

San Hadži, Strukturne in termodinamske osnove regulacije prepisovanja genov modula toksin-antitoksin *higBA2* iz *Vibrio cholerae*

Moduli toksin-antitoksin so majhni operoni, ki se nahajajo na bakterijskih kromosomih ali plazmidih. V operonu je zapis za protein toksin, ki lahko onesposobi pomembne celične procese, medtem ko zapis za antitoksin uravnava aktivnost toksina. Moduli toksin-antitoksin so udeleženi pri več pomembnih celičnih procesih, in sicer: pri stabilizaciji genov, celičnem samomoru, obrambi pred fagi in odzivu na stres. Pri slednjem procesu toksini ustavijo celični metabolizem, kar povzroči hibernacijo celic in te postanejo neodzivne na zdravljenje z antibiotiki. V doktorskem delu sem raziskoval mehanizem regulacije modula toksin-antitoksin *higBA2* iz človeku nevarnega organizma *Vibrio cholerae*. Za učinkovito delovanje modula je potrebna natančna regulacija, ki večino časa preprečuje delovanje toksina, v nekaterih primerih pa njegovo delovanje dopusti.

Regulacija mora vključevati mehanizem, s katerim se celice iz stanja hibernacije povrnejo v normalo stajanje. Pri vseh modulih toksin-antitoksin prvi nivo regulacije vključuje antitoksin, ki se z visoko afiniteto veže na toksin. Pri najmanj treh modulih (*ccdBA*, *phd/doc* in *relBE*) obstaja še drugi nivo regulacije, ki poteka na ravni regulacije izražanja proteinov. Kot kaže, je njegova funkcija vzdrževati zadostne količine antitoksina. Drugi nivo regulacije se imenuje regulacija s pogojno kooperativnostjo in njena lastnost je, da je vezava represorskih kompleksov na operator odvisna od molskega razmerja med toksinom in antitoksinom. V disertaciji sem skušal raziskati oba nivoja regulacije in ugotoviti ali je regulacija s pogojno kooperativnostjo splošna značilnost toksin-antitoksin modulov.

V doktorski nalogi sem prišel do treh pomembnejših ugotovitev. Prva zadeva mehanizem regulacije toksin-antitoksin modula *higBA2*. Ugotovil sem, da gre za nov način regulacije, pri kateri je izražanje genov odvisno od molskega razmerja med toksinom in antitoksinom. Osnova delovanja mehanizma je negativno kooperativna vezava toksina na antitoksin, ki zniža jakost interakcije med kompleksom HigBA2 in operatorjem. Ta način regulacije lahko upravičeno imenujemo antikooperativna regulacija. Na molekularni ravni sem pojasnil njeno delovanje in določil strukture vseh udeleženih makromolekulskih kompleksov. Ključno vlogo pri vzpostavitvi mehanizma ima intrinzično nestrukturirana domena antitoksina HigA2, za katero nisem mogel pridobiti strukturnih podatkov z atomsko ločljivostjo. Ta domena z visokoafinitetno vezavo na toksin regulira aktivnost toksina, šibke interakcije z operatorsko regijo pa so pomembne za vzpostavitev negativne kooperativnosti in pri aktivaciji modula.

Drugi pomembnejši rezultat je primerjalna študija regulacijskih mehanizmov toksin-antitoksin modulov. Z izračunom faznih površin za vsak modul sem ugotovil, katere so splošne značilnosti regulacijskega faznega prostora in predlagal njihov biološki pomen. Glede na procese, ki vodijo regulacijo predlagam, da se način regulacije, ki je sedaj znan kot pogojno kooperativna regulacija, loči na dva tipa regulacije in sicer na pogojno avidno in pogojno kooperativno regulacijo. Oba omenjena načina regulacije sta mehanistično bolj zapletena od antikooperativne regulacije, vendar omogočata vzpostavitev minimalne koncentracije toksina v sistemu.

Tretji pomembnejši rezultat je vzpostavitev metode za določanje termodinamskih parametrov za zvitje intrinzično nestrukturiranih proteinov. Osnovna regulacija delovanja toksinov namreč temelji na visokoafinitetni vezavi z antitoksini. HigA2 antitoksin se, tako kot mnogi drugi antitoksini, ob vezavi zvije v α -vijačno strukturo. Termodinamske osnove tovrstnih sklopljenih procesov niso najbolje razumljene, saj je težko preučevati vsakega od procesov ločeno. Uporabil sem 2,2,2-trifluoroetanol, ki spodbuja nastanek α -vijačne strukture. S pomočjo CD spektroskopije sem ocenil delež α -vijačne strukture peptida HigA2₃₋₂₂ (ta ustreza delu, ki se ob vezavi zvije v α -vijačnico) v odvisnosti od koncentracije TFE in temperature. Podatke sem analiziral z Lifson-Roigovo teorijo, ki opisuje prehod naključnega klobčiča v α -vijačnico. S prilagajanjem modela podatkom sem določil termodinamske parametre zvitja peptida neodvisno od vezave na toksin.