

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, Δ stkP a Δ 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 proteinkinasou StkP hraje významnou roli v aktivaci proteinu. Po fosforylaci proteinkinasou 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 proteinkinasou 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 proteinkinasou 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*.