

Charakterystyka regulatora transkrypcji białka RapA *Pseudomonas putida*

Ewa Stec-Dziedzic

Polimeraza RNA, główny enzym odpowiedzialny za aktywność transkrypcyjną komórki, jest celem działania wielu białkowych i niebiałkowych czynników regulujących jej aktywność. Niewiele czynników regulatorowych wchodzi jednak w tak silny kontakt z polimerazą RNA, aby umożliwić wspólne oczyszczanie podczas izolacji enzymu z komórki. Dlatego też bardzo interesujące było odkrycie, iż podczas oczyszczania natywnej polimerazy RNA z bakterii glebowej *Pseudomonas putida* powtarzalnie pojawia się dodatkowa frakcja rdzenia polimerazy RNA związana z białkiem o masie około 110 kDa. N-końcowe sekwencjonowanie pozwoliło na zidentyfikowanie nowo odkrytego białka jako homologicznego do białka RapA *Escherichia coli* (52% homologii). Białko RapA *P. putida* wiąże się stabilnie z polimerazą RNA, jednakże w odróżnieniu od RapA *E. coli*, oczyszcza się wraz z rdzeniem polimerazy, a nie z jej holoenzymem.

We wstępnie przeprowadzonych badaniach wykazałam, że białko RapA oczyszczone jako frakcja polimerazy powodowało znaczną stymulację transkrypcji z zależnego od σ^{70} promotora pL bakteriofaga λ jak również z zależnego od σ^{54} promotora Po operonu *dmp*, który cechuje odmienny od innych czynników σ mechanizm inicjacji transkrypcji.

Celem mojej pracy było scharakteryzowanie roli białka RapA *P. putida* w transkrypcji. W tym celu w kolejnym etapie pracy białko RapA oczyściłam niezależnie od polimerazy. Wykazałam, że białko to posiada aktywność ATPazy, która jest znacząco stymulowana przez polimerazę RNA, przy czym aktywność samej polimerazy jest nieznaczna. Dalsze badania transkrypcji *in vitro* wykazały, iż RapA-His *P. putida* aktywuje transkrypcję z promotorów zależnych od różnych czynników σ , zarówno z zależnych od czynnika σ^{70} : promotorów pL i pR bakteriofaga lambda oraz promotora P1 genu *rrnB*, jak również aktywuje promotory zależne od alternatywnych czynników σ , które uruchamiane są w warunkach niedoboru składników pokarmowych oraz warunkach stresowych: σ^{54} -pO operonu *dmp*, σ^E genu *htrA*, σ^{32} genu *dnaK*. Efekt ten obserwowałam głównie podczas wielorundowej („multi-round”) przedłużonej reakcji transkrypcji oraz przy wysokich, hamujących aktywność promotorów stężeniach soli. Jednakże aktywowanie transkrypcji przez RapA było także widoczne w optymalnym składzie buforowym, jak również na matrycy liniowej. Aktywacja ta była widoczna zarówno dla białka RapA *P. putida* w reakcji z holoenzymem polimerazy RNA *P. putida* jak i z holoenzymem *E. coli*. Z kolei analiza

poszczególnych etapów procesu transkrypcji pozwoliła stwierdzić, że białko RapA *P. putida* wzmacnia stabilność kompleksów otwartych formowanych przez polimerazę na promotorze.

Dodatkowo wykazałam istnienie związku pomiędzy aktywnością ATPazy białka RapA i aktywacją transkrypcji przy jego udziale, co wskazuje na złożoną korelację pomiędzy tymi procesami. Związek pomiędzy aktywacją transkrypcji, a aktywnością ATPazy białka RapA zbadalam dzięki zastosowaniu form RapA ze zmodyfikowanymi domenami wiążącymi nukleotydy, niezdolnych do hydrolizy ATP. Badania przeprowadzone z udziałem zmienionych białek wykazały, że ich aktywność ATPazy jest kilkakrotnie obniżona w stosunku do białka niezmienionego już w przypadku pojedynczych mutantów.

W toku prowadzonych badań zaobserwowałam, że *P. putida* pozbawiony *rapA* nie wykazuje nawet jedyne obserwowanego dla *E. coli* defektu, jakim była niezdolność do wzrostu w obecności wysokiego stężenia soli, jednak wprowadzenie na plazmidzie i kontrolowana nadprodukcja białka RapA niezależnie czy pochodzącego z *E. coli* czy *P. putida* umożliwia odzyskanie zdolności wzrostu szczepu *E. coli* $\Delta rapA$ w wysokim stężeniu soli.

Podjęłam także badania mające na celu określenie potencjalnej przewagi selekcyjnej bakterii wynikającej z obecności RapA, na którą może wskazywać aktywacja transkrypcji z promotorów zaangażowanych w procesy przystosowania komórki do niekorzystnych warunków życiowych. Przeprowadziłam badania krzywych wzrostu i przeżywalności bakterii w pożywce w warunkach limitujących źródło azotu, składniki odżywcze oraz w warunkach szoku termicznego. Ponieważ RapA należy do rodziny białek zaangażowanych w naprawę DNA zbadalam również możliwości naprawcze szczepów *rapA* i $\Delta rapA$ zarówno *E. coli* jak i *P. putida* mierzonych poprzez badanie wrażliwości na światło UV. Rezultaty tych badań wskazują, iż brak białka RapA nie powoduje obniżonej przeżywalności bakterii w testowanych warunkach stresowych. Z kolei konstrukcja fuzji operonowych z genem reporterowym *lacZ* oraz *luxAB* umożliwiła mi zbadanie aktywności badanych promotorów podczas braku i nadprodukcji białka RapA. Pozwoliło to stwierdzić, iż niedobór białka RapA w komórce powoduje obniżoną aktywność *in vivo* jedynie promotora genu *htrA*.

Podsumowując, przeprowadzenie zaplanowanych w mojej pracy doktorskiej badań miało za zadanie zbadanie molekularnych mechanizmów aktywacji transkrypcji przez białko RapA *P. putida*, jak i jego roli fizjologicznej. Wykazałam, że RapA jest aktywatorem transkrypcji o aktywności ATPazy. Funkcja fizjologiczna białka pozostaje nadal nie do końca poznana, jednakże z funkcji jaką białko *rapA* pełni w warunkach *in vitro*, mogą wynikać różne implikacje dotyczące jego działania w komórce. Pozwoli to na lepsze poznanie oraz

zrozumienie roli białka RapA, będącego dzięki swojej obecności w istotnej frakcji polimerazy RNA ważnym regulatorem transkrypcji.