

Wpływ białek szoku termicznego IbpA i IbpB na utlenianie i agregację białek bakterii *Escherichia coli* w stacjonarnej fazie wzrostu i w warunkach stresowych

Joanna Kwiatkowska

W warunkach laboratoryjnych, gdy podstawowe składniki pokarmowe w pożywce ulegną wyczerpaniu bakterie osiągają stacjonarną fazę wzrostu. Celem mojej pracy było sprawdzenie czy podczas stacjonarnej fazy wzrostu, w starzejących się komórkach *E. coli* pojawiają się nierozpuszczalne agregaty zawierające uszkodzone białka.

Wykazałam, że w późnej stacjonarnej fazie wzrostu w komórkach *E. coli* gromadzą się wieloskładnikowe agregaty białkowe oraz kompleksy białka Dps z chromosomowym DNA. Stwierdziłam także, że powstawanie wieloskładnikowych agregatów białek lub kompleksów Dps-DNA zależy od dostępności tlenu i glukozy w pożywce. W warunkach tlenowych, w komórkach hodowanych w pożywce LB uzupełnionej glukozą pojawiały się kompleksy Dps-DNA, podczas gdy wieloskładnikowe agregaty białek powstawały przy braku glukozy. Odwrotny efekt obserwowałam w warunkach beztlenowych – kompleksy Dps-DNA powstawały w komórkach hodowanych bez glukozy, a wieloskładnikowe agregaty białek pojawiały się w obecności glukozy. Na tym etapie badań trudno było wytłumaczyć w jaki sposób zmiany metaboliczne wywołane obecnością lub brakiem tlenu i glukozy decydowały o rodzaju powstających agregatów. Uzupełnienie pożywki 40 mM buforem MOPS pH 7,4, w celu utrzymania pH hodowli na stałym poziomie, wyraźnie hamowało tworzenie wieloskładnikowych agregatów białek i kompleksów Dps-DNA. Jednocześnie obecność MOPS w pożywce opóźniała stacjonarną fazę wzrostu jedynie w przypadku hodowli *E. coli* rosnących w warunkach beztlenowych bez glukozy. Wyizolowane, z hodowli tlenowych i z hodowli beztlenowych, agregaty wieloskładnikowe zawierały białka: rybosomalne, stresowe, biorące udział w różnych szlakach metabolicznych (glikoliza, przemiany puryn i pirymidyn, synteza aminokwasów) oraz uczestniczące w translacji. Można przypuszczać, że zahamowanie wzrostu komórek w późnej fazie stacjonarnej jest nie tylko wynikiem niedoboru składników pokarmowych, lecz również denaturacji i agregacji istotnych dla komórki białek. Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały także, że przyczyną agregacji białek nie było ich nieodwracalne utlenienie, które uważane jest za jedną z cech starzejących się komórek. Stwierdziłam również, że utlenione w trakcie fazy stacjonarnej białka pozostawały rozpuszczalne.

Dalsze doświadczenia wykazały, że w stacjonarnej fazie wzrostu białka szoku termicznego IbpA i IbpB nie wpływały na powstawanie agregatów, ale wyraźnie opóźniały utlenianie białek w komórkach *E. coli*. IbpA i IbpB hamowały oksydacyjną inaktywację modelowego enzymu, dehydrogenazy alkoholowej AdhE, *in vivo* – po przeniesieniu hodowli z warunków beztlenowych do tlenowych oraz w reakcji *in vitro*, w której AdhE utleniano w obecności FeCl₃ i askorbinianu.

Wyniki te wykazały, że IbpA/B są białkami opiekuńczymi, które chronią bakterie *E. coli* nie tylko przed stresem termicznym lecz również oksydacyjnym.