

## **„Proteaza ClpAP jako czynnik kontrolujący aktywację systemu toksyna-antytoksyna *parDE* plazmidu RK2”**

**mgr inż. Andrzej Dubiel**

Systemy toksyna-antytoksyna (TA) stanowią istotny element regulacyjny w komórkach bakteryjnych. Mogą one wpływać na: odpowiedź na stres środowiskowy, infekcję fagową, utrzymywanie patogennych bakterii w organizmie eukariotycznym i utrzymanie plazmidu w komórkach gospodarza. W wielu przypadkach systemy TA zapewniają przeżycie populacji bakteryjnej. Plazmid RK2 o szerokim spektrum gospodarza koduje operon *parDE*, w którego skład wchodzi dwa geny: *parD* kodujący antytoksynę oraz *parE* kodujący toksynę. W komórkach posiadających plazmid oba komponenty białkowe systemu TA są produkowane konstytutywnie. Białka te tworzą kompleks, co hamuje toksyczny efekt wywołany przez białko ParE względem gyrazy bakteryjnej GyrAB. W komórkach, które utraciły plazmid, niestabilna antytoksyna ulega degradacji, co umożliwia toksynie oddziaływanie z celem komórkowym. Powoduje to eliminację komórek bakteryjnych, które utraciły plazmid. Efekt taki nazywany jest posegregacyjną śmiercią (ang. post-segregational killing - PSK). Do tej pory nie wiadomo było jaki czynnik komórkowy jest odpowiedzialny za degradację komponentów białkowych systemu *parDE* i aktywację PSK.

Głównym celem mojego projektu było zidentyfikowanie proteazy odpowiedzialnej za degradację białkowych komponentów systemu *parDE*. W pierwszym etapie przeprowadziłem testy *in vivo* z wykorzystaniem szczepów *E. coli* C600 oraz inaktywacjami genów proteaz. Przeprowadzane testy wykazały, że to antytoksyna ParD jest niestabilnym elementem systemu *parDE*. Natomiast stabilność antytoksyny ParD wzrasta w szczepie *E. coli clpA(-)*. Aby potwierdzić otrzymane wyniki *in vivo* oczyściłem plazmidowe białka ParE, ParD oraz białka *Escherichia coli* GyrAB (gyraza), Lon, ClpA, ClpP i ClpX. Następnie wykonałem doświadczenia *in vitro* z wykorzystaniem oczyszczonych białek. Otrzymane wyniki potwierdziły, że to proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za degradację białka ParD. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że dwuniciowy DNA (dsDNA) stymuluje proteolizę ParD, natomiast białko ParE zwiększa stabilność białka ParD. Oddziaływania pomiędzy białkami ParE, ParD i ClpA przedstawiłem wykorzystując techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) i testu immunoenzymatycznego (ELISA). Potwierdziły one oddziaływanie ParD-ParE oraz pokazały oddziaływanie ParD-ClpA i możliwość formowania kompleksu potrójnego pomiędzy białkami ParD, ParE i ClpA. Samo białko ParE nie wiązało

się do białka ClpA. Sprawdziłem również czy operon *parDE* może być wykorzystany do zwiększenia stabilności innych plazmidów. W tym celu skonstruowałem wektor pABD6-1 o szerokim spektrum gospodarzy, z wklonowanym operonem *parDE*, jako jedynym kodowanym systemem TA. Uzyskane wyniki pokazały, że plazmid pABD6-1 jest wydajniej utrzymywany w komórkach gospodarza, niż plazmid nie posiadający systemu *parDE*. Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy proteaza ClpAP jest uniwersalnym aktywatorem systemu PSK plazmidu RK2. Wykonałem proteolizy antytoksyny ParD proteazą ClpAP z innych gatunków bakterii, które mogą utrzymywać plazmid RK2. W tym celu oczyściłem białka ClpA i ClpP z bakterii *Caulobacter crescentus* i *Pseudomonas putida*. Wyniki proteolizy *in vitro* świadczą o tym, że proteazy ClpAP z *C. crescentus* i *P. putida* są w stanie wydajnie degradować antytoksynę ParD. Stabilność plazmidu pABD6-1 zawierającego operon *parDE* w bakteriach *C. crescentus* i *P. putida* jest dużo większa niż plazmidu pBBR1MSC-5 bez operonu *parDE*.