

# Streszczenie

*Bacillus subtilis* jest uznany za organizm modelowy wykorzystywany do badań nad przemianami, jakimi podlega komórka bakteryjna w trakcie cyklu rozwojowego. W warunkach niekorzystnych do wzrostu wegetatywnego ta Gram-dodatnia bakteria uruchamia alternatywną ścieżkę rozwojową. W procesie sporulacji *B. subtilis* wytwarza przetrwalnik (endospore), który uwolniony do środowiska, jest gwarancją przetrwania materiału genetycznego bakterii. Dzięki złożonej budowie, endospory są niezwykle odporne na szereg szkodliwych czynników środowiskowych. W formie uspionej mogą przetrwać latami. Pozornie nieaktywne przetrwalniki stale monitorują stan środowiska w oczekiwaniu na poprawę jego warunków. W procesie kiełkowania uspione przetrwalniki przekształcają się do formy wegetatywnej, która będzie kontynuować wzrost wegetatywny. Dotychczas najlepiej poznaną ścieżką inicjacji kiełkowania przetrwalników jest inicjacja pokarmowo-zależna z udziałem receptorów kiełkowania, z których receptor GerA uznawany jest za samodzielnie rozpoczynający kiełkowanie. Receptor GerA reaguje na obecność w środowisku aminokwasów L-alaniny lub L-waliny. Na podstawie analizy sekwencji kodującej ten receptor wiadomo, że składa się on z 3 białek: A, B i C. Ze względu na złożoną budowę i ich błonowy charakter, dane strukturalne i funkcjonalne na temat receptorów kiełkowania wciąż są bardzo ograniczone.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wybranych aspektów funkcjonowania receptora GerA i zaproponowanie możliwego sposobu działania tego kompleksu w procesie inicjacji kiełkowania.

Najpierw poczyniono próby utworzenia szczepu *B. subtilis*, w którym możliwe byłoby wykrywanie i obserwowanie poszczególnych białek receptora. Pomimo skonstruowania szczepu, w którym do każdego z genów w operonie *gerA* dołączono odpowiedni epitop antygenowy, przetrwalniki uzyskane z tego szczepu nie były zdolne do kiełkowania. Następnie, badania skupiły się na analizie konserwowanego motywu VPPF w białku A. W tym celu dokonano substytucji proliny w pozycji 324 (P324S, P324G, P324A, P324F). Uzyskane szczepy analizowano pod kątem właściwości, jakie wykazywały ich przetrwalniki w procesie kiełkowania, zarówno w obecności aktywatorów (L-alanina, L-walina, AGFK, dodecylamina), jak i inhibitora – D-alaniny. Analizy mikroskopowe i testy kiełkowania wykazały, że substytucja pozycji 324 białka A powoduje powstanie heterologicznej populacji przetrwalników o zmienionych właściwościach w stosunku do przetrwalników szczepu typu dzikiego. Przede wszystkim było to obserwowane jako przetrwalniki w fazie ciemnej lub szarej jeszcze przed rozpoczęciem kiełkowania, co wskazuje na uwodnienie ich rdzenia już w trakcie procesu formowania. Wiązało się to również ze zmniejszoną wydajnością sporulacji szczepów z mutacjami. Ponadto, przetrwalniki z mutacjami P324S i P324G były zdolne do kiełkowania w obecności inhibitora. Ponieważ wydajność kiełkowania przetrwalników poszczególnych szczepów, użytych w tych badaniach, różniła się, na koniec przeprowadzono analizę ekspresji genów operonu *gerA* w poszczególnych szczepach *B. subtilis*. Wyniki tego badania pokazały, że różnice obserwowane na poziomie wydajności kiełkowania mogą być efektem nierównego poziomu ekspresji genów w operonie, szczególnie jeśli oryginalny układ genów został zaburzony.

Uzyskane wyniki sugerują, że oryginalna organizacja genów operonu *gerA* może mieć kluczowe znaczenie dla wydajnej syntezy białek kompleksu GerA. Może to również tłumaczyć brak kiełkowania przetrwalników z receptorem GerA zawierającym epitopy antygenowe. Ponadto, wyniki analizy mutacji pozycji P324 w białku A pokazują, że motyw VPPF pełni istotną rolę w działaniu całego kompleksu GerA, prawdopodobnie jako modulator działania białka B, zawierającego przypuszczalną kieszeń wiązania ligandu. W świetle najnowszych opublikowanych danych na temat białek receptora GerA, wyniki z mutagenyzy pozycji 324, mogą stanowić ważny argument przy określaniu funkcji, jaką pełni białko A w aktywacji całego receptora.