

Každá bakteriální buňka se neustále vyrovnává s tlakem okolního prostředí. Životaschopnost jednotlivce i mikrobiální populace jako celku úzce souvisí se schopností rychle a účelně reagovat na změny vnějších podmínek. Z těchto důvodů si bakterie vyvinuly rozličnou škálu mechanismů, které jim umožňují zaznamenávat informace o okolí, zprostředkovat adekvátní odpověď a vzájemně se dorozumívat. Jednou z možností, jak realizovat fosforylaci proteinů, je prostřednictvím ATP dependentních Ser/ Thr proteinkináz eukaryotního typu.

Vhodným modelovým organizmem pro studium funkce Ser/ Thr proteinkináz eukaryotického typu se stal *Streptococcus pneumoniae*. Tento významný lidský patogen kóduje jedinou eukaryotickou proteinkinázu StkP. StkP reguluje virulenci, kompetenci, rezistenci ke stresům různého původu, genovou expresi a hraje také důležitou roli v regulaci buněčného dělení. Pomocí fosfoproteomické analýzy bylo identifikováno několik substrátů pneumokokové proteinkinázy StkP. Jedním z nich byl protein DivIVA účastnící se buněčného dělení (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). DivIVA u *Streptococcus pneumoniae* je lokalizován ve středu buňky a na buněčných pólech. Zdá se, že je primárně důležitý pro správné a zrání pólů buňky (FADDA *et al.*, 2007).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, které aminokyselinové zbytky DivIVA podléhají fosforylaci proteinkinázou StkP, a jaký vliv má tato modifikace na funkci DivIVA. Gen *divIVA* byl klonován, exprimován v *E. coli* a purifikován pomocí afinitní chromatografie. Fosforylace proteinu DivIVA byla testována kinázovou reakcí. Potvrdili jsme, že DivIVA je substrátem proteinkinázy StkP *in vitro*. Dále jsme připravili sadu tzv. fosfoablativních forem DivIVA, které měly zaměněny předpokládané fosforylované aminokyseliny, Thr15 a Thr201, za neutrální aminokyselinu alanin. Alanin nemůže být akceptorem fosfátové skupiny, a nemůže být tedy Ser/ Thr proteinkinázou fosforylován. Pomocí těchto mutant jsme dokázali, že je protein DivIVA fosforylován proteinkinázou StkP na Thr201 a s nižší účinností i na Thr15.

Dále jsme sestrojili konstrukt pro komplementaci delece *divIVA* ve *S. pneumoniae*. Připravili jsme komplementační kmeny, které exprimovali fosfoablativní a fosfomimetické mutantní formy *divIVA* pod inducibilním zinkovým promotorem. Fosfomimetické formy DivIVA nesou mutaci Thr15/Glu a/nebo Thr201/Glu. Přítomnost záporně nabitě kyseliny glutamové napodobuje fosforylovaný stav proteinu. Studovali jsme expresi s fosforylací mutantních forem DivIVA ve *S. pneumoniae*. Potvrdili jsme, že jsou aminokyselinové zbytky Thr15 a Thr201 fosforylovány proteinkinázou StkP i *in vivo*. Pomocí studia fenotypu jsme

zjistili, že fosforylace není esenciální pro funkci proteinu DivIVA. Z našich výsledků ovšem také vyplývá, že hyperfosforylace inhibuje aktivitu DivIVA.