

Povzetek

Sistemi toksin-antitoksin so majhni genetski elementi s širokim naborom predlaganih bioloških funkcij ter uporabe v biokemiji in medicini. Izmed do sedaj znanih osem tipov sistemov toksin-antitoksin, je najbolj preučevan tip II. Sestavljata ga gena za protein toksin in protein antitoksin. Antitoksin zavira delovanje toksina preko neposrednih interakcij. V doktorskem delu sem se osredotočila preučevanje zapletenega regulacijskega mehanizma sistemov tipa II. Pogosto je v regulacijo vpleten antitoksin, ki se veže na lasten promotor in zavira izražanje genov za antitoksin in toksin. Vezava toksina na antitoksin vpliva na njegovo sposobnost vezave DNA. Pri delu sem obravnavala predvsem ne-kooperativne sisteme, kjer toksin ošibi interakcijo z DNA, ter pogojno kooperativne sisteme, sisteme, pri katerih toksin ošibi vezanje antitoksina na DNA (ne-kooperativna regulacija), ter sisteme, pri katerih je vezava kompleksa toksin-antitoksin na promotor vezana na njuno molsko razmerje (pogojno kooperativna regulacija).

Raziskave mehanizmov regulacije delovanja so pogosto izvedene *in vitro*, brez podrobne karakterizacije obnašanja regulacije sistema v celičnem okolju. Želela sem vzpostaviti sistem za spremljanje odziva promotorja na molsko razmerje toksin/antitoksin v *E. coli*. Kot potencialna induktorja za nadzorovano izražanje genov antitoksina in toksina sem ovrednotila IPTG ter L-arabinozo. Oba sta ob dodatku v celično populacijo znana po odzivu »vse-ali-nič«, kar je bilo za načrtovane raziskave nezaželeno. Takega odziva sem se znebila z uporabo seva Tuner[DE3] ter s konstanto produkcijo transporterja AraE, kar mi je omogočilo neodvisno nadzorovano izražanje poročevalca sfGFP. Na osnovi pridobljenih rezultatov sem zasnovala ogrodni vektor pRAT-sfGFP, ki omogoča preučevanje regulacijskega mehanizma sistemov tipa II v *E. coli*.

Raziskave, v sodelovanju z drugimi komplementarnimi skupinami so nam omogočile karakterizacijo ne-kooperativnega mehanizma regulacije sistema VcHigBA2. Značilnosti izražanja s konstitutivnimi promotorji in ogrodjem pRAT-sfGFP se ujemajo z mehanizmom predpostavljenim na osnovi eksperimentov izvedenih *in vitro*. Regulacija sistema VcHigBA2 je nadzorovana predvsem s strani neurejene domene antitoksina. Tak nadzor ni mogoč, ko je neurejena domena antitoksina vezana na toksin.

Naslednji korak je bilo raziskovanje v sistemih PvHigBA, PpGraTA, EcMqsRA, EcRelBE, EcMazEF, EcCcdBA in EpPhdDoc na ogrodju pRAT-sfGFP. Primerjala sem moč promotorjev in odziv sistemov na prisotnost induktorjev. Sistemi, ki izvirajo s plazmidov, imajo močnejše promotorje od kromosomalnih sistemov. Odziv izražanja poročevalca je za posamezen sistem unikaten in se v veliki meri ujema s podatki pridobljenimi v prejšnjih poskusih za sistema PvHigBA in PpGraTA. Sistemi EcMqsRA, EcRelBE, EcMazEF, EcCcdBA in EpPhdDoc proizvedejo bolj kompleksen, ki zahteva bolj podrobno obravnavo.

Pri ugotavljanju mehanizma regulacije delovanja sistemov toksin-antitoksin v *E. coli* so se pojavili tudi novi izzivi. Predvsem je potrebna podrobna obravnava toksičnosti encimsko neaktivnih toksinov, koncentracij proteinov, ki določajo pogojno kooperativnost, »puščanja« antitoksina in zaznavanja ravni proizvedenih proteinov pri poskusih izražanja. Kljub temu menim, da rezultati mojega doktorskega dela predstavljajo dobro osnovo za raziskave delovanja sistemov toksin-antitoksin v celičnem okolju.

Ključne besede: toksin-antitoksin, nadzorovano izražanje gena, VcHigBA2, profil izražanja, IPTG, L-arabinoza