

Współdziałanie wybranych czynników związanych z metabolizmem RNA oraz ich wpływ na integralność błon komórkowych *Escherichia coli*

Maja Kochanowska-Łyżeń

Odpowiedź ścisła jest jednym z najważniejszych procesów zachodzących w komórce bakteryjnej. Dzięki aktywności jej cząsteczki efektorowej – czterofosforanu guanozyny (ppGpp), zachodzą niezbędne zmiany w poziomie ekspresji wielu genów, umożliwiające komórce przeżycie w obecności różnego rodzaju warunków stresowych. Ze względu na znaczenie tego globalnego procesu, przez wiele lat prowadzone były badania mające na celu wyjaśnienie jego mechanizmu. Większość z nich przeprowadzana była z użyciem szczepu bakterii *Escherichia coli* – MG1655. Szczep ten posiada mutację w genie *rph*, która według doniesień literaturowych nie wpływa znacząco na fenotyp bakterii.

Moje badania jednoznacznie wskazują, że szczepy bakteryjne posiadające gen *rph* typu dzikiego wykazują inny skład błony zewnętrznej w porównaniu do ich odpowiedników z mutacją *rph-1*. Zmiany te skutkują wyższą zdolnością do przyjmowania obcego DNA plazmidowego z otaczającego środowiska. Ponadto, przy braku aktywności genów *relA* i *spoT*, odpowiadających za produkcję ppGpp w komórce *E. coli*, zauważone różnice ulegają znaczącemu wzmocnieniu. Wyniki te wskazują na występujące powiązanie pomiędzy kodowaną przez gen *rph* RNazą PH, a efekтором odpowiedzi ścisłej. Ponadto wraz z danymi literaturowymi sugerują, że produkty genów *rph*, *relA* i *spoT* mogą wpływać na aktywność alternatywnej podjednostki σ – σ^E , modyfikując poziom ekspresji z genów znajdujących się w jej regulonie (odpowiadającym za integralność błon komórkowych bakterii). Z tego też względu wyniki mojej pracy podkreślają, jak ważnym etapem w pracy naukowej jest wybór odpowiedniego szczepu do planowanych doświadczeń. Nawet potencjalnie nie wywierająca istotnego wpływu mutacja, w odpowiednim połączeniu z innymi, teoretycznie bardzo odległymi zmianami może okazać się istotna i wprowadzać zmiany, których nie jesteśmy w stanie przewidzieć. Po dokładnym przeanalizowaniu dostępnej literatury, można stwierdzić, że problem ten jest często pomijany. Może to tłumaczyć, dlaczego różne grupy badawcze uzyskują przeciwstawne wyniki dotyczące tych samych mechanizmów. Istnieje ryzyko, że takie podejście może skutkować pewnymi błędami w rozumieniu podstawowych zależności występujących pomiędzy badanymi cząsteczkami.

Poza cząsteczką czterofosforanu guanozyny, w odpowiedzi ścisłej bardzo istotną rolę odgrywa białko DksA. Razem z ppGpp wpływa na wiele promotorów, modulując poziom ich ekspresji. Jednym z nich jest promotor pR bakteriofaga lambda. Ze względu na skomplikowaną sieć połączeń, pomiędzy oddziałującymi na niego czynnikami, zarówno bakteryjnymi jak i fagowymi, stanowi doskonały model badawczy. W 2009 roku wykazano, że ppGpp i DksA działają na ten promotor w sposób antagonistyczny. Ponadto, w ostatnich latach pojawiły się doniesienia o dwóch białkach, GreA i GreB, wykazujących duże podobieństwo strukturalne do DksA, wcześniej poznanych jako regulatory etapu

elongacji transkrypcji. Wykazano, że białka te mogą także wywierać wpływ na inicjację transkrypcji. Ze względu na szczególną regulację promotora pR przez białko DksA (przeciwstawną do ppGpp), poznanie efektu jaki wywołują czynniki Gre na ten promotor, pozwoli lepiej zrozumieć ich funkcje związane z regulacją inicjacji transkrypcji.

Dane uzyskane w eksperymentach, opisanych w tej pracy, wskazują, że podobnie do białka DksA, białko GreA jest aktywatorem promotora pR *in vivo* oraz *in vitro*. Mechanizm jego działania polega na zwiększeniu produktywnego wiązania się polimerazy RNA do rejonu promotorowego pR. Pomimo dużego podobieństwa strukturalnego do DksA i GreA, nie zaobserwowałam wpływu białka GreB na aktywność promotora pR. Poznanie mechanizmu ich działania na pR istotnie zwiększa naszą wiedzę dotyczącą funkcji, jaką pełnią w komórce bakteryjnej. Dodatkowo, uzupełnia schemat regulacji tego niezwykle ważnego modelu o kolejne czynniki bakteryjne i wskazuje, że nasza wiedza dotycząca poziomu jego ekspresji jest nadal niekompletna.