

Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae je významný lidský patogen. Tato bakterie kóduje ve svém genomu jediný gen pro serin/threoninovou proteinkinasu eukaryotního typu nazvanou StkP. StkP reguluje mnoho fyziologických procesů, jako např. patogenezí, kompetenci pro genetickou transformaci, rezistenci k různým druhům stresů a rezistenci k antibiotikům. Rovněž ovlivňuje transkripci celé řady genů účastnících se biosyntézy buněčné stěny, pyrimidinového metabolismu, oprav DNA a příjmu železa. Současné studie ukázaly, že StkP je lokalizována v buněčné přepážce a významným způsobem reguluje buněčné dělení a morfologii. Mezi její substráty patří mimo jiné proteiny buněčného dělení DivIVA, FtsZ a FtsA.

Porovnáním fosfoproteomových map divokého kmene a kmene Δ *stkP* *S. pneumoniae* bylo prokázáno, že StkP *in vivo* fosforyluje několik substrátů, mezi něž patří i membránový protein Spr0334. Hmotnostní spektrometrií byla určena místa fosforylace proteinu Spr0334, a to threonin 67 a threonin 78. Dále bylo zjištěno, že je protein Spr0334 lokalizován v buněčné přepážce, což vedlo k hypotéze, že by mohl být dalším proteinem buněčného dělení u *S. pneumoniae*.

Hlavním záměrem této diplomové práce bylo přiblížit funkci neznámého proteinu Spr0334 u *S. pneumoniae* a zjistit vliv fosforylace na jeho aktivitu. Deleci genu *spr0334* jsme vytvořili mutantní kmen *S. pneumoniae*, který jsme dále charakterizovali. Zjistili jsme, že delece genu pro protein Spr0334 má za následek tvorbu menších kulatých buněk s častým výskytem minibuněk, které často neobsahují žádnou DNA.

Dále jsme připravili konstrukty pro komplementaci delece *spr0334* u *S. pneumoniae*. Vytvořili jsme komplementační kmeny *S. pneumoniae* nesoucí v *bgaA* lokusu divokou a mutovanou alelu genu *spr0334* pod inducibilním zinkovým promotorem. Mutovaná forma genu pro protein Spr0334 měla zaměněné aminokyseliny T67 a T78 za neutrální aminokyselinu alanin, která nemůže být fosforylována. Studovali jsme expresi a fosforylaci nativního a fosfoablativního proteinu Spr0334 u *S. pneumoniae* a potvrdili jsme, že T67 a T78 jsou místa fosforylace proteinu Spr0334 *in vivo*. Studie fenotypu těchto kmenů ukázala, že defosforylovaný protein Spr0334 je schopný plně zastávat svou funkci.

Nakonec jsme vytvořili kmeny *S. pneumoniae* nesoucí v *bgaA* lokusu gen pro protein Spr0334 fúzovaný na N-konci s GFP. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme

pozorovali lokalizaci tohoto proteinu na pozadí divokého kmene, v kmeni $\Delta spr0334$ a v kmeni s deletovaným genem pro StkP, ve kterém nejsou substráty StkP fosforylovány. Zjistili jsme, že protein GFP-Spr0334 je lokalizován převážně v buněčné přepážce a tato lokalizace se významně nemění v závislosti na jeho stavu fosforylace.

Z našich poznatků vyplývá, že protein Spr0334 je proteinem buněčného dělení, který ovlivňuje morfologii buněk a účastní se výběru budoucího místa dělení či segregace chromosomů u *S. pneumoniae* dosud neznámým mechanismem.