

Téma diplomové práce: **Úloha RNA chaperonu KhpB v buněčném dělení u *Streptococcus pneumoniae***

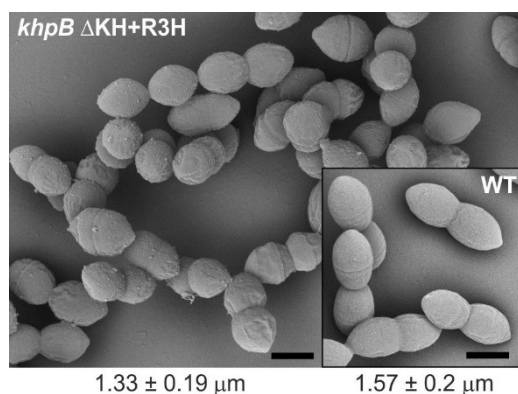
Jedním ze základních procesů, které umožňují existenci života je buněčná signalizace. Jedná se o sofistikovaný mechanismus, který umožňuje přenos informací z vnějšího prostředí a koordinaci buněčných procesů u živých systémů.

Dlouhodobým cílem naší Laboratoře buněčné signalizace je mapování signalizační sítě serin/threoninové (Ser/Thr) proteinkinázy eukaryotického typu a příslušné Ser/Thr fosfatázy a charakterizace jejich substrátů u bakterií. Naším modelovým organismem je grampozitivní patogenní bakterie *Streptococcus pneumoniae*, která kóduje ve svém genomu pouze jednu kopii Ser/Thr proteinkinázy s názvem StkP a k ní příslušné proteinfosfatázy PhpP. Tato signalizační dráha reguluje řadu buněčných procesů, včetně buněčného dělení.

Nedávno jsme identifikovali protein KhpB jako nový substrát proteinkinázy StkP. Jedná se o protein buněčného dělení, který obsahuje mimo jiné dvě RNA vazebné domény KH a R3H. Tyto domény se vyznačují krátkým, 4-5 nukleotidů dlouhým, konzervativním motivem, který slouží k interakci s různými molekulami RNA a pro zajištění dostatečné specifity mezi proteinem a RNA molekulami je potřeba kooperace většího množství KH a R3H domén. Je známo, že KhpB tvoří heteromerní komplex s dalším proteinem KhpA kódujícím KH doménu, čímž se pravděpodobně zvyšuje specifita vůči vazebným RNA molekulám. Tento komplex KhpA/B se váže mimo jiné na 5' netranslatovatelnou oblast mRNA genu *ftsA* a tím působí jako negativní regulátor exprese proteinu FtsA, což vede k defektu v buněčném dělení (viz Obr.).

Protože komplex KhpA/B interaguje s celou řadou molekul RNA (mRNA, tRNA, sRNA), byla vyslovena hypotéza, že KhpA/B může fungovat jako RNA chaperon u grampozitivních bakterií, podobně jako dobře známý RNA chaperon Hfq u gramnegativních bakterií. Hfq podporuje interakci mezi regulační sRNA a regulovanou mRNA a může vázat RNasu E, což vede k degradaci mRNA ribonukleasou E. Podle našich předběžných výsledků jsme zjistili, že KhpB interaguje s dalším proteinem obsahujícím KH doménu RNasou Y. Domíváme se, že RNase Y může u pneumokoka rovněž přispět k rozpadu molekul RNA po vazbě na KhpA/B komplex.

Úkolem této navrhované diplomové práce bude objasnit vliv fosforylace proteinu KhpB na tvorbu komplexu KhpA/B a na interakce s RNA molekulami. Dále se pokusíme objasnit funkci komplexu KhpA-KhpB-RNasa Y. Autor se během studia seznámí s řadou moderních molekulárně-biologických metod (fluorescenční mikroskopie, 3D SIM, manipulace s DNA a RNA, qRT-PCR, NGS sekvenování, purifikace proteinů, mutagenese, co-IP, bakteriální dvouhybridní systém, gel mobility shift assay atd.).



Delece RNA vazebných domén (KH a R3H) proteinu KhpB způsobuje zmenšení buněk v porovnání s divokým kmene WT u *Streptococcus pneumoniae*.

Snímky ze Skenovací elektronové mikroskopie znázorňují defekt v buněčném dělení způsobený narušením vazby KhpB s molekulami RNA.