteinkinasy StkP. Tato skutečnost nás vedla k vyslovení hypotézy, že absence C-terminální senzorové domény má za následek přerušování signální dráhy StkP a ve svém důsledku identický fenotypový projev jako u delečního mutantu (Pallová, 2003). Pokusy o detekci autofosforylační aktivity zkráceného proteinu v subcelulárních frakcích *S. pneumoniae* Cp1015 byly neúspěšné a rovněž pokusy o jeho detekci pomocí monoklonální či polyklonální protilátky v subcelulárních frakcích *S. pneumoniae* Cp1015 byly negativní. Domnívali jsme se, že interakce proteinu

s buněčnou membránou by mohla mít za následek jeho stabilizaci. Z tohoto důvodu jsme připravili mutantní kmen *S. pneumoniae* Cp1015 kódující proteinkinasy StkP pouze s delecí C-terminální domény a současným zachováním transmembránové domény. Přítomnost transmembránové domény vedla k ukotvení proteinu do membrány. Ověřováním enzymatické aktivity proteinu jsme prokázali, že se jedná o funkční protein schopný autofosforylace a potvrdili jsme jeho membránovou lokalizaci (Pallová *et al.*, 2007).

V další fázi jsme se pokusili purifikovat epitopem značené formy proteinkinasy StkP pomocí afinitní chromatografie. Opakovaně jsme však při tomto pokusu neuspěli při izolaci zkráceného proteinu, kinázové domény proteinkinasy StkP. Izolace a purifikace úplné formy StkP a kinázové domény s transmembránovým segmentem byla úspěšná.

Ve snaze osvětlit, zda dochází k expresi zkráceného proteinu, kinázové domény proteinkinasy StkP, izolovali jsme celkovou RNA z kultury mutantního kmene (při OD₄₀₀ = 0,5 a 1). Po přepsání reverzní transkriptasou do podoby cDNA jsme pomocí několika PCR reakcí amplifikovali fragmenty odpovídající částem sekvence, která kóduje kinázovou doménu. Prokázali jsme tedy, že mRNA odpovídající kinázové doméně se v buňkách vyskytuje bez ohledu na růstovou fázi kultury.

Tyto výsledky naznačují, že vlastnosti transmembránové domény jsou pro katalytickou funkci nebo stabilitu proteinu nezbytné. Přítomnost transmembránové domény je například nezbytná pro stabilitu proteinu TrwB, jež se účastní procesu bakteriální konjugace (Hormaeche *et al.*, 2003). Nestabilita kinázové domény proteinkinasy PrkC *B. subtilis* již byla zmíněna (Madec *et al.*, 2002).

Na druhou stranu schopnost Ser/Thr proteinkinasy PrkC *B. subtilis*, homologu proteinkinasy StkP, tvořit dimery skrze svou transmembránovou a C-terminální doménu, naznačovala možnost, že rovněž proteinkinasa StkP dimerizuje. Proces dimerizace by mohl vést k vysvětlení její aktivace. Z tohoto důvodu jsme schopnost dimerizace proteinkinasy StkP testovali. Z našich výsledků (Pallová *et al.*, 2007), kterých jsme dosáhli pomocí *in vivo* reportérového systému založeného na represoru cI bakteriofága lambda vyplývá, že transmembránová doména a C-terminální doména jsou efektivní dimerizační motivy, kdežto kinázová doména nikoli. Tyto výsledky jsme následně potvrdili pomocí nativní elektroforézy, kdy jsme ukázali, že rekombinantní proteinkinasa StkP fúzovaná s GST putuje v gelu ve formě dimeru, kdežto rekombinantní kinázová doména proteinkinasy StkP migruje jako monomer. Dále jsme porovnali účinnost inkorporace [³²P] těchto proteinů a zjistili jsme, že zkrácený rekombinantní protein inkorporuje fosfátovou skupinu s účinností

dosahující 57% intaktního proteinu. Tato skutečnost by mohla znamenat, že v dimerní molekule dochází k transfosforylaci, tj. přenosu fosfátové skupiny z jedné homologní molekuly na druhou (Pallová *et al.*, 2007). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky publikovanými v práci (Nováková *et al.*, 2005), kde je navrženo, že kinetické parametry autofosforylace obou forem proteinů jsou rozdílné a účinnost fosforylace zkráceného proteinu dosahuje zhruba poloviční hodnoty úplného proteinu. Výsledky předkládané práce naznačují, že tvorba homodimeru je významným faktorem ovlivňujícím aktivitu proteinkinasy.

Vzhledem ke všem dosaženým výsledkům navrhuje, že Ser/Thr proteinkinasa StkP se v podmínkách *in vivo* nachází ve formě dimeru, a že tvorba dimerů ovlivňuje autofosforylační aktivitu proteinu. Souvislost dimerizace a autofosforylace byla prokázána i u jiných proteinkinás, eukaryotních i prokaryotních (Heldin, 1995, Schlessinger, 2002, Hudson a Nodwell, 2004).

Naše závěry jsou navíc podpořeny hypotézami autorů publikací, které se zabývají krystalografickými studiemi Ser/Thr proteinkinás *M. tuberculosis* (Youth *et al.*, 2003, Gay *et al.*, 2006, Greenstein *et al.*, 2006), kde je dimerizace považována za univerzální mechanismus aktivace společný všem Ser/Thr proteinkinásám. Ze zmiňovaných studií vyplývá, že k dimerizaci dochází prostřednictvím konzervované oblasti na povrchu molekuly. Proteinkinasa PknE tvoří dimer strukturně podobný proteinkinase PknB, přestože mezi oběma proteiny existuje pouze malá sekvenční podobnost. Přítomnost konzervované oblasti svědčí o její funkční důležitosti, z čehož autoři citovaných prací usuzují, že proces dimerizace hraje rozhodující roli pro aktivaci proteinkinás. Autoři rovněž navrhují, že dimerizace může být podpořena membránovou lokalizací proteinu, stejně tak oligomerizací extracelulární domény. Proteinkinasa StkP *S. pneumoniae* je strukturním homologem proteinkinasy PknB, a můžeme tedy předpokládat, že její molekuly pravděpodobně dimerizují skrze podobnou oblast.

6.2 Charakterizace fosfoglukosaminmutasy *S. pneumoniae*

Přestože přítomnost Ser/Thr proteinkinás eukaryotního typu byla u bakterií prokázána již v roce 1991 (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991) dosud se podařilo charakterizovat jen velmi málo substrátů těchto enzymů a stanovit význam jejich modifikace (např. Verma a Maurelli, 2003, Rajagopal *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2005, Villarino *et al.*, 2006).

V naší laboratoři jsme pomocí *in vivo* značení [³³P] kyselinou fosforečnou identifikovali dva potenciální substráty proteinkinasy StkP, α -podjednotku RNA polymerasy a fosfoglukosaminmutasu GlmM (Nováková *et al.*, 2005). Tato dizertační práce se soustředila na charakterizaci druhého zmiňovaného proteinu, fosfoglukosaminmutasy GlmM.

Fosfoglukosaminmutasa GlmM je esenciálním enzymem biosyntetické dráhy vedoucí ke tvorbě UDP-*N*-acetylglukosaminu, prekursoru složek buněčné stěny (Mengin-Lecreux a van Heijenoort, 1996). K aktivaci enzymu dochází po jeho fosforylaci ve fosfát vazebné doméně. Nejlépe charakterizovaný protein skupiny fosfoglukosaminmutas, fosfoglukosaminmutasa GlmM *E. coli*, je *in vitro* aktivována autofosforylací serinového zbytku v pozici 102 proteinu (Jolly *et al.*, 2000). Proces iniciální fosforylace proteinu *in vivo* je neznámý a jsou navrženy dvě vysvětlující hypotézy: 1) aktivace se děje autofosforylací nebo fosforylací proteinkinasy a zdrojem fosfátové skupiny je ATP, 2) k fosforylaci dochází v přítomnosti glukosamin-1,6-difosfátu, reakčního intermediátu (Jolly *et al.*, 2000). Je však třeba zmínit, že není zcela zřejmé, zda glukosa-1,6-difosfát a glukosamin-1,6-difosfát existují *in vivo* pouze jako intermediáty reakcí katalyzovaných fosfoglukomutasami či fosfoglukosaminmutasami, nebo zda je jejich tvorba katalyzovaná jinými enzymatickými aktivitami. Existence takových enzymů však dosud nebyla prokázána.

Pro potvrzení fosfoglukosaminmutasy GlmM jako substrátu proteinkinasy StkP jsme provedli kinázové reakce *in vitro* na bezbuněčných lyzátech *S. pneumoniae* Cp1015, Δ *stkP* a Δ *phpP-stkP* v přítomnosti exogenní proteinkinasy StkP. Z tohoto experimentu vyplynulo, že po přidání proteinkinasy StkP k proteinovým extraktům dochází k fosforylaci proteinu o molekulové hmotnosti odpovídající fosfoglukosaminmutase GlmM. Stejný experiment byl použit pro potvrzení substrátu Ser/Thr proteinkinasy Stk1 *S. agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2003).

Následně jsme připravili rekombinantní protein rGlmM s histidinovou kotvou na N- i na C- konci a v kinázových reakcích *in vitro* s purifikovanými proteiny rStkP a rGlmM testovali, zda fosfoglukosaminmutasa je skutečným substrátem proteinkinasy StkP. Nejprve jsme kinázovou reakci provedli za podmínek, které byly popsány pro autofosforylací fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* (Jolly *et al.*, 2000), tedy v přítomnosti hořčnatých iontů. Za těchto podmínek jsme však nedetekovali ani autofosforylační aktivitu fosfoglukosaminmutasy GlmM ani její fosforylací proteinkinasy StkP. Je známo, že fosfoglukosaminmutasa GlmM *E. coli* se autofosforyluje v *in vitro*

podmínkách také v přítomnosti zinečnatých a slabě i v přítomnosti manganatých iontů (Jolly *et al.*, 2000).

Rozhodli jsme se tedy ověřit vliv dalších dvojmocných iontů na fosforylaci fosfoglukosaminmutasy GlmM. Prokázali jsme, že fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* proteinkinasou StkP vyžaduje kromě hořečnatých iontů i přítomnost iontů kobaltnatých, a to v optimální koncentraci 5 mM. S výrazně nižší účinností docházelo k fosforylaci GlmM i v přítomnosti manganatých iontů. Autofosforylace enzymu nebyla pozorována.

Jako jediné místo fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* byl identifikován serin v pozici 102 proteinu (Jolly *et al.*, 2000). Z tohoto důvodu jsme překročili k přípravě rekombinantního proteinu *S. pneumoniae* se záměnou serinu v pozici 101 (odpovídá serinu 102 fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli*) za alanin. Připravený rekombinantní protein jsme použili v kinázové reakci *in vitro* a sledovali vliv mutace na fosforylaci proteinu. Prokázali jsme, že mutace serinu 101 nevede ke zrušení fosforylace proteinu proteinkinasou StkP.

Za těchto okolností jsme považovali za nutné identifikovat fosforylované aminokyselinové zbytky fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*. Pro předběžnou analýzu místa fosforylace jsme rekombinantní fosforylovanou fosfoglukosaminmutasu GlmM i rekombinantní protein se záměnou serinu 101 za alanin S101AGlmM štěpili sekvenčně specifickou proteasou thrombinem, který štěpí protein v pozici 141. Zjistili jsme, že oba proteinové štěpy obou proteinů jsou fosforylované, z čehož vyplývá, že aminokyselinové zbytky modifikované fosforylací jsou přinejmenším dva. Tato skutečnost do této doby nebyla u proteinů patřících do skupiny fosfoglukosaminmutas popsána. Všechny dosud charakterizované fosfoglukosaminmutasy byly modifikované pouze fosforylací jednoho aminokyselinové zbytku. Nedávno bylo zjištěno, že příbuzný enzym, fosfohexomutasa *Sulfolobus solfataricus*, je modifikován fosforylací serinu v pozici 309 proteinu, a že tato modifikace inhibuje katalytickou aktivitu enzymu (Keith Ray *et al.*, 2005).

Pomocí dvourozměrné elektroforézy jsme rozdělili fosforylovanou rekombinantní fosfoglukosaminmutasu GlmM i mutantní protein S101AGlmM. Pro důkladné rozdělení jednotlivých izoforem proteinů jsme provedli izoelektrickou fokusaci v relativně úzkém pH rozmezí 3-5,6. Zjistili jsme, že většina proteinu zůstává nefosforylovaná, což je v souladu s publikovanými výsledky (Jolly *et al.*, 1999), kde autoři popisují fosforylaci pouze 5% z celkového množství proteinu.

Analýzou na hmotnostním spektrometru ESI-ION-TRAP se podařilo prokázat fosforylaci serinového zbytku v pozici 99 fosfoglukosaminmutasy *S. pneumoniae*. Tomuto serinu odpovídá serin 100 fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli*. Jolly a kol. (1999, 2000) popisují důležitost tohoto aminokyselinového zbytku pro katalytickou aktivitu fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli*. Jejich výsledky ukazují, že mutace serinu 100 za alanin vede ke snížené inkorporaci [³²P] ATP, a k 50-ti násobnému snížení katalytické aktivity proteinu. Mutantní protein efektivně komplementoval defekt podmíněně letálního kmene *E. coli* GPM83 pouze v přítomnosti 1mM IPTG. Tyto výsledky znamenají, že enzym s danou mutací vykazuje nízkou, ne však nulovou aktivitu (Jolly *et al.*, 1999).

Pro potřeby komplementačních testů jsme vytvořili expresní konstrukty odvozené od plazmidu pTcr99A. Expresní vektory nesly alely genu odpovídající divokému typu fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* fúzované na N- i C-konci s histidinovou kotvou, mutantní formě se záměnou serinu 101 za alanin a formě se záměnou serinu 99 za alanin fúzované na C-konci s histidinovou kotvou. Histidinová kotva byla následně využita k purifikaci proteinů z bakterií *E. coli* GPM83, jejichž genetické pozadí neobsahovalo endogenní fosfoglukosaminmutasu. Naše výsledky ukázaly, že přítomnost histidinové kotvy na N-konci proteinu divokého typu vedla ke snížené schopnosti komplementace, což bylo pravděpodobně způsobeno změnou konformace N-konce proteinu nesoucího centrum katalytické aktivity. Protein komplementoval mutaci pouze v přítomnosti 10 a 100 μM IPTG. Protein s histidinovou kotvou na C-konci vykazoval schopnost komplementace i bez indukce pomocí IPTG. Oba mutantní proteiny nebyly schopny komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83 bez indukce IPTG, ani v přítomnosti 10, 100 μM či 1mM IPTG. Tyto výsledky tak znamenají, že oba dva serinové zbytky jsou pro aktivitu fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* nezbytné, což je v souladu s již dříve publikovanými pracemi (Jolly *et al.*, 1999, 2000).

Expresní vektory GlmM(pTrc60), S101AGlmM(pTrcHis60) a S99AGlmM (pTrcHis60) nesoucí sekvence odpovídající nemutované a mutovaným formám fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* fúzovaným s histidinovou kotvou na C-konci jsme použili pro indukci a následnou purifikaci proteinů v kmeni *E. coli* GPM83. Tento kmen jsme pro purifikaci proteinů využili z toho důvodu, aby při purifikaci nemohlo dojít ke kontaminaci endogenní nezačtenou fosfoglukosaminmutasou GlmM *E. coli*. Mengin-Lecreulx a van Heijenoort (1996) popisovali kopurifikaci endogenní nezačtené fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* při purifikaci epitopem značené formy enzymu

z buněk *E. coli* JM83. Z tohoto důvodu autoři vytvořili podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83.

Pro analýzu aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* jsme využili spřažený enzymatický systém, ve kterém je glukosamin-1-fosfát, vzniklý z glukosamin-6-fosfátu činností fosfoglukosaminmutasy GlmM, dále přeměněn přes *N*-acetylglukosamin-1-fosfát na UDP-*N*-acetylglukosamin bifunkčním enzymem GlmU (glukosamin-1-fosfát-acetyltransferasa, UDP-*N*-acetylglukosaminpyrofosforylasa *S. pneumoniae*). Abychom ověřili, jakým způsobem dochází k aktivaci fosfoglukosaminmutasy GlmM, použili jsme několik různých uspořádání spřažené reakce. Jako možný zdroj fosfátové skupiny jsme použili glukosa-1,6-difosfát, který nahrazuje komerčně nedostupný reakční intermediát glukosamin-1,6-difosfát. Jolly a kol. (1999) prokázali, že použití glukosa-1,6-fosfátu místo glukosamin-1,6-fosfátu nijak neovlivní průběh reakce ani aktivitu fosfoglukosaminmutasy *E. coli*. Reakce probíhala v přítomnosti a nepřítomnosti kobaltnatých iontů, které se v *in vitro* kinázové reakci ukázaly být nezbytné pro fosforylaci fosfoglukosaminmutasy. V druhém případě jsme jako zdroj fosfátové skupiny použili ATP. Reakce probíhala v přítomnosti proteinkinasy StkP a kobaltnatých iontů a simulovala tak podmínky, za kterých dochází k fosforylaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* v *in vitro* kinázové reakci. Jako negativní kontrola byla použita reakce probíhající v přítomnosti proteinkinasy StkP bez kobaltnatých iontů, neboť z *in vitro* kinázové reakce bylo zřejmé, že k fosforylaci fosfoglukosaminmutasy GlmM za těchto podmínek nedochází. Dále jsme simulovali podmínky autofosforylace v přítomnosti ATP a kobaltnatých iontů, i když z *in vitro* kinázových reakcí bylo zřejmé, že fosfoglukosaminmutasa GlmM *S. pneumoniae* není schopna autofosforylace.

Jak vyplývá z našich výsledků, k aktivaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* dochází jak v přítomnosti glukosa-1,6-difosfátu, tak i po fosforylaci proteinkinasy StkP, v obou případech je však nezbytná přítomnost kobaltnatých iontů. V *in vitro* experimentech jsme tedy potvrdili obě hypotézy navržené pro iniciální fosforylaci fosfoglukosaminmutasy GlmM v podmínkách *in vivo* (Jolly *et al.*, 2000). Otázkou zůstává existence hexosa-difosfátu v buňce v *in vivo* podmínkách. Dá se však předpokládat, že glukosa-1,6-difosfát může být v buňkách přítomen, neboť v genomu *S. pneumoniae* se vyskytuje gen kódující fosfoglukomutasu PGM. Rekombinantní protein PGM *S. pneumoniae* jsme připravili a v *in vitro* kinázové reakci zjistili, že je schopen autofosforylace (data neuvedena). Činností PGM vznikající glukosa-1,6-difosfát by pak mohl sloužit k aktivaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* *in vivo*.

Je třeba si také povšimnout, že k jisté bazální aktivaci fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* dochází za podmínek autofosforylace, kdy došlo ve spřažené reakci k přeměně 3,74% acetylkoenzymu A na UDP-*N*-acetylglukosamin. Nelze tedy vyloučit, že i fosfoglukosaminmutasa GlmM *S. pneumoniae* podobně jako GlmM *E. coli* je aktivována autofosforylací, ovšem intenzita autofosforylace je zřejmě tak nízká, že nebyla identifikována v *in vitro* fosforylačních experimentech. Je však možné, že by i tato bazální autofosforylační aktivita mohla být dostačující pro aktivaci fosfoglukosaminmutasy. Tato hypotéza by mohla vysvětlovat skutečnost, proč delece proteinkinasy StkP není pro kmen *S. pneumoniae* Δ *stkP* letální. Pokud by fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* proteinkinou StkP byla jediným mechanismem její aktivace, pak by delece *stkP* musela vést k neschopnosti syntetizovat UDP-*N*-acetylglukosamin, a tak k depleci prekurzorů peptidoglykanu a následné lyzi buněk.

Na druhou stranu skutečností je, že činností proteinkinasy StkP dochází k aktivaci fosfoglukosaminmutasy GlmM, a to v mnohem větší míře, než v případě autofosforylace. A tak můžeme spekulovat, že modifikace fosfoglukosaminmutasy GlmM prostřednictvím proteinkinasy StkP hraje roli modulační a ovlivňuje například kinetické parametry reakce katalyzované GlmM. Tento způsob regulace by pak mohl být funkční pouze za určitých podmínek.

Nezbytná přítomnost kobaltnatých iontů pro aktivaci žádného z proteinů patřících mezi fosfoglukosaminmutasy nebyla do této chvíle popsána. Předpokládáme však, že se nejedná o specifickou vlastnost fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*, nýbrž o artefakt pravděpodobně související s přítomností histidinové kotvy na C-konci proteinu. Je nesporným faktem, že kobaltnaté a nikelnaté ionty jsou využívány po vazbě k polymeru (např. sepharosa) pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou. Přítomnost histidinové kotvy může vést ke změně konformace proteinu, která může způsobit, že protein je nefunkční. Přítomné kobaltnaté ionty díky své vazbě na histidinovou kotvu mohou obnovit konformaci aktivního proteinu. Tyto domněnky však nejsou podloženy žádnými experimentálními daty.

Fosfoglukosaminmutasa GlmM rovněž katalyzuje zpětnou reakci, tedy přeměnu glukosamin-1-fosfátu na glukosamin-6-fosfát. Vliv fosforylace enzymu na katalýzu této reakce byl taktéž testován. Opět byla využita spřažená enzymatická reakce, ve které za účasti fosfoglukosaminmutasy GlmM, glukosamin-6-fosfátdeaminasy NagB (Altamirano *et al.*, 1993), fosfoglukoisomerasy a glukosa-6-fosfátdehydrogenasy došlo k přeměně substrátu, glukosamin-1-fosfátu, na 6-fosfoglukonát za současného uvolnění NADH. I

v této reakci jsme prokázali rozhodující efekt fosforylace proteinkinasou StkP na aktivaci fosfoglukosaminmutasy GlmM. Protein rovněž vykazoval aktivitu v přítomnosti glukosa-1,6-fosfátu, což bylo v souladu s předchozími zjištěními.

Dále jsme se zabývali studiem vlivu fosforylace na alternativní enzymatické aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM. Fosfoglukosaminmutasa *E. coli* i *P. aeruginosa* katalyzují přeměnu glukosa-1-fosfátu a mannosu-1-fosfátu na 6-fosfátové izomery. U obou těchto enzymů byla zjištěna relativně nízká fosfoglukomutázová aktivita a relativně vysoká fosfomannomutázová aktivita (Jolly *et al.*, 1999, Tavares *et al.*, 2000). Z našich výsledků vyplývá, že fosfoglukosaminmutasa GlmM *S. pneumoniae* rovněž vykazuje zmíněné enzymatické aktivity, avšak na rozdíl od obou výše zmíněných proteinů, jako svůj substrát upřednostňuje glukosa-1-fosfát před mannosu-1-fosfátem. Specifická fosfoglukomutázová aktivita proteinu *S. pneumoniae* je zhruba o řád vyšší než specifická fosfomannomutázová aktivita (0,3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ vs. 0,053 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Specifická fosfoglukomutázová aktivita fosfoglukosaminmutasy *E. coli* je 250-krát nižší než aktivita fosfomannomutázová (0,007 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ vs. 1,75 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Jolly *et al.*, 1999, Tavares *et al.*, 2000) a specifická fosfoglukomutázová aktivita fosfoglukosaminmutasy *P. aeruginosa* je přibližně 10-krát nižší než aktivita fosfomannomutázová (0,06 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ vs. 0,55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, Tavares *et al.*, 2000). U obou gramnegativních bakterií fosfoglukomutázová aktivita představuje jen nepatrný zlomek aktivity fosfoglukosaminmutázové (0,1% pro GlmM *E. coli*, 2,3% pro GlmM *P. aeruginosa*), kdežto fosfomannomutázová aktivita představuje přibližně 20% fosfoglukosaminmutázové aktivity obou enzymů. Pro fosfoglukosaminmutasu GlmM *S. pneumoniae* platí přesný opak. Fosfoglukomutázová aktivita odpovídá 18% a fosfomannomutázová aktivita odpovídá 2,3% aktivity fosfoglukosaminmutázové. Je možné, že substrátová specifita fosfoglukosaminmutasy GlmM je rozdílná u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Tato spekulace je však založena pouze na datech získaných studiem tří výše zmíněných fosfoglukosaminmutas. Údaje o substrátové specifitě dalších charakterizovaných fosfoglukosaminmutas nejsou známé.

Rovněž jsme se zabývali studiem katalytických vlastností mutantních proteinů S101AGlmM a S99AGlmM. Pomocí výše zmiňovaných spřažených enzymatických reakcí jsme prokázali esencialitu serinu v pozici 101. Protein se záměnou serinu 101 za alanin nevykazoval žádnou z testovaných aktivit, ať už zdrojem fosfátové skupiny byl glukosa-1,6-difosfát nebo ATP. Vše tedy nasvědčuje tomu, že tento aminokyselinový zbytek je pro aktivitu enzymu nepostradatelný. Ke stejnému závěru dospěli i Jolly a kol. (1999, 2000) při

studiu fosfoglukosaminmutasy GlmM *E. coli* a dříve také Joshi a Handler (1964), Milstein a kol. (1973), Ray a kol. (1983) a Dai a kol. (1992) studující enzymatické vlastnosti příbuzného enzymu, fosfoglukomutasy PGM *E. coli*, *Micrococcus lysodeikticus* a PGM králíčího svalu. Studium enzymatických vlastností mutantního proteinu se záměnou serinu v pozici 99 za alanin jsme ukázali, že tento serin je pro aktivitu enzymu velmi důležitý, ne však esenciální. Při testech fosfoglukosaminmutázové aktivity ve směru 6P→1P jsme sice nezaznamenali žádnou aktivitu, nemůžeme však vyloučit, že to bylo způsobeno detekčním limitem použité metody. Při studiu aktivity fosfoglukosaminmutázové (1P→6P), fosfoglukomutázové a fosfomannomutázové jsme byli schopni detekovat aktivitu proteinu, pokud byl aktivován fosforylací prostřednictvím proteinkinasy StkP. Specifická aktivita proteinu byla nižší v porovnání s aktivitou nemutovaného proteinu zhruba v rozmezí jednoho řádu. Jolly a kol. (1999) analyzovali pouze fosfoglukosaminmutázovou aktivitu proteinu *E. coli* se záměnou serinu 100 za alanin a dospěli k závěru, že aktivita proteinu klesla na 2% aktivity nemutovaného proteinu. Předpokládáme, že důležitost tohoto aminokyselinového zbytku je dána jeho pozicí v blízkosti serinu 101.

Vzhledem k tomu, že fosfoglukosaminmutasa GlmM je enzym účastnící se tvorby prekurzoru složek buněčné stěny, analyzovali jsme obsah peptidoglykanu a množství jeho prekurzorů u kmene *S. pneumoniae* Cp1015 a delečního kmene Δstk . Předpokládali jsme, že u mutantního kmene bude vlivem absence proteinkinasy StkP metabolická dráha vedoucí k syntéze prekurzorů peptidoglykanu negativně ovlivněna. Výrazné odlišnosti však nebyly pozorovány. Celkové množství peptidoglykanu (měření bylo založené na detekci kyseliny muramové) u obou kmenů bylo téměř totožné (4050 nmolů u kmene Cp1015 vs. 3750 nmolů u kmene $\Delta stkP$). Množství jednotlivých prekurzorů peptidoglykanu se mezi kmény lišila, ne však dramaticky. Prvních prekurzorů peptidoglykanu (UDP-GlcNAc a UDP-MurNAc) bylo 3 až 4-krát více u mutantního kmene než u kmene Cp1015. Množství následujících prekurzorů (UDP-MurNAc-L-Ala – UDP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) bylo naopak zvýšeno u kmene Cp1015. Z experimentů víme, že růstová rychlost kmene Cp1015 je vyšší než růstová rychlost kmene Δstk . Stanovením růstových křivek obou kmenů jsme vypočetli dobu zdvojení kmene Cp1015 na 36 minut a dobu zdvojení mutantního kmene na 54 min. Zdá se tedy, že rozdíly v množství jednotlivých prekurzorů peptidoglykanu u obou kmenů jsou způsobeny rozdílnými potřebami buněk souvisejícími s jejich růstovou rychlostí.

Jediným výrazným rozdílem, který jsme při analýze složení buněčné stěny zjistili, je množství galaktosaminu. Poměr galaktosaminu ku glukosaminu je téměř dvojnásobně

nižší u kmene Cp1015 v porovnání s kmenem Δstk (0,67 vs. 1,15). Galaktosamin je jednou ze složek teichoových kyselin a tyto výsledky tedy napovídají, že u mutantního kmene dochází pravděpodobně ke změně jejich složení nebo ke zvýšení jejich kvantity. Poměr UDP-GalNAc (pocházejícího z teichoových kyselin) ku UDP-MurNAc-pentapeptidu (peptidoglykan) je u mutantního kmene téměř 7-krát vyšší. Tato práce se dále problematikou složení a množství teichoových kyselin nezabývá. Předpokládáme, že změna složení teichoových kyselin není v přímé souvislosti se změnou aktivity fosfoglukosaminmutasy GlmM. Kdyby změna složení teichoových kyselin byla způsobena změnou aktivity fosfoglukosaminmutasy, měli bychom rovněž zaznamenat změnu ve složení peptidoglykanu.

Metodou homologního modelování na základě sekvenční homologie s fosfomannomutasou/fosfoglukomutasou *Pyrococcus horikoshii* (Akutsu *et al.*, 2005) jsme simulovali 3-D strukturu fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*. Všechny vysoce konzervované aminokyselinové zbytky, které hrají důležitou roli v aktivním centru fosfohexomutas (Shackelford *et al.*, 2004), jsme našli také v aktivním centru fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* v těsné blízkosti serinu v pozici 99 a serinu v pozici 101. V současné době probíhají molekulárně dynamické simulace jak fosforylovaného, tak i nefosforylovaného proteinu, které se pokusí predikovat vliv fosforylace na strukturu enzymu. Lze předpokládat, že vnesení nabitě fosfátové skupiny do těsné blízkosti nabitých aminokyselin (Arg, Glu, Asp v aktivním centru) s velkou pravděpodobností ovlivní jejich konformaci a vzájemné interakce či jejich interakce se substrátem díky novým elektrostatickým interakcím.

Závěrem lze tedy říci, že jsme experimentálně potvrdili, že fosfoglukosaminmutasa GlmM *S. pneumoniae* je substrátem proteinkinasy StkP alespoň v *in vitro* podmínkách. Role proteinkinasy StkP v její aktivaci byla jednoznačně prokázána v *in vitro* reakcích. Můžeme však pouze spekulovat, jestli se jedná o mechanismus, který aktivuje fosfoglukosaminmutasu GlmM *S. pneumoniae* *in vivo*. Zdá se, že k jisté bazální aktivaci GlmM může také docházet autofosforylací, která je však v podmínkách v *in vitro* nedetekovatelná. V poslední řadě, je třeba uvažovat i o aktivaci prostřednictvím glukosa-1,6-difosfátu, který se v buňkách vyskytuje.

7 Závěr

7.1 Proteinkinasa StkP

- Připravili jsme kmen *S. pneumoniae* KDTM-his, který ve svém genomu kóduje epitopem značenou kinázovou doménu proteinkinasy StkP ukotvenou do membrány pomocí transmembránové domény.
- Imunologickou detekcí s monoklonální protilátkou proti histidinové kotvě jsme potvrdili lokalizaci proteinu v membránové frakci *S. pneumoniae*.
- V *in vitro* kinázových reakcích jsme prokázali, že se jedná o plně funkční protein s autofosforylační aktivitou.
- Pomocí *in vivo* reportérového systému jsme zjistili, že transmembránová doména a extracelulární doména proteinkinasy StkP tvoří stabilní dimery. Dimerizace proteinkinasy StkP byla následně potvrzena pomocí nativní elektroforézy. Je tedy velmi pravděpodobné, že proteinkinasa StkP se *in vivo* vyskytuje ve formě dimeru a dimerizace je nutným předpokladem její autofosforylační aktivity.
- Na základě těchto výsledků jsme vyslovili hypotézu, že protein kódující kinázovou doménu postrádající transmembránovou doménu není funkční, neboť není schopen dimerizace a podléhá degradaci.

7.2 Fosfoglukosaminmutasa GlmM

- V *in vitro* kinázové reakci na bezbuněčných lyzátech *S. pneumoniae* Cp1015, $\Delta stkP$ a $\Delta phpP-stkP$ v přítomnosti rekombinantní proteinkinasy StkP jsme prokázali fosforylaci proteinu o molekulové hmotnosti odpovídající fosfoglukosaminmutase GlmM.
- Připravili jsme rekombinantní protein GlmM a v *in vitro* kinázové reakci potvrdili fosfoglukosaminmutasu GlmM jako substrát proteinkinasy StkP.

- Ukázali jsme, že fosfoglukosaminmutasa GlmM *S. pneumoniae* je schopna komplementace podmíněně letálního kmene *E. coli* GPM83, jehož chromozomální gen *glmM* je inaktivován a kopie genu je nesena na termosenzitivním plazmidu.
- Prokázali jsme, že fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM proteinkinásou StkP hraje významnou roli v aktivaci proteinu. Po fosforylaci proteinkinásou StkP protein vykazuje nejvyšší specifickou aktivitu, a to jak v reakci při přeměně glukosamin-6-fosfátu na glukosamin-1-fosfát, tak především v reakci opačné.
- Autofosforylaci jako formu aktivace fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae* *in vivo* však nemůžeme vyloučit. Důležitým argumentem podporujícím hypotézu autofosforylace je životaschopnost kmene *S. pneumoniae* s delecí proteinkinasy StkP.
- Ověřili jsme i alternativní enzymatické aktivity fosfoglukosaminmutasy a rovněž zjistili důležitost fosforylace proteinkinásou StkP. Protein *S. pneumoniae* vykazuje relativně vysokou fosfoglukomutázovou aktivitu a poměrně nízkou fosfomannomutázovou aktivitu.
- Připravili jsme rekombinantní fosfoglukosaminmutasu se záměnou serinu v pozici 101 za alanin, S101AGlmM, a prokázali jsme esencialitu tohoto aminokyselinového zbytku. Protein s touto mutací není schopen komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83 a vykazuje nulovou fosfoglukosaminmutázovou, fosfoglukomutázovou i fosfomannomutázovou aktivitu.
- Zjistili jsme, že proteinkinasa StkP i nadále fosforyluje mutantní protein S101AGlmM, a proto jsme se pokusili o identifikaci fosforylovaných aminokyselinových zbytků. Identifikovali jsme 2 fosforylované izoformy mutantního proteinu oproti 3 fosforylovaným izoformám nemutovaného proteinu.
- Hmotnostní spektrometrií jsme určili serin v pozici 99 za jedno z míst fosforylace fosfoglukosaminmutasy GlmM proteinkinásou StkP.

- Připravili jsme rekombinantní fosfoglukosaminmutasu se záměnou serinu v pozici 99 za alanin, S99AGlmM. Tento protein podobně jako protein S101AGlmM nebyl schopen komplementovat podmíněně letální mutaci kmene *E. coli* GPM83. Prokázali jsme, že si tento mutantní protein zachoval zbytkovou aktivitu. Aktivitu proteinu jsme byli schopni zaznamenat pouze po předchozí fosforylaci proteinkinasou StkP.
- Ve spolupráci s laboratoří Dr. Dominique Mengin-Lecreulx jsme analyzovali obsah peptidoglykanu v kmenech *S. pneumoniae* Cp1015 a Δ stkP a určili množství jeho jednotlivých prekurzorů. Množství jednotlivých prekurzorů peptidoglykanu se mezi kmeny lišilo. Obsah celkového peptidoglykanu byl u obou kmenů téměř totožný, rozdíl činil pouze 7%.
- Analýzou složení buněčné stěny kmenů *S. pneumoniae* Cp1015 a Δ stkP jsme zaznamenali zvýšené množství galaktosaminu u mutantního kmene *S. pneumoniae* Δ stkP. Galaktosamin je složka teichoových kyselin a vše tedy nasvědčuje tomu, že u mutantního kmene *S. pneumoniae* Δ stkP dochází k změně složení teichoových kyselin. Tento stav však patrně nemá žádnou souvislost s činností fosfoglukosaminmutasy GlmM.
- Metodou homologního modelování jsme provedli simulaci 3-D struktury fosfoglukosaminmutasy GlmM *S. pneumoniae*.

Seznam použité literatury

- Akutsu, J., Zhang, Z., Tsujimura, M., Sasaki, M., Yohda, M., and Kawarabayasi, Y. (2005) Characterization of a thermostable enzyme with phosphomannomutase/phosphoglucomutase activities from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J. Biochem. (Tokyo)* 138(2), 159-66.
- Alderwick, L.J., Molle, V., Kremer, L., Cozzone, A.J., Dafforn, T.R., Besra, G.S., and Fütterer, K. (2006) Molecular structure of EmbR, a response element of Ser/Thr kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 103(8), 2558-2563.
- Alex, L.A., Borkovich, K.A., and Simon M.I. (1996) Hyphal development in *Neurospora crassa*: Involvement of a two-component histidine kinase. *Proc. Acad. Sci. USA* 93, 3416-3421.
- Altamirano, M.M., Plumbridge, J.A., Barba, H.A., and Calcagno, M.L. (1993) Glucosamine-6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* has a trimer of dimers structure with three intersubunit disulphides. *J. Biochem.* 295, 645-648.
- Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 8, 238-244.
- Av-Gay, Y., Jamil, S., and Drrews, S.J. (1999) Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect. Immun.* 67, 5676-5682.
- Barz, C., Abahji, T.N., Trülzsch, K., and Heesemann, J. (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* 482, 139-143.
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (1996) Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil, Praha.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Thomas, S.M., Rajan, D.P., Hansman, D., and Paton, J.C. (1994) Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 62(3), 1101-1108.
- Berry, A.M., Lock, R.A., and Paton, J.C. (1996) Cloning and characterization of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178(16), 4854-4860.
- Berry, A.M., and Paton, J.C. (1996) Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64(12), 5255-5262.
- Berry, A.M., and Paton, J.C. (2000) Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* 68, 133-140.
- Blue, C. E., and Mitchell, T.J. (2003) Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. *Infect. Immun.* 71, 4405-4413.
- Bogaert, D., Hermans, P.W.M., Adrian, P.V., Rümke, H.C., and de Groot, R. (2004) Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* 22, 2209-2220.

- Boitel, B., Ortiz-Lombardía, M., Durán, R., Pompeo, Cole, S.T., Cerveñansky, C., and Alzari, P.M. (2003) PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 49(6), 1493-1508.
- Bourret, R.B., Davagnino, J., and Simon, M.I. (1993) The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. *J. Bacteriol.* 175, 2097-2101.
- Briles, D.E., Tart, R.C., Swiatlo, E., Dillard, J.P., Smith, P., Benton, K.A., Ralph, B.A., Brooks-Walter, A., Crain, M.J., Hollingshead, S.K., and McDaniel, L.S. (1998) Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with an emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin Microbiol Rev.* 11, 645-57.
- Cámara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994) A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect. Immun.* 62(9), 3688-3695.
- Campbell, E.A., Choi, S.Y., and Masure, H.R. (1998) A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol Microbiol.* 27(5), 929-939.
- Carrera, A.C., Alexandrov, K., and Roberts, T.M. (1993) The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 90(2), 442-446.
- Chaba, R., Raje, M., and Chakraborti, P.K. (2002) Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur. J. Biochem.* 269, 1078-1085.
- Cheng, Y., Li, J.H., Shi, L., Wang, L., Latifi, A., Zhang, C.C. (2006) A pair of iron-responsive genes encoding protein kinases with a Ser/Thr kinase domain and His kinase domain are regulated by NtcA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 188(13), 4822-4829.
- Claverys, J.P., Dintilhac, A., Pestova, E.V., Martin, B., and Morrison, D.A. (1995) Construction and evaluation of new drug-resistance cassettes for gene disruption mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*, using an *ami* test platform. *Gene* 164, 123-128.
- Claverys, J.P., and Håvarstein, L.S. (2002) Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci.* 7, 1798-1814.
- Claverys, J.P., Lefèvre, J.C., and Sicard, A.M. (1980) Transformation of *Streptococcus pneumoniae* with *Streptococcus pneumoniae*-lambda phage hybrid DNA: Induction of deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3534-3538.
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 451-475.
- Coyne, M., Jr., Russell, K.S., Coyle, C.L., and Goldberg, J.B. (1994) The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 176, 3500-3507.
- Cozzone, A.J. (1993) ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51, 7-13.
- Cozzone, A.J. (2005) Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 198-213.

- Crain, M.J., Waltman, W.D., Turner, J.S., Yother, J., Talkington, D.F., McDaniel, L.S., Gray, B.M., and Briles, D.E. (1990) Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 58(10), 3293-3299.
- Curry, J.M., Whalan, R., Hunt, D.M., Gohil, K., Strom, M., Rickman, L., Colston, M.J., Smerdon, S.J., and Buxton, R.S. (2005) An ABC transporter containing a forhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect. Immun.* 73(8), 4471-4477.
- Dagert, M., and Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* 6, 23-28.
- Dai, J.B., Liu, Y., Ray, W.J. Jr., and Konno, M. (1992) The crystal structure of muscle phosphoglucosmutase refined at 2.7-angstrom resolution. *J. Biol. Chem.* 267, 6322-6337.
- Deol, P., Vohra, R., Kumar-Saini, A., Singh, A., Chandra, H., Chopra, P., Das, T.K., Tyagi, A.K., and Singh, Y. (2005) Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: Implications in glucose transport and cell division. *J. Bacteriol.* 187(10) 3415-3420.
- Deutscher, J., and Saier, M.H. (2005) Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria-for long time neglected, now well established. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 125-131.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.P. (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PspA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* 25, 727-739.
- Dobrogosz, W.J. (1968) Effect of amino sugars on catabolite repression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 95, 578-584.
- Dutka-Malen, S., Mazodier, P., and Badet, B. (1988) Molecular cloning and overexpression of the glucosamine synthetase gene from *Escherichia coli*. *Biochimie* 70, 287-290.
- Echenique, J.R., Chapuy-Regaud, S., and Trombe, M.C (2000) Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. *Mol. Microbiol.* 36, 688-696.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., and Trombe, M.C. (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 72, 2434-2437.
- Egger, L.A., Park, H., and Inouye, M. (1997) Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cell.* 2, 167-184.
- Ekici, A.B., Park, O.S., Fuchs, C., and Rautenstrauss, B. (1997) One-tube, two stage PCR-directed *in vitro* mutagenesis using megaprimers. *Technical Tips Online.* (<http://www1.elsevier.com/homepage/sab/tto>): T01122.
- Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S.T., and Alzari, P.M. (2006) The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J. Bacteriol.* 188(22), 7778-7784.
- Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J.D., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C., and Samama, J.P. (2001) The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes and Infection.* 3, 417-424.

- Gaidenko, T.A., Kim, T.J., and Price, C.W. (2002) The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* 184(22), 6109-6114.
- Galyov, E.E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature.* 361, 730-732.
- García, P., Gonzáles, M.P., García, E., García, J.L., and López, R. (1999) The molecular characterization of the first autolyticlysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* 33(1), 128-138.
- García, P., Gonzáles, M.P., García, E., López, R., and García, J.L. (1999) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* 31(4), 1275-1281.
- Garnak, M., and Reeves, H.C. (1979) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203, 1111-1112.
- Gay, L.M., Ng, H.L., and Alber, T. (2006) A conserved dimer and global conformational changes in the structure of apo-PknE Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* 360, 409-420.
- Giammarinaro, P., Sicard, M., and Gasc, A.M. (1999) Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal-transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 145, 1859-1869.
- Glanzmann, P., Gustafson, J., Komatsuzawa, H., Ohta, K., and Berger-Bachi, B. (1999) *glmM* operon and methicillin-resistant *glmM* suppressor mutants in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* 43(2), 240-245.
- Gonzales, L., Phalip, V., and Zhang, C.C. (2001) Characterization of PknC, a Ser/Thr kinase with broad substrate specificity from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Eur. J. Biochem.* 268, 1869-1875.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68(10), 5690-5695.
- Greenstein, A.E., Grundner, C., Echols, N., Gay, L.M., Lombana, T.N., Mirowski, C.A., Pullen, K.E., Sung, P.Y., and Alber, T. (2005) Structure/function studies of Ser/thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 167-181.
- Guenzi, E., Gasc, A.M., Sicard, M.A., and Hakenbeck, R. (1994) A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 12, 505-515.
- Guzman, L.M., Barondess, J.J., and Beckwith, J. (1992) FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 7716-7728.
- Hakenbeck, R. (2000) Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. *Res. Microbiol.* 151, 453-456.
- Hakenbeck, R., Grebe, T., Zähler, D., and Stock, J.B. (1999) β -Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin binding proteins. *Mol. Microbiol.* 33, 673-678.

- Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P., and Kushner, S.R. (1989) New method for generating deletions and gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 4617-4622.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9,576-596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Hanlon, W.A., Inouye, M., and Inouye, S. (1997) Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 23, 459-471.
- Håvarstein, L.S. (1998) Identification of a competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* by genomic analysis. *Trends in Microbiol.* 6, 297-300.
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 11140-11144.
- Heldin, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223.
- Hoelzer, M.A., and Michod, R.E. (1991) DNA repair and the evolution of transformation in *Bacillus subtilis*. III. Sex with damaged DNA. *Genetics.* 128, 215-223.
- Hofmann, M., Boles, E., and Zimmermann, F.K. (1994) Characterization of the essential yeast gene encoding *N*-acetylglucosamine-phosphate mutase. *Eur. J. Biochem.* 221, 741-747.
- Hormaeche, I., Iloro, I., Arrondo, J.L.R., Goñi, F.M., de la Cruz, F., and Alkorta, I. (2004) Role of the transmembrane domain in the stability of TrwB, an integral protein involved in bacterial conjugation. *J. Biol. Chem.* 279(12), 10955-10961.
- Hoskins, J., Alborn, 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., McLeaster, 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. (2001): Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* 183(19), 5709-5717.
- Hudson, M.E., and Nodwell, J.R. (2004) Dimerization of the RamC morphogenetic protein of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 186(5), 1330-1336.
- Hudson, M.E., Zhang, D., and Nodwell, J.R. (2002) Membrane Association and Kinase-Like Motifs of the RamC Protein of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 184(17), 4920-4924.
- Hui, F.M., Zhou, L., and Morrison, D.A. (1995) Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes. *Gene* 153(1), 25-31.
- Humbert, O., Prudhomme, M., Hakenback, R., Dowson, C.G., and Claverys, J.P. (1995) Homeologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*: saturation of the Hex mismatch repair system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(20), 9052-9056.

- Hunter, T., and Cooper, J.A. (1986) The enzymes. Orlando: Academic press. 17,191-246.
- Hussain, H., Branny, P., and Allan, E. (2006) A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 188(4), 1628-1632.
- Ibrahim, Y. M., Kerr, A.R., McCluskey, J., and Mitchell, T.J. (2004) Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 186, 5258-5266.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. Gene. 96, 23-28.
- Inouye, S., Jain, R., Ueki, T., Nariya, H., Xu, C.Y., Hsu, M.Y., Fernandez-Luque, B.A., Muñoz-Dorado, J., Farez-Vidal, E., and Inouye, M. (2000) A large family of eukaryotic-like protein Ser/Thr kinases of *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium. Microb. Comp. Genomics 5, 103-120.
- Janeček, J., Moravec, V., Dobrová, Z., Janda, L., and Weiser, J. (1995) Protein phosphorylation and cell differentiation in *Streptomyces granaticolor*. FEMS Microbiol. Lett. 133, 91-94.
- Jin, H., and Pancholi, V. (2006) Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. J. Mol. Biol. 357, 1351-1372.
- Jolly, L., Ferrari, P., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D. (1999) Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 262, 202-210.
- Jolly, L., Pompeo, F., van Heijenoort, J., Fassy, F., and Mengin-Lecreulx, D. (2000) Autophosphorylation of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182(5), 1280-1285.
- Jolly, L., Wu, S., van Heijenoort, J., de Lencastre, H., Mengin-Lecreulx, D., and Tomasz, A. (1997) The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. J. Bacteriol. 179(17), 5321-5325.
- Joshi, J.G., and Handler, P. (1964) Phosphoglucomutase. I. Purification and properties of phosphoglucomutase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 239, 2741-2751.
- Kamei, A., Yoshihara, S., Yuasa, T., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2003) Biochemical and functional characterization of a eukaryotic-type protein kinase, SpkB, in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. Curr. Microbiol. 46(4), 296-301.
- Kamei, A., Yuasa, T., Orikawa, X., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2001) A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. DNA Res. 9, 71-78.
- Kang, C.M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., and Husson, R.N. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. Genes Development 19, 1692-1704.
- Keith Ray, W., Keith, S.M., DeSantis, A.M., Hunt, J.P., Larson, T.J., Helm, R.F., and Kennelly, P.J. (2005) A phosphohexomutase from the archeon *Sulfolobus solfataricus* is covalently modified by phosphorylation on serine. J. Bacteriol. 187(12), 4270-4275.

- Krivan, H.C., Roberts, D.D., and Ginsburg, V. (1988) Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6157-6161.
- Krupa, A., and Srinivasan, N. (2005) Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC Genomics* 6, 129.
- Lacks, S.A. (1977) Mechanisms of DNA uptake by cells. *Brookhaven Symp Biol.* 29, 147-60.
- Lacks, S.A., Mannarelli, B.M., Springhorn, S.S., and Greenberg, B. (1986) Genetic basis of the complementary *DpnI* and *DpnII* restriction systems of *S. pneumoniae*: An intracellular cassette mechanism. *Cell* 46, 993-1000.
- Lanie, J.A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I., and Winkler, M.E. (2007) Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J. Bacteriol.* 189(1), 38-51.
- LaPorte, D.C., and Koshland, D.E. (1982) A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation tricarboxylic acid cycle. *Nature.* 300, 458-460.
- Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P., McDevitt, D., Morrison, D.A., and Holden, D.W. (2001) A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol. Microbiol.* 40, 555-571.
- Lau, P.C., Sung, C.K., Lee, J.H., Morrison, D.A., and Cvitkovitch, D.G. (2002) PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency. *J. Microbiol. Methods* 49, 193-205.
- Lee, M.S., and Morrison, D.A. (1999) Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol.* 181(16), 5004-5016.
- Leeds, J.A., and Beckwith, J. (1998) Lambda repressor N-terminal DNA-binding domain as an assay for protein transmembrane segment interactions *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 280, 799-810.
- Lévine, A., Vannier, F., Absalon, C., Kuhn, L., Jackson, P., Scrivener, E., Labas, V., Vinh, J., Courtney, P., Garin, J., and Séror, S.J. (2006) Analysis of the dynamic *Bacillus subtilis* Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide variety of cellular processes. *Proteomics* 6(7), 2157-2173.
- Lichtarge, O., Bourne, H.R., and Cohen, F.E. (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J. Mol. Biol.* 257, 342-358.
- Liu, Y., Ray, W., and Baranidharan, S. (1997) Structure of rabbit muscle phosphoglucomutase refined at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallogr.* 53, 392-405.
- Lorenz, M.G., and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
- Lu, J.J., Perng, C.L., Shyu, R.Y., Chen, C.H., Lou, Q., Chong, S.K., and Lee, C.H. (1999) Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J. Clin. Microbiol.* 37, 772-774.
- Luo, P., and Morrison, D.A. (2003) Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185(1), 349-358.

- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., and Séror, S.J. (2002) Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol. Microbiol.* 46(2), 571-586.
- Madec, E., Stensballe, A., Kjellström, S., Cladière, L., Obuchowski, M., Jensen, O.N., and Séror, S.J. (2003) Mass spectrometry and site-directed mutagenesis identify several autophosphorylated residues required for the activity of PrkC, a Ser/Thr kinase from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 330, 459-472.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., and Nakata, A. (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *E. coli* involves phosphotransfer between PhoR a PhoB proteins. *J. Mol. Biol.* 210, 551-559.
- Mascher, T., Zahner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A.B., and Hakenbeck, R. (2003) The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* 185,60-70.
- Massagué, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- Matsumoto, A., Hong, S.K. Ishizuka, H., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) Phosphorylation of the AsfR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-like protein kinase. *Gene.* 146, 47-56.
- McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A., and Mitchell, T.J. (2004) A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 51, 1661-1675.
- Méjean, V., Claverys, J.P., Vasseghi, H., and Sicard, A.M. (1981) Rapid cloning of specific DNA fragments of *Streptococcus pneumoniae* by vector integration into the chromosome followed by endonucleolytic excision. *Gene* 15, 289-293.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1993) Identification of the *glmU* gene encoding *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(19), 6150-6157.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1994) Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-*N*-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* 176, 5788-5795.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1996) Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271(1), 32-39.
- Milstein, C.P., Clarke, J.B., and Britton, H.G. (1973) The reactive serine residue in phosphoglucomutase of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem. J.* 135, 551-553.
- Mio, T., Yabe, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1998) The eukaryotic UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 14392-14397.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* *GNA1*, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-*N*-acetylglucosamine synthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 424-429.

- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (2000) Functional cloning and mutational analysis of the human cDNA for phosphoacetylglucosamine mutase: Identification of the amino acid residues essential for the catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 369-376.
- Mohedano, M. L., Overweg, K., de la Fuente, A., Reuter, M., Altabe, S., Mulholland, F., de Mendoza, D., Lopez, P., and Wells, J.M. (2005) Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition. *J. Bacteriol.* 187, 2357-2367.
- Molle, V., Kremer, L., Girard-Blanc, C., Besra, G.S., Cozzone, A.J., and Prost, J.F. (2003) An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 42, 15300-15309.
- Morgan, P.J., Hyman, S.C., Byron, O., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., and Rowe, A.J. (1994) Modelling the bacterial protein toxin, pneumolysin, in its monomeric and oligomeric form. *J. Biol. Chem.* 269, 25315-25320.
- Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C., and Paton, J.C. (2003) Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)₄ repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185(10), 3009-3019.
- Morrison, D.A., Lacks, S.A., Guild, W.R., and Hageman, J.M. (1983) Isolation and characterization of three new classes of transformation-deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. *J. Bacteriol.* 156(1), 281-290.
- Morrison, D.A., Trombe, M.C., Hayden, M.K., Waszak, G.A., and Chen, J.D. (1984) Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM β 1. *J. Bacteriol.* 159(3), 870-876.
- Morrison, T.B., and Parkinson, J.S. (1997) A fragment liberated from the *Escherichia coli* CheA kinase that blocks stimulatory, but not inhibitory, chemoreceptor signaling. *J. Bacteriol.* 179, 5543-5550.
- Motley, S.T., and Lory, S. (1999) Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 67(10), 5386-5394.
- Mukhopadhyay, S., Kapatral, V., Xu, W., and Chakrabarty, A.M. (1999) Characterization of a Hank's type serine/threonine kinase and serine/threonine phosphoprotein phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181(21), 6615-6622.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell.* 262, 995-1006.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., and Yamada Okabe, H. (1998) Isolation of caSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologous, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology.* 144, 425-432.
- Nariya, H., and Inouye, S. (2002) Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 46(5), 1353-1366.

- Nariya, H., and Inouye, S. (2003) An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Mol. Microbiol.* 49(2), 517-528.
- Nariya, H., and Inouye, S. (2005) Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 58(2), 367-379.
- Ng, W.L., Tsui, H.T., and Winkler, M.E. (2005) Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 187(21), 7444-7459.
- Nguyen, L., Walburger, A., Houben, E., Koul, A., Muller, S., Morbitzer, M., Klebl, B., Ferrari, G., and Pieters, J. (2005) Role of protein kinase G in growth and glutamine metabolism of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 187(16), 5852-5856.
- Novak, R., Henriques, B., Charpentier, E., Normark, S., and Tuomanen, E. (1999) Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature.* 399, 590-593.
- Nováková, L. (2004) Úloha Ser/Thr proteinkinás v diferenciaci *Streptomyces granaticolor* a StkP a PhpP, unikátní signalizační proteiny *Streptococcus pneumoniae*. Dizertační práce PřF UK.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.C., and Branny, P. (2005) Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrate. *FEBS J.* 272, 1243-1254.
- O'Connor, T.J., Kanellis, P., and Nodwell, J.R. (2002) The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR. *Mol. Microbiol.* 45(1), 45-57.
- Panichkin, V.B., Arakawa-Kobayashi, S., Kanaseki, T., Suzuki, I., Los, D.A., Shestakov, S.V., and Murata, N. (2006) Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is a regulator of expression of three putative *pilA* operons, formation of thick pili, and cell motility. *J. Bacteriol.* 188(21), 7696-7699.
- Pallová, P. (2003) Buněčná lokalizace serin/threoninové proteinkinasy *Streptococcus pneumoniae* a analýza funkce senzorové domény. Diplomová práce PřF UK.
- Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., and Branny, P. (2007) A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355(2), 526-530.
- Parkinson, J.S., and Kofoed, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26, 71-112.
- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., and Mitchell, T.J. (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*-the role of the pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 89-115.
- Petricikova, K., and Petricek, M. (2003) Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology* 149, 1609-1621.
- Pestova, E.V., Håvarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol.* 21(4), 853-862.

- Phalip, V., Li, J.H., and Zhang, C.C. (2001) HstK, a cyanobacterial protein with both a serine/threonine kinase domain and a histidine kinase domain: implication for the mechanism of signal transduction. *J. Biochem.* 360, 639-644.
- Pompeo, F., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreulx, D. (1998) Probing the role of cysteine residues in glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity of the bifunctional GlmU protein from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis and characterization of the mutant enzymes. *J. Bacteriol.* 180(18), 4799-4803.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell.* 86, 865-875.
- Rajagopal, L., Clancy, A., and Rubens, C.E. (2003) A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphorylase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J. Biol. Chem.* 278(16), 14429-14441.
- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., and Rubens, C.E. (2005) Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* 56(5), 1329-1346.
- Ray, W.J. Jr., Hermodson, M.A., Puvathingal, J.M., and Mahoney, W.C. (1983) The complete amino acid sequence of rabbit muscle phosphoglucomutase. *J. Biol. Chem.* 258, 9166-9174.
- Rayner, C.F.J., Jackson, A.D., and Rutman, A. (1995) Integration of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.* 63, 422-427.
- Redfield, R.J. (1993) Genes for breakfast: the have-your-cake-and-eat-it-too of bacterial transformation. *J. Hered.* 84, 400-404.
- Regni, C., Naught, L.E., Tipton, P.A., and Beamer, L.J. (2004) Structural basis of diverse substrate recognition by the enzyme PMM/PGM from *P. aeruginosa*. *Structure* 12, 55-63.
- Regni, C., Tipton, P.A., and Beamer, L.J. (2002) Crystal structure of PMM/PGM: An enzyme in the biosynthetic pathway of *P. aeruginosa* virulence factors. *Structure* 10, 269-279.
- de Reuse, H., Labigne, A., and Mengin-Lecreulx, D. (1997) The *Helicobacter pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* 179(11), 3488-3493.
- Rocchetta, H.L., Burrows, L.L., and Lam, J.S. (1999) Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 523-553.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., and Masure, H.R. (1997) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 25, 819-829.
- Rubins, J., and Janoff, E. (1998) Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. Lab. Clin. Med.* 131(1), 21-27.
- Saier, M.H.Jr., Wu, L.F., and Reizer, J. (1990) Regulation of bacterial physiological processes by three types of protein phosphorylating systems. *Trends in Bio. Sci.* 15, 391-395.
- de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T.J., Keck, W., Amrein, K.E., and Lange, R. (2000) Microarray-based identification of a novel

- Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. J. Bacteriol. 182, 4696-4703.
- Sawai, R., Suzuki, A., Takano, Y., Lee, P.C., Horinouchi, S. (2004) Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Gene 334, 53-61.
- Schagger, H. (1994) Native gel electrophoresis. in: A practical guide to membrane protein purification (von Jagow, G. and Schagger, H., Eds), pp. 81-104, Academic Press Inc., San Diego.
- Schaller, G.E., and Bleecker, A.B. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. Science. 270, 1809-1811.
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 110, 669-672.
- Sebert, M. E., Palmer, L.M., Rosenberg, M., and Weiser, J.N. (2002) Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. Infect. Immun. 70, 4059-4067.
- Shackelford, G.S., Regni, C.A., and Beamer, L.J. (2004) Evolutionary trace analysis of the α -D-phosphohexomutase superfamily. Protein Science. 13, 2130-2138.
- Shankar, S., Ye, R.W., Schlichtman, D., and Chakrabarty, A.M. (1995) Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and regulation of gene expression. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 70, 221-255.
- Sharma, K., Gupta, M., Pathak, M., Gupta, N., Koul, A., Sarangi, S., Baweja, R., and Singh, Y. (2006) Transcriptional control of the mycobacterial *embCAB* operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, *in vivo*. J. Bacteriol. 188(8), 2936-2944.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchononic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.
- Standish, A. J., Stroehner, U.H., and Paton, C.J. (2005) The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 7701-7706.
- Stein, E.A., Cho, K., Higgs, P.I., and Zusman, D.R. (2006) Two Ser/Thr protein kinases essential for efficient aggregation and spore morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol. 60(6), 1414-1431.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchel, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., and Davis, R.W. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science 282, 754-759.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. Dec. 450-490.
- Swiatlo, E., Champlin, F.R., Holman, S.C., Wilson, W.W., and Watt, J.M. (2002) Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 70(1), 412-415.

- Tavares, I.M., Jolly, L., Pompeo, F., Leitão, J.H., Fialho, A.M., Sá-Correia, I. and Mengin-Lecreulx, D. (2000) Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* glmM gene, encoding phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* 182(16), 4453-4457.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., and Fraser, C.M. (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293, 498-506.
- Tu, A. T., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., and Szalai, A.J. (1999) Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67, 4720-4724.
- Tuomanen, E. (1999) Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr Opin Microbiol.* 2(1), 35-39.
- Udo, H., Inouye, M., and Inouye, S. (1996) Effects of overexpression of Pkn2, a transmembrane protein serine/threonine kinase, on development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 178, 6647-6649.
- Ulijasz, A. T., Andes, D.R., Glasner, J.D., and Weisblum, B. (2004) Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J. Bacteriol.* 186, 8123-8136.
- Urabe, H., and Ogawara, H. (1995) Cloning, sequencing and expression of serine/threonine kinase-encoding genes from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene.* 153, 99-104.
- Ye, R.W., Zielinski, N.A., and Chakrabarty, A.M. (1994) Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 176, 4851-4857.
- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a β -lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* 27(9), 438-440.
- Youth, T.A, Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., and Albert, T. (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat. Struct. Biol.* 10, 168-174.
- Verma, A., and Maurelli, A.T. (2003) Identification of two eukaryotic-like serine/threonine kinases encoded by *Chlamidia trachomatis* serovar L2 and characterization of interacting partners of Pkn1. *Infect. Immun.* 71(10), 5772-5784.
- Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S.T., Jimmy-Arndt, U., Jungblut, P.R., Cerveñansky, C., and Alzari, P.M. (2005) Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J. Mol. Biol.* 350, 953-963.
- Waltman, W.D.II, McDaniel, L.S., Gray, B.M., and Briles, D.E. (1990) Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 8, 61-69.
- Wang, J., Li, C., Yang, H., Mushegian, A., and Jin, S. (1998) A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the

- host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. *J. Bacteriol.* 180, 6764-6768.
- Wang, J.Y.J., and Koshland, D.E.Jr. (1978) Evidence protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biochem.* 253,7605-7608.
- Wang, L., Sun, Y.P., Chen, W.L., Li, J.H., and Zhang, C.C. (2002) Genomic analysis of protein kinases, protein phosphatases and two-component regulatory systems of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 155-165.
- White, R.J. (1968) Control of amino sugar metabolism in *Escherichia coli* and isolation of mutants unable to degradate amino sugar. *J. Biochem.* 106, 847-858.
- Whitehouse, D.B., Tomkins, J., Lovegrove, J.U., Hopkinson, D.A., and McMillan, W.O. (1998) A phylogenetic approach to the identifikation of phosphoglucosyltransferase genes. *Mol. Biol. Evol.* 15, 456-462.
- Wu, S., de Lancastre, H., Sali, A., and Tomasz, A. (1996) A phosphoglucosyltransferase-like gene essential for the optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and DNA sequencing. *Microb. Drug Resist.* 2, 277-286.
- Zähner, D., Kaminski, K., van den Linden, M., Mascher, T., Merai, M., and Hakenbeck, R. (2002) The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(3), 211-216.
- Zhang, C.C. (1993) A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinase from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11840-11844.
- Zhang, C.C., Friry, A., and Peng, L. (1998) Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein phosphatase 1/2A/2B homolog and a protein kinase homolo in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 180, 2616-2622.
- Zhang, C.C., and Libs, L. (1998) Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Gen. Genet.* 258(1-2), 26-33.
- Zhang, J.R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M., and Tuomanen, E. (2000) The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102(6), 827-837.
- Zhang, W., Inouye, M., and Inouye, S. (1996) Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol. Microbiol.* 20(2), 435-447.
- Zhao, X., and Lam, J.S. (2002) WaaP of *Pseudomonas aeruginosa* is a novel eukaryotic typeprotein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 277(7), 4722-4730.
- Zielinski, N.A., Chakrabarty, A.M., and Berry, A. (1991) Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* encoding phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* 266(15), 9754-9763.