

Povzetek

Moduli toksin-antitoksin (TA) vrste II so bakterijski genetski sistemi, ki nosijo zapis za stabilen protein toksin in nestabilen protein antitoksin. Prost toksin se veže na celično tarčo in s tem povzroči začasni zastoj metabolizma ali celično smrt, antitoksin pa z vezavo na toksin prepreči njegovo toksično delovanje. Moduli TA sodelujejo v odzivu celice na stres ali pa služijo ohranjanju plazmida v populaciji, zato so zanimivi tako s stališča razumevanja molekularnih osnov delovanja v bakterijah, kot tudi stališča uporabe v biotehnologiji in pri načrtovanju novih antibiotikov.

V prvem delu disertacije smo s pomočjo denaturacije s sečnino in globalne analize dobljenih podatkov določili termodinamsko stabilnost toksina CcdB_{Vfi} iz kromosoma bakterije *V. fischeri*. Dobljene termodinamske parametre smo primerjali s parametri za toksin CcdB_F iz plazmida F bakterije *E. coli*. Ugotovili smo, da so bistvene razlike v stabilnosti proteinov posledica razlik v entalpijah in da se gonilne sile razvitja CcdB_{Vfi} in CcdB_F precej razlikujejo. Izkazalo se je, da jih lahko v veliki meri razložimo s pomočjo razlik v strukturah nativnih proteinov.

V drugem delu smo obravnavali asociacijo neurejenega fragmenta C-konca antitoksina, CcdA_F, iz modula *ccd* bakterije *E. coli* s toksinoma CcdB_F iz *E. coli* in CcdB_{Vfi} iz *V. fischeri*. Ob vezanju se C-konec zvije v alfa vijačnico in je kot tak zanimiv za študij splošnih značilnosti velike skupine t.i. intrinzično neurejenih proteinov, ki se zvijejo ob vezanju na tarčno molekulo. S pomočjo analize kalorimetričnih titracij, CD spektrov in molekulskega modeliranja smo razložili, kako spremembe aminokislinskega zaporedja fragmenta C-konca CcdA_F vplivajo na njegovo z vezanjem sklopljeno zvitje. Zasnovali smo dve vrsti mutant glede na njihov vpliv na vezavno površino zvitega fragmenta C-konca CcdA_F. Za eno vrsto smo pokazali, da mutacije vplivajo le na zvitje, kar nam je omogočilo razdelitev razlik v termodinamskih parametrih zaradi spremembe aminokislinskega zaporedja na prispevke zvitja in vezanja. Za drugo vrsto mutant smo ugotovili, da vse mutacije neugodno vplivajo na vezanje. Zakaj je temu tako, smo pojasnili s pomočjo entalpijskih in entropijskih prispevkov, ki smo jih interpretirali na nivoju interakcij atomskih skupin. Preučili smo tudi vpliv spremembe aminokislinskega zaporedja fragmenta C-konca CcdA_F na vezanje na spremenjeno vezavno površino tarče (CcdB_F → CcdB_{Vfi}) in ugotovili, da je vpliv termodinamsko ugoden in spremljan z veliko entalpijsko-entropijsko kompenzacijo. Splošen zaključek je tudi ta, da je struktura C-konca CcdA_F v vezanem stanju v veliki meri določena z aminokislinskim zaporedjem samega C-konca.

V zadnjem delu smo s pomočjo izotermne titracijske kalorimetrije in globalne analize dobljenih podatkov uspešno preučili termodinamiko interakcij protein-protein in protein-DNA, ki uravnavajo delovanje modula *maz* bakterije *E. coli*. Izkazalo se je, da vezavni mesti za MazE na MazF nista identični, ampak se ob vezavi ene molekule MazE, vezanje manjšega dela druge molekule MazE onemogoči. Pokazali smo, da vezava MazE na oligonukleotid DNA, ki vsebuje promotorsko zaporedje, poteka na dve mesti z višjo in eno mesto z nižjo afiniteto. Analiza kompetitivnih titracij kaže, da lahko na inhibicijo izražanja modula *maz* vplivajo različni kompleksi MazE:MazF, najbolj pa kompleks z množinskim razmerjem MazE:MazF = 1:1. Simulacije obnašanja sistema pa kažejo, da je hiter odziv na spremembe koncentracij MazE in MazF mogoč le, če so celotne koncentracije MazE in MazF okrog 100- do 1000-krat višje od koncentracije DNA, in da MazE uspešno preprečuje toksično delovanje MazF do največ 40 °C.

Ključne besede: moduli toksin-antitoksin, termodinamika, *ccd*, *maz*, struktura