

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**Mgr inż. Andrzej Dubiel**

podpis.....

**Proteaza ClpAP jako czynnik kontrolujący  
aktywację systemu toksyna-antytoksyna *parDE*  
plazmidu RK2**

**ClpAP protease as a controlling factor of the *parDE* toxin-antitoxin system  
activation of RK2 plasmid**

Praca przedstawiona

Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego

celem uzyskania stopnia doktora

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: **Prof. dr hab. Igor Konieczny**

Promotor pomocniczy: **Dr Katarzyna Węgrzyn**

Pracownia Biologii Molekularnej  
Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*Dziękuję Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie w trakcie realizacji niniejszej pracy w ramach grantu „Kompleksy nukleoproteinowe w replikacji DNA, proteolizie i plazmidowych systemach programowanej śmierci komórki” DEC-2012/04/A/NZ1/00048*



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I

*Serdecznie dziękuję:*

*Promotorom,  
Profesorowi Igorowi Koniecznemu i doktor Katarzynie Węgrzyn  
Za wszystko czego się nauczyłem w trakcie realizacji doktoratu.*

*Rodzinie,  
Żonie Kamili za wsparcie i motywację.*

*Rodzicom i Braciom,  
Za możliwości, bez których nie stałbym w tym miejscu.*

*Babci Danusi,  
Której wiara była niezłomna od początku...*

*Pracownikom Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej  
A w szczególności Ani, Marcie i Gosi,  
Za pomoc, owocne dyskusje i wspaniałą atmosferę pracy.*

# Spis treści

<b>INDEKS SKRÓTÓW</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Streszczenie</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Wstęp</b> .....	<b>10</b>
2.1 Systemy toksyna-antytoksyna .....	10
2.2 Funkcje komórkowe systemów TA .....	11
2.2.1 Posegregacyjna śmierć komórki PSK .....	13
2.2.2 Odpowiedź na infekcję fagową .....	14
2.2.3 Formowanie komórek spoczynkowych .....	14
2.3 Cele komórkowe toksyn .....	16
2.3.1 Cele komórkowe toksyn systemów TA typu II .....	17
2.3.2 Cele komórkowe toksyn pozostałych typów .....	18
2.4 Aktywacja systemów TA .....	19
2.4.1 Regulacja działania systemów TA poprzez transkrypcję .....	19
2.4.2 Autoregulacja transkrypcji systemów TA typu II .....	20
2.4.3 Bezpośrednie kontrolowanie toksyny przez sprzężoną antytoksynę .....	22
2.4.4 Aktywacja systemów TA typu II przez proteolizę antytoksyny .....	23
2.5 System TA <i>parDE</i> plazmidu RK2 .....	24
2.5.1 Antytoksyna ParD .....	25
2.5.2 Toksyna ParE .....	25
2.5.3 Aktywacja systemu <i>parDE</i> .....	26
<b>3 Cele pracy</b> .....	<b>27</b>
<b>4 Materiały</b> .....	<b>28</b>
4.1 Szczepy bakteryjne .....	28
4.2 Plazmidy i oligonukleotydy .....	28
4.2.1 Plazmidy .....	28
4.2.2 Oligonukleotydy .....	30
4.3 Bufory i roztwory .....	30
4.3.1 Bufory .....	30
4.3.2 Roztwory .....	32
4.4 Podłoża hodowlane .....	32
4.5 Złoża chromatograficzne .....	33
4.6 Odczynniki .....	33
4.7 Białka .....	34

4.8	Przeciwciężła .....	35
4.9	Inne materiały .....	35
4.10	Sprzęt.....	35
<b>5</b>	<b>Metody.....</b>	<b>37</b>
5.1	Oczyszczanie DNA.....	37
5.2	Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	37
5.3	Trawienie restrykcyjne DNA .....	37
5.4	Wypełnianie lepkich końców DNA fragmentem Klenowa.....	38
5.5	Defosforylacja.....	38
5.6	Ligacja .....	38
5.7	Przygotowanie komórek kompetentnych i transformacja .....	38
5.8	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym .....	39
5.9	Elektroforeza w denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) .....	39
5.10	Barwienie żeli poliakrylamidowych barwnikiem Coomassie.....	39
5.11	Western Blotting .....	39
5.12	Określenie stężenia białek i DNA.....	40
5.13	Oczyszczanie białek .....	40
5.13.1	Oczyszczanie białka ParD plazmidu RK2 .....	40
5.13.2	Oczyszczanie białka ParE plazmidu RK2 .....	41
5.13.3	Oczyszczanie białka GyrAB <i>Escherichia coli</i> .....	41
5.13.4	Oczyszczanie białka ClpA <i>Escherichia coli</i> .....	42
5.13.5	Oczyszczanie białka ClpA <i>Caulobacter crescentus</i> i ClpA <i>Pseudomonas putida</i> .....	43
5.13.6	Oczyszczanie białka ClpX <i>Escherichia coli</i> .....	44
5.13.7	Oczyszczanie białka ClpP <i>Escherichia coli</i> .....	45
5.13.8	Oczyszczanie białka ClpP <i>Caulobacter crescentus</i> i ClpP <i>Pseudomonas putida</i> .....	45
5.14	Test aktywności gyrazy.....	46
5.15	Proteoliza <i>in vitro</i> .....	46
5.16	Test immunoenzymatyczny (ELISA).....	47
5.17	Test EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay) .....	47
5.18	Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) .....	48
5.18.1	Analiza oddziaływań typu białko-białko .....	48
5.18.2	Analiza danych SPR.....	49
5.19	Analiza stabilności białka <i>in vivo</i> .....	49
5.20	Określenie liczby komórek w komorze Petroffa-Hausera .....	50
5.21	Analiza stabilności plazmidu.....	50
5.22	Analiza statystyczna otrzymanych wyników .....	51

5.23	Analiza struktur białek i kompleksów nukleoproteinowych systemu <i>parDE</i> .....	51
<b>6</b>	<b>Wyniki</b> .....	<b>52</b>
6.1	Oczyszczanie komponentów białkowych systemu TA <i>parDE</i> i proteaz bakteryjnych .....	52
6.2	Analiza aktywności oczyszczonych komponentów systemu TA <i>parDE</i> .....	53
6.3	Proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za degradację białka ParD .....	56
6.4	Białko ParE jest stabilne w komórkach gospodarza .....	57
6.5	DNA stymuluje proteazę ClpAP do degradacji ParD .....	57
6.6	Stabilność białka ParD wzrasta, gdy jest związane z ParE .....	59
6.7	Proteaza ClpAP jest niezbędna do aktywacji systemu TA <i>parDE</i> plazmidu RK2 .....	64
6.8	Formowanie kompleksu ParDE wpływa na struktury i funkcje obu białek systemu <i>parDE</i> plazmidu RK2 .....	67
<b>7</b>	<b>Dyskusja</b> .....	<b>70</b>
	<b>Podsumowanie</b> .....	<b>77</b>
	<b>Tabele</b> .....	<b>79</b>
	<b>Literatura</b> .....	<b>81</b>

## INDEKS SKRÓTÓW

A – antytoksyna

aa – (ang. amino acid) aminokwasy

AAA+ – (ang. ATPases Associated with diverse cellular Activities) ATPazy związane z różnorodnymi aktywnościami komórkowymi

ADP – difosforan adenozyne

Amp – ampicylina

ATP – trójfosforan adenozyne

BSA – (ang. bovine serum albumin) albumina surowicy bydlęcej

Cc – *Caulobacter crescentus*

DTT – ditiotreitol

Ec – *Escherichia coli*

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy

ELISA – (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymosorbcyjny

EMSA – (ang. electrophoretic mobility shift assay) opóźnienie migracji w żelu

EtBr – (ang. ethidium bromide) bromek etydyne

Gent – gentamycyna

HEPES – kwas 4-(2-hydroksyetylo) piperazyno-1-etanosulfonowy

HRP – (ang. horse radish peroxidase) peroksydaza chrzanowa

IPTG – izopropylo- $\beta$ -D-tiogalaktozyd

Kan – kanamycyna

ZBM – Zakład Biologii Molekularnej MWB UG i GUMed

MCS – (ang. multiple cloning site) miejsce wielokrotnego klonowania

NHS – N-hydroksysukcynimid

obr/min – obroty na minutę

OD<sub>600</sub> – (ang. optical density) gęstość optyczna hodowli, absorpcja zawiesiny bakterii przy długości fali 600 nm.

PAGE – (ang. polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforeza z użyciem żelu poliakrylamidowego

PCR – (ang. polymerase chain reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy

PDB – Protein Data Bank

PEI – polietylenoimina

Pi – fosfor nieorganiczny

PMSF – (ang. phenylmethanesulfonylfluoride) fluorek fenylometylosulfonowy

Pp – *Pseudomonas putida*

*pparDE* – sekwencja promotorowa operonu *parDE*

ppGpp – polifosforan guanozyny

PSK – system posegregacyjnej śmierci komórki

RU – (ang. Response unit) jednostka odpowiedzi

SAP – (ang. shrimp alkaline phosphatase) fosfataza alkaliczna z krewetki

SD – (ang. standard deviation) odchylenie standardowe

SDS – dodecylosiarczan sodu

SPR – (ang. surface plasmon resonance) powierzchniowy rezonans plazmonowy

T – toksyna

TA – toksyna-antytoksyna

Tet – tetracyklina

T<sub>m</sub> – temperatura topnienia

U – (ang. Unit) jednostka

UV – światło ultrafioletowe

wt – (ang. wild type) typ dziki (dotyczy szczepów i białek)



# 1 Streszczenie

Systemy toksyna-antytoksyna (TA) stanowią istotny element regulacyjny w komórkach bakteryjnych. Mogą one wpływać na: odpowiedź na stres środowiskowy, infekcję fagową, utrzymywanie patogennych bakterii w organizmie eukariotycznym i utrzymanie plazmidu w komórkach gospodarza. W wielu przypadkach systemy TA zapewniają przeżycie populacji bakteryjnej. Plazmid RK2 o szerokim spektrum gospodarza koduje operon *parDE*, w którego skład wchodzi dwa geny: *parD* kodujący antytoksynę oraz *parE* kodujący toksynę. W komórkach posiadających plazmid oba komponenty białkowe systemu TA są produkowane konstytutywnie. Białka te tworzą kompleks, co hamuje toksyczny efekt wywołany przez białko ParE względem gyrazy bakteryjnej GyrAB. W komórkach, które utraciły plazmid, niestabilna antytoksyna ulega degradacji, co umożliwia toksynie oddziaływanie z celem komórkowym. Powoduje to eliminację komórek bakteryjnych, które utraciły plazmid. Efekt taki nazywany jest posegregacyjną śmiercią (ang. post-segregational killing - PSK). Do tej pory nie wiadomo było jaki czynnik komórkowy jest odpowiedzialny za degradację komponentów białkowych systemu *parDE* i aktywację PSK.

Głównym celem mojego projektu było zidentyfikowanie proteazy odpowiedzialnej za degradację białkowych komponentów systemu *parDE*. W pierwszym etapie przeprowadziłem testy *in vivo* z wykorzystaniem szczepów *E. coli* C600 oraz inaktywacjami genów proteaz. Przeprowadzane testy wykazały, że to antytoksyna ParD jest niestabilnym elementem systemu *parDE*. Natomiast stabilność antytoksyny ParD wzrasta w szczepie *E. coli clpA(-)*. Aby potwierdzić otrzymane wyniki *in vivo* oczyściłem plazmidowe białka ParE, ParD oraz białka *Escherichia coli* GyrAB (gyraza), Lon, ClpA, ClpP i ClpX. Następnie wykonałem doświadczenia *in vitro* z wykorzystaniem oczyszczonych białek. Otrzymane wyniki potwierdziły, że to proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za degradację białka ParD. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że dwuniciowy DNA (dsDNA) stymuluje proteolizę ParD, natomiast białko ParE zwiększa stabilność białka ParD. Oddziaływania pomiędzy białkami ParE, ParD i ClpA przedstawiłem wykorzystując techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) i testu immunoenzymatycznego (ELISA). Potwierdziły one oddziaływanie ParD-ParE oraz pokazały oddziaływanie ParD-ClpA i możliwość formowania kompleksu potrójnego pomiędzy białkami ParD, ParE i ClpA. Samo białko ParE nie wiązało się do białka ClpA. Sprawdziłem również czy operon *parDE* może być wykorzystany do zwiększenia stabilności innych plazmidów. W tym celu

skonstruowałem wektor pABD6-1 o szerokim spektrum gospodarzy, z wklonowanym operonem *parDE*, jako jedynym kodowanym systemem TA. Uzyskane wyniki pokazały, że plazmid pABD6-1 jest wydajniej utrzymywany w komórkach gospodarza, niż plazmid nie posiadający systemu *parDE*. Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy proteaza ClpAP jest uniwersalnym aktywatorem systemu PSK plazmidu RK2. Wykonałem proteolizy antytoksyny ParD proteazą ClpAP z innych gatunków bakterii, które mogą utrzymywać plazmid RK2. W tym celu oczyściłem białka ClpA i ClpP z bakterii *Caulobacter crescentus* i *Pseudomonas putida*. Wyniki proteolizy *in vitro* świadczą o tym, że proteazy ClpAP z *C. crescentus* i *P. putida* są w stanie wydajnie degradować antytoksynę ParD. Stabilność plazmidu pABD6-1 zawierającego operon *parDE* w bakteriach *C. crescentus* i *P. putida* jest dużo większa niż plazmidu pBBR1MSC-5 bez operonu *parDE*.

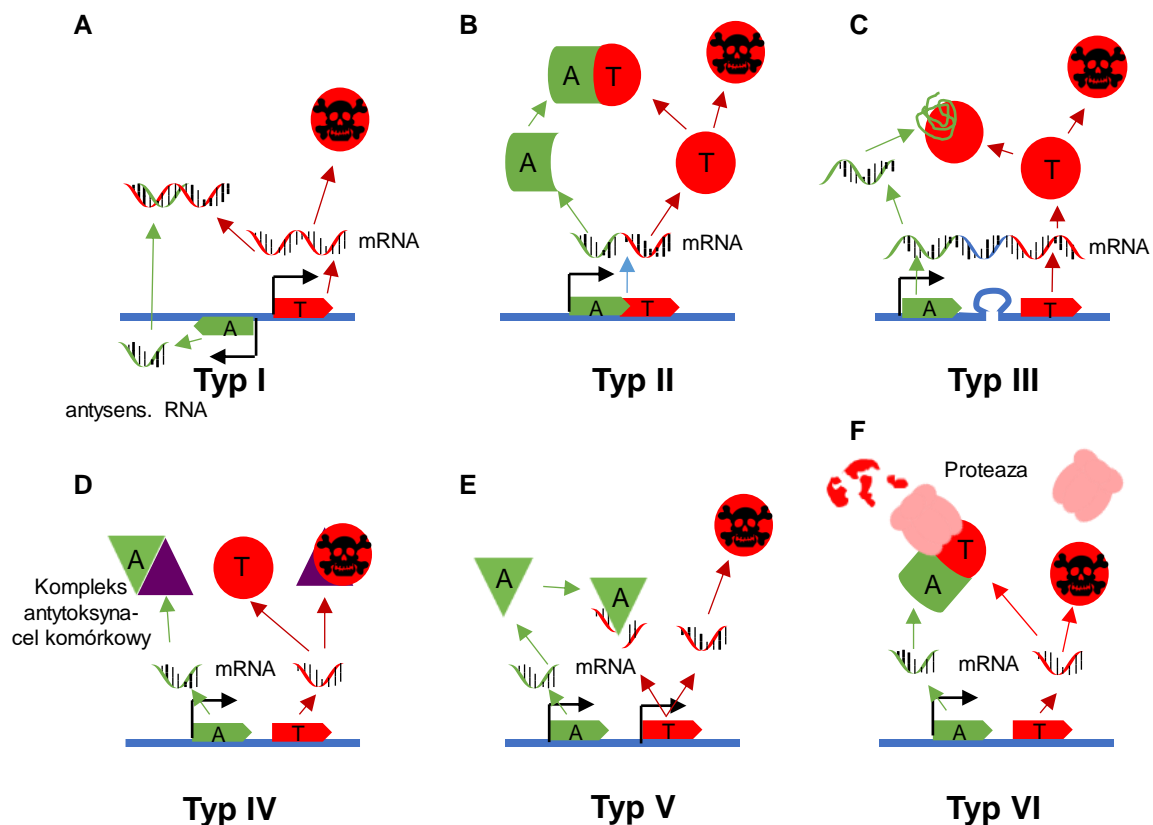
## 2 Wstęp

Bakteryjne systemy toksyna-antytoksyna (TA) są powszechnie występującymi elementami genetycznymi. Kodują one toksyny zdolne do hamowania wzrostu komórek i antytoksyny, które przeciwdziałają efektowi toksyczności. Toksyny kodowane przez systemy TA to białka, które posiadają zróżnicowane cele komórkowe oraz wiele aktywności molekularnych. W większości przypadków toksyny zakłócają procesy translacji i replikacji DNA w komórkach gospodarza. Antytoksyny mogą występować w postaci białek lub RNA, które często kontrolują swoje pokrewne toksyny przez bezpośrednie interakcje lub w połączeniu z innymi elementami sygnalizacyjnymi, poprzez regulację transkrypcyjną i translacyjną systemu TA. W komórkach bakterii systemy TA kodowane są zarówno na DNA chromosomalnym jak i plazmidowym. Opisano trzy główne funkcje biologiczne systemów TA: aktywującą posegregacyjną śmierć komórki (ang. PSK - post-segregational killing) polegającą na eliminacji komórek, które utraciły plazmid; odpowiedź na infekcję fagową (ang. abortive infection), czyli odporność na bakteriofagi przez altruistyczne samobójstwo i formowanie komórek spoczynkowych (ang. persister cell), czyli tolerancja na stres środowiskowy poprzez wstrzymanie metabolizmu.

### 2.1 Klasyfikacja systemów toksyna-antytoksyna

We wszystkich znanych systemach TA toksyna jest zawsze białkiem. Aktualnie rozróżniamy sześć typów systemów TA, które dzielimy ze względu na aktywność i formę antytoksyny (Karlołowicz i wsp., 2016). Istnieją dwa typy systemów TA, w których antytoksyna jest cząsteczką RNA: typ I gdzie antytoksyna jest antysensownym RNA, który łączy się z mRNA toksyny i zapobiega jej translacji np. *ralAR* (Guo i wsp., 2014) (Ryc. 1A); typ III gdzie antytoksyna oddziałuje z toksyną i blokuje jej aktywność, np. *toxIN* (Fineran i wsp., 2009) (Ryc.1C). W pozostałych czterech typach systemów TA antytoksyna jest białkiem: typ II gdzie antytoksyna tworzy kompleks z toksyną i blokuje jej aktywność, np. *parDE* (Johnson i wsp., 1996) (Ryc. 1B); typ IV gdzie antytoksyna chroni cel komórkowy przed działaniem toksyny, ale nie wiąże się bezpośrednio z toksyną, np. *yeeUV* (Masuda i wsp., 2012) (Ryc. 1D); typ V gdzie antytoksyna to RNAza, która degradowuje mRNA toksyny, np. *ghoTS* (Wang i wsp., 2012) (Ryc. 1E); typ VI gdzie antytoksyna wchodzi w interakcję z toksyną i pozwala na jej degradację przez proteazy np. *socAB* (Aakre i wsp., 2013) (Ryc. 1F). Molekularne mechanizmy działania systemów TA nadal są słabo rozumiane. Większość badań skupia się

na systemach TA typu II, w których oba komponenty są białkami.

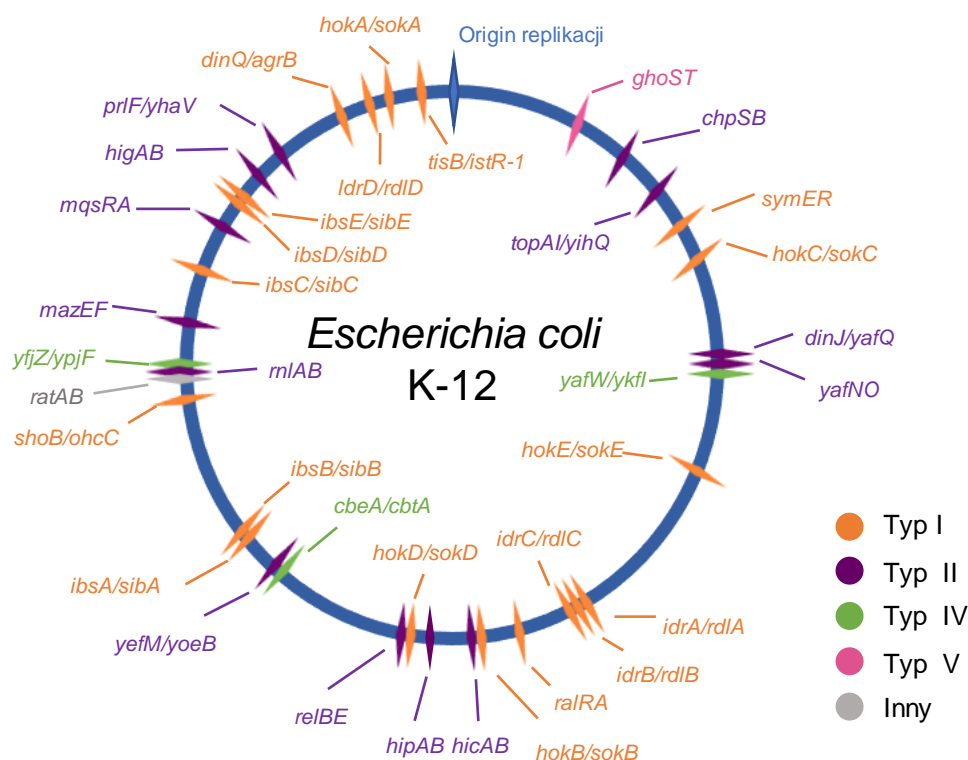


**Rycina 1. Typy systemów toksyna-antytoksyna (TA) i mechanizm ich regulacji.** Ilustracja przedstawiająca znane typy systemów TA (typy I – VI), różniące się trybem kontroli toksyn (T) (czerwony) przez pokrewne antytoksyny (A) (zielony). Loci genów pokazano w postaci strzałek blokowych w kolorze czerwonym (gen toksyny) i zielonym (gen antytoksyny), DNA kolor niebieski. Pozycje promotorów pokazano za pomocą czarnej strzałki. RNA przedstawiono jako skręconą nić w kolorze czerwonym dla toksyny i zielonym dla antytoksyny. Aktywne cząsteczki toksyn, które zostały uwolnione spod kontroli antytoksyn oznaczone są trupa czaszką. Cel toksyny systemu TA typu IV przedstawiono postaci fioletowego trójkąta. Proteazę odpowiedzialną za degradowanie toksyny systemu TA typu VI przedstawiono postaci różowego oligomeru. (A) Moduł TA typu I, (B) Moduł TA typu II, (C) Moduł TA typu III, (D) Moduł TA typu IV, (E) Moduł TA typu V, (F) Moduł TA typu VI.

## 2.2 Funkcje komórkowe systemów TA

Systemy TA zidentyfikowano w pierwszej kolejności na plazmidach, a w późniejszym czasie na chromosomach. Operony TA powszechnie kodowane są przez genomy większości gatunków bakterii, często w wielu kopiach np. *Escherichia coli* (Ryc. 2) i nie posiadają eukariotycznych homologów o porównywalnych funkcjach. Mogą one być również zlokalizowane na innych ruchomych elementach genetycznych, w tym profagach, transpozonach lub superintegronach (Fozo i wsp., 2010; Leplae i wsp., 2011; Makarova i wsp., 2009; Pandey i Gerdes, 2005; Rowe-Magnus i wsp., 2003; Szekeres i wsp., 2007). W tych miejscach moduły TA mogą zapewnić stabilne utrzymanie egzogenego DNA podczas podziału komórki. Komórki potomne, które nie dziedziczą tych elementów, są eliminowane z

populacji bakterii przez działanie uwolnionej toksyny, która pozostaje w cytoplazmie nowo powstałych komórek. Antytoksyna, która jest mniej stabilnym elementem systemu jest usuwana z komórek potomnych i nie może zostać uzupełniona z powodu utraty elementu genetycznego, który przenosi geny systemu TA. Ruchome elementy genetyczne kodujące systemy TA wraz z genami oporności na antybiotyki oraz genami determinującymi wirulentność bakterii, odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu i rozpowszechnianiu wśród ludzkich patogenów oporności na antybiotyki i ich zjadliwości. (Hayes, 2003; Moritz i Hergenrother, 2007). Z drugiej strony, coraz więcej doniesień literaturowych mówi o tym, że większość systemów TA przede wszystkim działa jako czynniki regulujące odpowiedź na stres środowiskowy. Dlatego systemy TA są szczególnie korzystne dla bakterii żyjących w dynamicznie zmieniających się warunkach środowiskowych. Wszechstronne analizy mikrobiologiczne genomów ujawniły, że liczba loci TA u prokariotów wolno żyjących jest znacznie większa niż w obligatoryjnych pasożytach wewnątrzkomórkowych, które są praktycznie pozbawione systemów TA (Pandey i Gerdes, 2005). Ta obserwacja jest zgodna z hipotezą, że systemy TA pomagają bakteriom radzić sobie z różnymi zewnętrznymi czynnikami stresowymi, poprzez spowolnienie metabolizmu komórki, inicjowanie zatrzymania cyklu komórkowego lub nawet pośredniczenie w altruistycznej zaprogramowanej śmierci komórki (Buts i wsp., 2005; Engelberg-Kulka i wsp., 2005; Gerdes i wsp., 2005). Rola poszczególnych systemów TA może polegać na reagowaniu na różne rodzaje czynników stresowych, chociaż niektóre systemy mogą mieć te same funkcje. Na przykład, badania nad *Pseudomonas putida*, wyizolowanym z różnych środowisk, sugerują występowanie określonych systemów TA w szczepach klinicznych oraz innej grupy systemów TA w szczepach wolnożyjących (Molina i wsp., 2016). Inne porównawcze analizy genomów wskazują, że patogenne gatunki bakterii mogą kodować znacznie więcej modułów TA niż gatunki niepatogenne. W tym przypadku systemy TA mogą działać jako mechanizm obronny, który jest aktywowany, gdy patogeny są atakowane przez układ odpornościowy gospodarza (Georgiades, 2012; Georgiades i Raoult, 2011). Jednak brak systemów TA w niektórych szczepach patogennych a obecność w niepatogennych gatunkach *Rickettsia* nie potwierdza tej teorii (Gillespie i wsp., 2014). Z tego powodu sugeruje się, że liczba loci systemów TA może być specyficzna gatunkowo a nie odzwierciedlać korelacje pomiędzy środowiskiem występowania i wirulentnością. Niemniej jednak coraz więcej dowodów wskazuje, że liczne systemy TA mogą bezpośrednio mieć wpływ na patogenność wielu gatunków bakterii, przez zwiększenie wirulentności, tworzenie komórek spoczynkowych, lub formowanie biofilmu (Kędzierska i Hayes, 2016a).



**Rycina 2. Systemy TA *Escherichia coli* K-12 MG1655.** Mapa chromosomu bakterii *E. coli* K-12 MG1655 z zaznaczonymi zidentyfikowanymi loci systemów TA. Kolorem pomarańczowym zaznaczono systemy typu I, kolorem fioletowym systemy typu II, kolorem zielonym systemy typu IV, kolorem różowym systemy typu V, oraz kolorem szarym system nieprzypisany do żadnego z obecnie znanych typów.

### 2.2.1 Posegregacyjna śmierć komórki PSK

Systemy TA typu I i II zostały początkowo odkryte na plazmidach, jako „czynniki uzależnienia” (ang. addiction modules), które mogłyby zapobiec utracie plazmidów z kultur bakteryjnych poprzez mechanizm znany jako PSK (Ryc. 3A). Dobrze scharakteryzowane przykłady obejmują *hok/sok* plazmidu R1 (typ I) i *ccdAB* plazmidu F (typ II), które zidentyfikowano w komórkach *E. coli* (Gerdes i wsp., 1986; Ogura i Hiraga, 1983). PSK opiera się na różnicy stabilności toksyny i antytoksyny. Stabilne cząsteczki toksyny oddziałują ze swoim celem komórkowym hamując rozwój komórek potomnych, które utraciły plazmid. Komórki takie nie są zdolne do uzupełnienia poziomu labilnej antytoksyny z powodu braku elementu genetycznego kodującego system TA. W efekcie oddziaływanie toksyny ze swoim celem komórkowym prowadzi do jej śmierci (Jensen i wsp., 1995; Van Melderen i wsp., 1994). Oprócz *hok/sok* i *ccdAB*, dobrze zbadano loci systemów PSK TA typu II *parDE* plazmidu RK2 i *kis/kid* (znany również jako *pemIK*, homologiczny do *mazEF*) plazmidu R1 (Roberts i wsp., 1994; Tsuchimoto i wsp., 1988). Poznano również kilka loci systemów TA typu III i locus TA IV *abiEi/ii*. Wykazano, że wszystkie one stabilizują plazmidy i inne modelowe mobilne elementy genetyczne (Dy i wsp., 2014a; Rao i wsp., 2015;

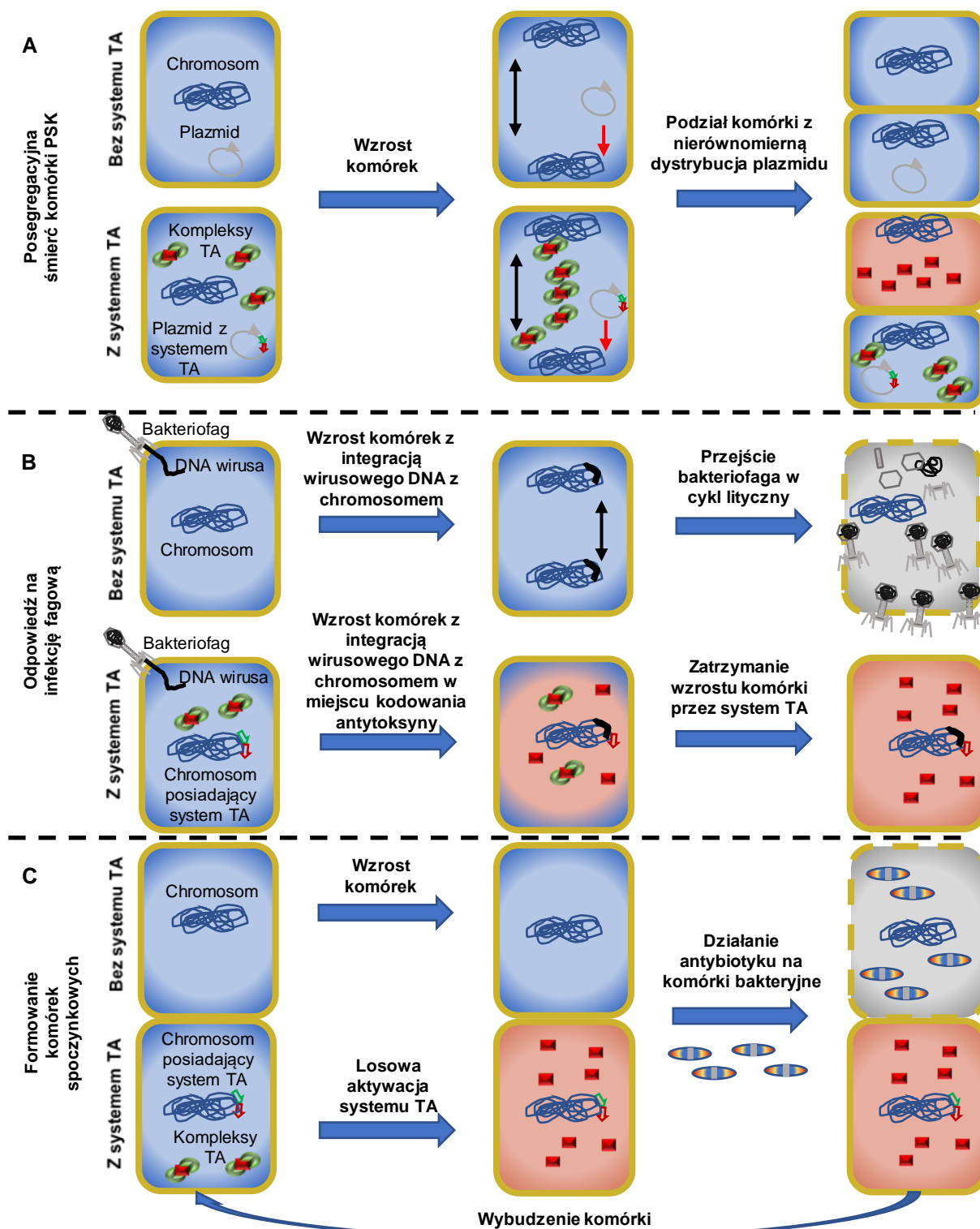
Short i wsp., 2013). Systemy PSK nie są ograniczone tylko do plazmidów, ale działają również w celu ustabilizowania superintegronów oraz innych niestabilnych regionów na chromosomach bakteryjnych (Szekeres i wsp., 2007; Wozniak i Waldor, 2009).

### **2.2.2 Odpowiedź na infekcję fagową**

Odpowiedź na infekcję fagową jest mechanizmem wrodzonej odporności bakteryjnej, który upośledza namnażanie bakteriofagów w populacji bakterii. Taką odpowiedzią jest altruistyczne samobójstwo zainfekowanych komórek, poprzez np. aktywację systemu TA przed replikacją faga (Dy i wsp., 2014b) (Ryc. 3B). Stwierdzono, że obecność systemu *rnlAB* typu II w *E. coli* K-12 przerywa infekcję bakteriofaga T4 (Koga i wsp., 2011). Również system TA typu II *mazEF*, a także *hok/sok* typu I plazmidu R1 w znaczącym stopniu obniżają zdolność faga T4 do namnażania w komórkach gospodarza (Pecota i Wood, 1996; Shaqiat Alawneh, 2016). Analogicznie, system TA typu IV *abiEi/ii* i podobny do niego system *sanaTA* okazały się również potencjalnymi systemami odporności na infekcję fagową (Dy i wsp., 2014a; Sberro i wsp., 2013). Przerwanie infekcji fagowej wydaje się również być podstawową funkcją biologiczną systemów TA typu III, należących do rodzin *toxIN* i *tenpIN*. Bakteriofagi zdolne do infekcji szerokiego spektrum bakterii, w tym *Lactococcus lactis*, *Photorhabdus luminescens* i *E. coli*, nie są w stanie się wydajnie namnażać w komórkach gospodarza posiadających systemy należące do rodzin *toxIN* i *tenpIN* (Goeders i wsp., 2016). Co ciekawe, bakteriofagi posiadają wiele mechanizmów przeciwdziałających odpowiedzi na infekcję, powodujących zakłócanie aktywacji systemu TA. Na przykład bakteriofag T4 koduje dwa kluczowe białka, antytoksynę, która może hamować działanie kilku toksyn z rodziny RnlA i rybozylotransferazę ADP Alt, która hamuje toksynę typu II MazF z *E. coli* (Otsuka i Yonesaki, 2012; Shaqiat Alawneh, 2016). Bakteriofagi również często przenoszą specyficzne inhibitory proteaz, które mogą zakłócać degradację białkowych antytoksyn, a tym samym upośledzają działanie systemów TA typu II lub typu IV. (Sberro i wsp., 2013).

### **2.2.3 Formowanie komórek spoczynkowych**

Komórki spoczynkowe stanowią subpopulację komórek w populacji bakterii. Wykazują one zwiększoną tolerancję na antybiotyki i inne czynniki środowiskowe oraz warunki stresowe. Jest to spowodowane przejściem fenotypu w stan uśpienia, w którym to większość procesów zakłócanych przez stres środowiskowy czy antybiotyki jest nieaktywna (Harms i wsp., 2016; Page i Peti, 2016) (Ryc. 3C). Komórkowa wieloczynnikowa indukcja lub zmiana fenotypu subpopulacji w odpowiedzi na różne rodzaje stresu albo ekspozycja na działanie



**Rycina 3. Funkcje biologiczne systemów TA.** Na rycinie przedstawiono zasady leżące u podstaw działania modułów TA i ich funkcje biologiczne. Każdy schemat porównuje los komórki bakteryjnej bez (panel górny) i z modułem TA (panel dolny), który działa w odpowiednim kontekście biologicznym: **(A)** Posegregacyjna śmierć komórki PSK, **(B)** Odpowiedź na infekcję fagową, **(C)** Formowanie komórek spoczynkowych. Geny/białka toksyn zaznaczono kolorem czerwonym, a antytoksyn zielonym. Zablokowanie funkcjonowania komórki poprzez działanie toksyny systemu TA jest oznaczone przez pomarańczowe zabarwienie cytoplazmy. Należy zauważyć, że aktywacja modułu TA powoduje śmierć komórek w przypadku PSK i odpowiedzi na infekcję fagową, ale daje możliwość odwrócenia stanu spoczynkowego. Szare zabarwienie cytoplazmy wskazuje komórki, które zostały zabite w skutek działania innego czynnika, niż aktywność toksyny systemu TA, np. liza komórki spowodowana uwolnieniem faga lub obecnością antybiotyków.



antybiotyków, została już wcześniej opisana (Kotte i wsp., 2014). Ponadto w formowaniu komórek spoczynkowych występuje czynnik losowy, który powoduje fenotypową heterogeniczność populacji bakteryjnej. Jest to tak zwane „zmniejszenie ryzyka”, promujące przetrwanie w dynamicznie zmieniającym się środowisku (Veening i wsp., 2008). Za tworzenie komórek spoczynkowych i przejście w stan uśpienia odpowiada kilka ścieżek sygnałowych. Dlatego można założyć, że aktywacja systemu TA służy jako taki czynnik i indukuje zmiany fenotypowe, poprzez hamowanie ważnych procesów komórkowych, co wprowadza komórki w stan podobny do spoczynkowego. Efekt ten jest łatwo odtwarzalny w laboratorium po indukcji ekspresji toksyn systemów TA typu I (np. TisB i HokB) lub typu II (np. endonukleazy HipA lub mRNA, takie jak RelE i MazF) w komórce gospodarza (Bendtsen i wsp., 2016; Dörr i wsp., 2009; Keren i wsp., 2004; Maisonneuve i wsp., 2011; Pedersen i wsp., 2002; Verstraeten i wsp., 2015). Kilka niezależnych badań jednoznacznie wykazało, że ekspresja genów systemów TA jest silnie indukowana w wyizolowanych komórkach spoczynkowych *E. coli* K-12 (Keren i wsp., 2004; Keren i wsp., 2011; Shah i wsp., 2006). Wykazano również, że szczep *E. coli* z mutacją *hipA7* jest zdolny do formowania znacznie większej liczby komórek spoczynkowych. Jest to spowodowane dwiema mutacjami w toksynie HipA, które zwiększają podstawowy poziom aktywności toksyny względem celu komórkowego (Moyed i Bertrand, 1983; Schumacher i wsp., 2009). Ostatnie prace wykazały również, że aktywacja *hokB/sokB* i *tisB/istR-1*, w odpowiedzi na konkretny sygnał, powoduje powstawanie komórek spoczynkowych *E. coli* poprzez depolaryzację błony komórkowej wywołanej działaniem ich toksyn (Dörr i wsp., 2010; Verstraeten i wsp., 2015). Natomiast inaktywacja systemów TA typu II, takich jak *hipBA*, *relBE* oraz *mqsRA* powoduje zmniejszenie tworzenia komórek spoczynkowych i spadek przeżywalność *E. coli* K-12 w różnych warunkach stresowych (Harrison i wsp., 2009; Keren i wsp., 2004; Wu i wsp., 2015). Ważną rolę systemów TA typu II w tworzeniu tolerancji na antybiotykoterapię pokazano wykonując testy *in vivo*, wykorzystując patogeny układu moczowego zwierząt: *E. coli* i *Salmonella enterica* Typhimurium (Helaine i wsp., 2014; Norton i Mulvey, 2012).

### **2.3 Cele komórkowe toksyn**

Wewnątrzkomórkowe cele toksyn systemów TA są zróżnicowane. Aktywacja systemów TA może hamować i zaburzać różne procesy komórkowe, między innymi: replikację, translację, fosforylację i homeostazę. Ze względu na typ systemu TA można wskazać główny cel toksyn,

jednak nie jest to regułą i pośród toksyn jednego typu możemy wyróżnić kilka celów komórkowych.

### 2.3.1 Cele komórkowe toksyn systemów TA typu II

Wiele toksyn typu II posiada aktywność trawienia specyficznych sekwencji RNA (endorybonukleazy), co powoduje zmniejszenie syntezy białek i spowolnienie metabolizmu w odpowiedzi na stres lub bodźce pokarmowe. Sygnały te obejmują na przykład głód aminokwasowy, stres oksydacyjny i ekspozycję na antybiotyki, które hamują transkrypcję lub translację. W zależności od toksyny celem może być wolny mRNA lub mRNA związany z rybosomem (Cook i wsp., 2013; Hayes i Van Melderen, 2011).

System TA *mazEF* jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych i dobrze scharakteryzowanych systemów typu II. Toksyna MazF z *E. coli* specyficznie trawi RNA o sekwencji 5'-ACA-3' w transkryptach mRNA. Aktywność toksyny MezF jest niezależna od rybosomu jak i translacji, i jest hamowana przez antytoksynę MazE (Muñoz-Gómez i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2003). Homologi MazF kodowane przez inne gatunki bakterii rozpoznają specyficzne sekwencje różniące się zarówno od MezF z *E. coli*, jak i od siebie nawzajem. Na przykład, *Mycobacterium tuberculosis* posiada na chromosomie aż dziesięć homologów MazF rozpoznających różne motywy w mRNA (Sala i wsp., 2013; Schifano i wsp., 2016). Co więcej, niektóre toksyny MazF posiadają zdolność trawienia zarówno 16S i 23S rRNA oraz tRNA (Schifano i wsp., 2016). Specyficzna aktywność homologów MazF i innych toksyn o aktywności endorybonukleaz może powodować powstawanie w komórce określonej puli RNA w odpowiedzi na czynniki stresowe (Moll i Engelberg-Kulka, 2012).

Podobnie jak MazF, toksyna RelE typu II z *E. coli* jest endorybonukleazą specyficzną względem sekwencji RNA, a jej aktywność hamowana jest przez antytoksynę RelB (Christensen i Gerdes, 2003a). Homologi MazF i RelE należą do dwóch odrębnych ewolucyjnie rodzin. W przeciwieństwie do MazF, cięcie mRNA przez RelE z *E. coli* jest zależne od rybosomu, chociaż nie wszystkie homologi RelE wykazują taką zależność (Christensen i Gerdes, 2003a). Podobnie jak w przypadku rodziny MezF, homologi RelE rozpoznają różne sekwencje RNA (Goeders i wsp., 2013). Inne rodziny toksyn, w tym grupa VapC, również posiadają specyficzną względem rozpoznawanej sekwencji aktywność endorybonukleolityczną (Arcus i wsp., 2010). Jednak nie wszystkie toksyny typu II trawią RNA. Zamiast tego niektóre toksyny zmniejszają syntezę białek poprzez hamowanie translacji bez degradacji mRNA. Na przykład, toksyna HipA hamuje syntezę białek przez

fosforylację syntetazy glutamyl-tRNA, podczas gdy toksyna Doc poprzez fosforylację EF-Tu zaburza elongację translacji (Castro-Roa i wsp., 2013; Cruz i wsp., 2014; Germain i wsp., 2013). Ponadto inne toksyny typu II zakłócają działanie topoiizomeraz, które są kluczowe w utrzymaniu topologii chromosomu (ParE i CcdB), mogą również zakłócić biosyntezę ściany komórkowej (PezT) lub zakłócać replikację DNA (SocB) (Aakre i wsp., 2013; Bernard i Couturier, 1992; Mutschler i wsp., 2011).

### **2.3.2 Cele komórkowe toksyn pozostałych typów**

Najlepiej poznano funkcje toksyn systemów typu II. Obecnie ukazuje się jednak coraz więcej informacji na temat działania toksyn pozostałych typów. Głównym celem toksyn typu I jest błona komórkowa, ale wśród toksyn tego typu opisano również takie, które biorą udział w trawieniu DNA lub RNA (Brielle i wsp., 2016). Toksyna Hok typu I poprzez uszkodzenie błony komórkowej powoduje destabilizację funkcjonowania komórki bakteryjnej (Kawano, 2012). Niespokrewniona z nią toksyna Fst podobnie zaburza integralność błony komórkowej, a także spowalnia segregację chromosomów i podział komórek (Brinkman i wsp., 2013). Natomiast toksyna BsrG typu I nie narusza błony komórkowej, ale zamiast tego zakłóca biosyntezę ściany komórkowej (Jahn i wsp., 2015). W przypadku systemu *toxIN* i podobnych systemów typu III znany był wpływ aktywacji systemu na funkcjonowanie komórki, jednak wewnątrzkomórkowy cel endorybonukleazy ToxN przez długi czas pozostawał nieznanym (Rao i wsp., 2015). Dopiero ostatnie badania przybliżają dokładne funkcjonowanie toksyny ToxN (Short i wsp., 2018). Toksyna CbtA typu IV wiąże się i zakłóca polimeryzację białek cytoszkieletu MreB i FtsZ, które są zaangażowane w utrzymanie kształtu komórki oraz biorą udział w procesie podziału komórkowego. Antytoksyna CbeA nie oddziałuje bezpośrednio z toksyną CbtA, ale zamiast tego hamuje toksyczość poprzez stabilizację MreB i FtsZ (Tan i wsp., 2011). W najlepiej zdefiniowanym systemie TA typu V toksyna GhoT jest białkiem zaangażowanym w destabilizację błony komórkowej, prowadzącej do lizy komórki. Antytoksyna GhoS jest rybonukleazą, która degraduje mRNA transkryptu toksyny i w ten sposób wyłącza syntezę GhoT (Wang i wsp., 2012). Zaś toksyna SocB systemu *socAB* typu VI jest odpowiedzialna za zatrzymanie elongacji replikacji przez bezpośrednie oddziaływanie z  $\beta$ -pierścieniem. Sprzężona antytoksyna SocA pozwala na rozpoznanie toksyny SocB przez proteazę ClpXP i jej wydajną degradację (Aakre i wsp., 2013).

## 2.4 Aktywacja systemów TA

Właściwe działanie systemów TA w komórkach gospodarza wydaje się kluczowym czynnikiem zapewniającym możliwość przetrwania w niekorzystnych warunkach. Dlatego aktywacja poszczególnych systemów musi być dokładnie kontrolowana i przebiegać w ściśle określonych sposób. Poniżej przedstawiono dwie podstawowe strategie kontroli aktywacji systemów TA.

### 2.4.1 Regulacja działania systemów TA poprzez transkrypcję

Doskonałym przykładem integracji działania systemów TA z komórkowymi ścieżkami sygnałowymi jest odpowiedź SOS. Jest to transkrypcyjny program indukowany przez jednoniciowy DNA, oparty na stopniowej inaktywacji represora LexA przez rosnący poziom uszkodzenia DNA (Baharoglu i Mazel, 2014). Sześć systemów TA z *E. coli* K-12 w sekwencji swoich promotorów posiada miejsca wiązania LexA: *tisB/istR-1*, *dinQ/agrB*, *symE/symR* i *hokE/sokE* typu I i systemy TA *dinJ/yafQ* i *yafNO* typu II (Berghoff i Wagner, 2017; Dörr i wsp., 2010). Dla loci TA typu II, miejsca wiązania LexA są umieszczone przed operonem, dzięki czemu zarówno gen toksyny i gen antytoksyny mogą być ponownie eksprymowane wraz ze wrastającą ilością uszkodzonego DNA. Aby doszło do uwolnienia toksyny, niezbędne są dodatkowe mechanizmy wymuszające degradację antytoksyny. Kontrolowanie aktywności systemów TA typu II przez sygnalizację SOS i możliwa rola biologiczna tej kontroli nie została dokładnie zbadana. Natomiast wykazano, iż szeroki zakres warunków stresowych, takich jak zakwaszenie środowiska oraz głód glukozowy lub aminokwasowy może specyficznie indukować transkrypcję różnych loci systemów TA typu II w *E. coli* K-12 (Christensen-Dalsgaard i wsp., 2010; Shan i wsp., 2017). Pokazano, że indukcja transkrypcji tych loci jest często konsekwencją degradacji antytoksyn. Wyniki te mogą sugerować zależną od stresu aktywację systemów przez proteazy komórkowe, które degradują konkretne zestawy antytoksyn. Na przykład antytoksyna MqsA jest zwykle stabilnym białkiem, ale szybko ulega degradacji przez proteazę Lon w warunkach stresu oksydacyjnego (Wang i wsp., 2011).

W przypadku systemów TA typu I, represor LexA kontroluje transkrypcję tylko genu toksyny. Szereg badań wykazał, że bliski śmiertelnemu poziom uszkodzeń DNA indukuje powstanie komórek spoczynkowych w odpowiedzi na sygnał SOS, w następstwie selektywnego indukowania transkrypcji toksyny TisB (Dörr i wsp., 2009; Dörr i wsp., 2010). Podobnie, toksyna DinQ jest również aktywowana przez sygnał SOS i w pewnych

okolicznościach może przyczynić się do formowania komórek spoczynkowych (Berghoff i Wagner, 2017).

W *E. coli* K-12 oprócz sygnalizacji SOS, również sygnalizacja za pośrednictwem alarmonu cztero- i pięciofosforan guanozyny, łącznie określane mianem (p)ppGpp, może kontrolować nie tylko aktywację systemów TA typu II, ale także systemu *hokB/sokB* typu I. U *E. coli* i innych beta- i gamma-proteobacterii (p)ppGpp są syntetyzowane przez białka RelA i SpoT, w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe. Niedawno odkryto, że podobnie jak w przypadku indukcji *tisB* przez odpowiedź SOS, transkrypcja *hokB* jest indukowana przez sygnalizację (p)ppGpp w sposób zależny od powiązanej z rybosomem hydrolazy guanozyno-5'-trójfosforanu (GTPaza) Obg (Verstraeten i wsp., 2015). Ta indukcja transkrypcji *hokB* przechyła równowagę kontroli translacji systemu TA typu I w kierunku toksyny, a w konsekwencji skutkuje formowaniem komórek spoczynkowych poprzez depolaryzację błony (Verstraeten i wsp., 2015).

#### **2.4.2 Autoregulacja transkrypcji systemów TA typu II**

Autoregulacja transkrypcji jest szczególnie rozpowszechniona wśród systemów TA typu II i jest intensywnie badana. Istnieje kilka zasad regulujących transkrypcję tych systemów, które wspierają ich biologiczne funkcjonowanie poprzez kontrolowanie, kiedy, jak intensywnie i jak długo są indukowane. Ekspresja genów operonu systemu TA typu II zazwyczaj następuje z pojedynczego promotora znajdującego się przed genami toksyny i antytoksyny. Bardzo często represja promotora następuje poprzez wiązanie się antytoksyny bądź kompleksu toksyna-antytoksyna do operatora (Page i Peti, 2016).

Najbardziej powszechny sposób autoregulacji wśród dobrze zbadanych systemów TA typu II jest znany jako „regulacja warunkowa” (ang. conditional cooperativity) (Afif i wsp., 2001; Garcia-Pino i wsp., 2010; Overgaard i wsp., 2008). Podstawą regulacji warunkowej jest stosunek stechiometryczny toksyny:antytoksyny (T:A) w kompleksie. Toksyna w takim kompleksie, przy niskich stężeniach, działa jako korepresor  $T < A$  (promowanie kooperatywnej autorepresji). Natomiast gdy stężenie toksyny wzrasta i stosunek wyrównuje się bądź stężenie toksyny jest wyższe od antytoksyny  $T \geq A$  toksyna działa jako anty-represor (poprzez zakłócanie autorepresji). Na poziomie molekularnym regulacja warunkowa jest osiągnięta poprzez formowanie kompleksów T:A o różnej stechiometrii i zarazem o różnym powinowactwie względem rozpoznawanego operatora. Przykład takiej kooperacji opisano dla systemu TA z *E. coli relBE* (Bøggild i wsp., 2012; Overgaard i wsp., 2008). Innymi

przykładami regulacji warunkowej są systemy TA typu II *ccdAB*, *kis/kid* lub *phd/doc* (Afif i wsp., 2001; Garcia-Pino i wsp., 2010; Monti i wsp., 2007), jednak podstawowe mechanizmy molekularne autoregulacji wykazują znaczące różnice, wskazujące na to, iż sposób regulacji ulegał ewolucji wiele razy, niezależnie dla danego systemu (Loris i Garcia-Pino, 2014; Page i Peti, 2016).

Trudno jest bezpośrednio odnieść się do biologicznych funkcji regulacji warunkowej, ale modelowanie matematyczne podparte wynikami badań biochemicznych i struktura kompleksów TA pozwalają postulować o ich znaczeniu dla komórki gospodarza. Na przykład silna represja obserwowana przy niskim współczynniku  $T < A$  gwarantuje niski poziom ekspresji locus TA w normalnych warunkach wzrostu i oszczędność energii (Gelens i wsp., 2013). Wówczas toksyna ulega sekwestracji w kompleksie TA i jest nieaktywna (Cataudella i wsp., 2013). W takiej sytuacji w komórce wciąż może znajdować się duża ilość toksyny i w odpowiedzi na PSK lub warunki stresowe takie jak głód, może zostać aktywowana natychmiast. Ta funkcja nie ogranicza się do systemów działających na podstawie schematu regulacji warunkowej, ale mogą wykazywać ją również inne systemy TA, których transkrypcja ulega automatycznej auto represji niezależnie od stosunku T:A (Feng i wsp., 2014; Lou i wsp., 2008). Warunkowa regulacja ma możliwość niwelowania reakcji na chwilowe zmiany wynikające z metabolizmu komórki lub fazy cyklu komórkowego, tak zwany „hałas komórkowy” (ang. cellular noise). Kiedy stosunek T:A wzrasta co spowodowane jest przez niespecyficzny sygnał np. spadek ilości antytoksyny spowodowany podziałem komórkowym, następuje antyrepresja transkrypcji. Ponieważ podczas translacji transkryptu TA powstaje głównie antytoksyna, w komórce powstaje nadmiar antytoksyny (Li i wsp., 2014). Podwyższona transkrypcja zmniejsza wówczas współczynnik T:A i przywraca represję. W taki sposób regulacja warunkowa odpowiada na przypadkową aktywację systemu TA (Cataudella i wsp., 2012). Przełączanie między represją i antyrepresją transkrypcji systemu TA, kontrolowanego przez regulację warunkową, jest szczególnie wrażliwe, kiedy promotor zawiera kilka sekwencji operatorowych (Vandervelde i wsp., 2017). Ponadto, regulacja warunkowa tworzy granicę między niskim i wysokim współczynnikiem T:A i stabilizuje stan wzrostu, albo uśpienia komórek bakteryjnych i poniekąd wyjaśnia „zero-jedynkowe” przejście pomiędzy aktywacją, lub uśpieniem systemów TA (Cataudella i wsp., 2013). Przejście w stan dominacji toksyny, z bardzo wysoką proporcją  $T > A$ , może być spowodowane przez degradację antytoksyny, w odpowiedzi na specyficzną sygnalizację komórkową, indukowaną przez konkretne bodźce. Może być również wywołane losową

aktywacją systemu podlegającą strategii zmniejszonego ryzyka. (Cataudella i wsp., 2013; Gelens i wsp., 2013; Tian i wsp., 2017). Degradacja antytoksyny powoduje wzrost stosunku T:A, co powoduje formowanie komórek spoczynkowych. Jest to spowodowane wzrostem transkrypcji locus TA i szybkim nagromadzeniu się stabilnej toksyny. Natomiast kiedy degradacja antytoksyny ustaje, silna ekspresja locus TA jest utrzymywana, czego wynikiem jest zwiększenie ilości cząsteczek antytoksyny, które dezaktywują wolne toksyny i przywracają represję transkrypcji (Cataudella i wsp., 2012). W związku z tym regulacja warunkowa może również wspierać wybudzanie komórek spoczynkowych.

Co ciekawe wykazano, iż kilka antytoksyn może być czynnikiem regulatorowym transkrypcji poza swoimi loci. Takie geny mogłyby być ekspresowane również w odpowiedzi na degradację antytoksyny. Przykładem tego zjawiska są antytoksyny HipB i MqsA z *E. coli*, które kontrolują odpowiednio ekspresję regulatorów, wliczając w to geny syntetazy (p)ppGpp *relA* i główny czynnik odpowiedzi na stres  $\sigma$  *rpoS*. (Lin i wsp., 2013; Soo i Wood, 2013). Biologiczne konsekwencje tego zjawiska nie są dobrze poznane, ale jasne jest, że szersza regulacja transkrypcji przez antytoksyny systemów TA typu II może ściśle sprzęgać aktywację samych systemów z innymi ścieżkami sygnalizacji stresu komórkowego.

### **2.4.3 Bezpośrednie kontrolowanie toksyny przez sprzężoną antytoksynę**

Bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy toksyną i antytoksyną jest centralnym mechanizmem kontroli aktywności toksyn dla systemów TA typu II i III, które kodują antytoksyny działające odpowiednio jako białko lub RNA (Ryc. 1B, 1C). Co ciekawe, chociaż antytoksyny RNA z różnych systemów TA typu I lub III tworzą raczej podobne struktury (Goeders i wsp., 2016; Wen i Fozo, 2014), to białkowe antytoksyny typu II wykorzystują różne motywy strukturalne, jak też sposoby wiązania do sprzężonych toksyn, w celu zahamowania ich aktywności. Na przykład antytoksyny sprzężone z toksynami należącymi do rodziny endorybonukleaz RelE z *E. coli* K-12 należą do pięciu różnych podrodzin (Anantharaman i Aravind, 2003; Brown i wsp., 2009; Leplae i wsp., 2011). Ewolucja pomiędzy toksynami i sprzężonymi z nimi antytoksynami należącymi do systemów typu II, doprowadziła do powstania funkcjonalnych modułów TA, gdzie pośród jednej rodziny toksyn możemy wyróżnić kilka rodzin antytoksyn i na odwrót. Jednak efekt tego zjawiska na biologię systemów TA nie został dokładnie zbadany. Można jednak przypuszczać, że zapobiega to niespecyficznemu oddziaływaniu toksyn, z niesprzężonymi antytoksynami należącymi do tego samego typu systemów (Arbing i wsp., 2010; Guglielmini i Van Melderen, 2011).

#### 2.4.4 Aktywacja systemów TA typu II przez proteolizę antytoksyny

Antytoksyny typu II zazwyczaj składają się z dwóch oddzielnych domen: N-końcowej domeny wiążącej DNA, krytycznej dla autoregulacji transkrypcji i domeny C-końcowej bezpośrednio wiążącej i dezaktywującej toksynę (Chan i wsp., 2016; Goeders i Van Melderren, 2014). Często obserwowane kluczowe zasady tej bezpośredniej inaktywacji, polegają na bezpośrednim oddziaływaniu antytoksyn z miejscem katalitycznym toksyny (np. dla RelBE, MazEF oraz VapBC z *E. coli* (Bøggild i wsp., 2012; Dienemann i wsp., 2011; Kamada i wsp., 2003; Takagi i wsp., 2005) albo na sterycznej blokadzie dostępu do substratu (np. dla CcdAB; (De Jonge i wsp., 2009).

Aktywacja systemów TA typu II jest wyzwalana przez proteazy komórkowe, które degradują antytoksyny. Doprowadza to do fizycznego uwolnienia toksyn i tym samym ich aktywacji. Poza uwolnieniem toksyn, które były związane z antytoksynami, dochodzi też do zwiększenia ekspresji locus TA, z powodu utraty negatywnej autoregulacji transkrypcji. Powoduje to jeszcze większe nagromadzenie się cząsteczek toksyny w komórce. W *E. coli* większość antytoksyn jest degradowanych przez proteazę Lon, podczas gdy niektóre są degradowane przez proteazę ClpP przy współudziale białek opiekuńczych ClpA lub ClpX. W takim przypadku proteoliza może zapewniać pierwszy poziom regulacji (Muthuramalingam i wsp., 2016). Antytoksyny typu II mogą być celem tych proteaz ze względu na niestabilność struktury w C-końcowych domenach. Antytoksyny w *E. coli* K-12 mają raczej krótki okres półtrwania pomiędzy 5-15 minut, co umożliwia szybką odpowiedź na zmieniające się warunki komórkowe (Goeders i Van Melderren, 2014). Ta różnica w stabilności pomiędzy toksynami i antytoksynami jest krytyczna dla biologicznej aktywacji wszystkich systemów TA, ale w szczególności dla tych, które wywołują śmierć komórki w trakcie PSK i odpowiedzi na infekcję fagową (Jensen i Gerdes, 1995; Van Melderren i wsp., 1994). Aktywację systemu TA typu II, biorącego udział w odpowiedzi na infekcję fagową, badano głównie za pomocą systemu modelowego z *E. coli* K-12 *rnlAB*. W systemie tym toksyna RnlA jest niespecyficzną endorybonukleazą, która hamuje namnażanie faga poprzez degradację mRNA jego transkryptów (Koga i wsp., 2011). Podobnie jak w przypadku PSK, czas połowicznej degradacji antytoksyny RnlB wynosi tylko kilka minut, a zatem jest ponad dziesięć razy krótszy niż okres półtrwania toksyny RnlA. Infekcja fagiem T4 doprowadza do wyłączenia ekspresji genów systemu TA co skutkuje degradacją antytoksyny RnlB, a w konsekwencji aktywacją RnlA (Koga i wsp., 2011).



Systemy TA typu II biorące udział w formowaniu komórek spoczynkowych są zwykle połączone z działaniem sygnałów komórkowych zwiększających aktywność proteaz degradujących antytoksyny. Pokazano, że kilka loci systemów TA na chromosomie *E. coli* K-12 jest ważnych dla formowania komórek spoczynkowych w określonych warunkach. Dla przykładu mutant *yafQ* wykazywał znaczny poziom upośledzenia w tworzeniu komórek spoczynkowych w trakcie formowania biofilmu, a w mutantach *hipBA* i *relBE* wykazano zmniejszenie powstawania komórek spoczynkowych w fazie stacjonarnej wzrostu (Harrison i wsp., 2009; Keren i wsp., 2004). W *Salmonella enterica* Typhimurium, powstanie komórek spoczynkowych zależnych od systemu TA typu II jest indukowane podczas fagocytozy przez makrofagi. Zakwaszenie wnętrza wakuoli i wprowadzenie warunków głodu, indukuje ścieżkę sygnalizacji zależnej od (p)ppGpp (Helaine i wsp., 2014). Zaproponowano również, że oprócz indywidualnych loci, całe zestawy chromosomalnych systemów TA typu II z *E. coli* K-12, posiadające toksyny o aktywności rybonukleaz, mogą odpowiadać za pośredniczenie w formowaniu komórek spoczynkowych, w odpowiedzi na sygnał przenoszony przez (p)ppGpp). W konsekwencji powoduje to aktywację proteazy Lon i zwiększenie proteolizy antytoksyn (Maisonneuve i Gerdes, 2014). Mimo przedstawionych badań pojawiają się opinie, że wkład systemów TA w formowanie komórek spoczynkowych *E. coli* K-12 w warunkach braku stresu środowiskowego nie jest do końca pewny (Harms i wsp., 2017).

## 2.5 System TA *parDE* plazmidu RK2

RK2 to plazmid o szerokim spektrum gospodarza, kodujący w swojej ~60 kbp sekwencji trzy oporności na antybiotyki: ampicylinę, tetracyklinę i kanamycynę. Ma zdolność replikacji i stabilnego utrzymywania się u wielu daleko spokrewnionych gatunków bakterii (Pansegrau i Lanka, 1996; Thomas i Helinski, 1989). Badania nad RK2 wykazały, że oprócz genów, które zapewniają regulację procesów, takich jak inicjacja replikacji, ekspresja genu *rep*, rozdzielanie multimeru plazmidowego (ang. plasmid multimer resolution-mrs) i kontrola partycji plazmidu podczas podziału komórkowego (Karlołowicz i wsp., 2016; Sobecky i wsp., 1996; Thomas i wsp., 1980), RK2 posiada również locus *parDE*, który umożliwia jego stabilne utrzymanie w komórkach gospodarza (Roberts i wsp., 1990). Dalsze badania potwierdziły, że sekwencja ta koduje geny systemu toksyna-antytoksyna typu II, gdzie ParD jest antytoksyną a ParE to toksyna (Johnson i wsp., 1996; Roberts i wsp., 1994; Sobecky i wsp., 1996).

### 2.5.1 Antytoksyna ParD

Natywne białko ParD kodowane przez plazmid RK2 jest homodimerem (Johnson i wsp., 1996; Roberts i wsp., 1993), który wykazuje wysoką stabilność termiczną i doskonałe właściwości ponownego zwijania się po denaturacji cieplnej (Oberer i wsp., 1999; Oberer i wsp., 2002). ParD posiada w swojej strukturze drugorzędowej regiony  $\alpha$ -helikalne i  $\beta$ -kartki. Składa się z dwóch strukturalnie odrębnych części: dobrze uporządkowanego N-końca i nieustrukturyzowanego C-końca. N-koniec białka ParD jest odpowiedzialny za oddziaływanie z DNA oraz dimeryzację (Dalton i Crosson, 2010). Antytoksyna ParD oddziałuje z sekwencją promotorową operonu (operatorem) *parDE* powodując zahamowanie transkrypcji (Oberer i wsp., 2007; Roberts i wsp., 1993). C-terminalny koniec białka ParD bierze udział w oddziaływaniu z toksyną ParE (Dalton i Crosson, 2010). Analiza struktury krystalicznej heterotetrameru ParD<sub>2</sub>:ParE<sub>2</sub> homologicznego systemu *parDE* z *Caulobacter vibrioides* pokazała stabilizację struktury C-końca ParD w trakcie wiązania z ParE (Dalton i Crosson, 2010). Taką zmianę strukturalną zaobserwowano również w przypadku innych antytoksyn systemów typu II. Ponadto uważa się, że nieustrukturyzowany C-koniec antytoksyn typu II może być rozpoznawany przez proteazy komórkowe (Brzozowska i Zielenkiewicz, 2013).

### 2.5.2 Toksyna ParE

Natywne białko ParE plazmidu RK2 tworzy homodimer (Johnson i wsp., 1996). Jest homologiem z toksynami YoeB i RelE z *E. coli* i białka ParE z *C. vibrioides*. Struktura krystaliczna białka ParE z *C. vibrioides* pokazuje, że posiada ono dwie antyrównoległe  $\alpha$ -helisy na N-końcu, które tworzą strukturę typu szpilki do włosów i układają się na trzech antyrównoległych  $\beta$ -kartkach (Dalton i Crosson, 2010). Mimo że toksyna ParE z RK2 jest dużej mierze podobna do toksyny RelE na poziomie struktury pierwszorzędowej i trzeciorzędowej, nie zawiera żadnej z trzech krytycznych reszt katalitycznych wymaganych do cięcia mRNA na rybosomie (Neubauer i wsp., 2009). Toksyna ParE może tworzyć kompleks z DNA tylko za pośrednictwem antytoksyny ParD. Uformowany kompleks ParDE oddziałuje z operonem *parDE*. Jednak wzrastające stężenie toksyny powoduje oddysocjowanie kompleksu ParDE od DNA i wznowienie transkrypcji (Johnson i wsp., 1996). Stechiometria białek ParD:ParE, przy której następuje anty-represja operonu *parDE*, nie jest znana. Komórkowym celem toksyny ParE z RK2 jest gyraza DNA (GyrAB) (Jiang i wsp., 2002). Gyraza to topoisomeraza II odpowiedzialna za utrzymanie odpowiedniej topologii DNA. Funkcjonalny enzym występuje w postaci heterotetrameru złożonego z dwóch podjednostek A i dwóch podjednostek B. Gyraza posiada trzy aktywności:

nukleolityczną, odpowiedzialna jest za rozpoznawanie i nacinanie nici DNA (segment-G), wprowadzanie ujemnych superzwnięć w DNA, poprzez przeplatanie dupleksu DNA (segment-T) przez nacięty fragment DNA (segment-G), oraz aktywność ligazy służąca do odtworzenia funkcjonalnej cząsteczki DNA w zamkniętej formie (Berger i wsp., 1996). Toksyna ParE zmienia aktywność gyrazy, co powoduje nacinanie DNA i powstawanie niewłaściwej liniowej formy chromosomalnego DNA (Jiang i wsp., 2002).

### **2.5.3 Aktywacja systemu *parDE***

Do tej pory proteaza odpowiedzialna za degradację antytoksyny ParD systemu *parDE* nie została zidentyfikowana. Dlatego degradacja antytoksyny może być jednym z mechanizmów regulacji aktywacji systemu TA w komórkach gospodarza. Proteazy komórkowe wydają się być najbardziej prawdopodobnymi czynnikami, mogącymi aktywować system TA *parDE* plazmidu RK2. W *E. coli* zidentyfikowano cztery cytozolowe proteazy należące do rodziny białek AAA+: ClpXP, ClpAP, ClpYQ (określane również jako HslUV) i Lon (Sauer i Baker, 2011). Proteazy AAA+ są złożone z zależnej od ATP domeny odpowiedzialnej za rozpoznawanie i rozwijanie substratu (ang. unfoldase), która jest białkiem opiekuńczym nadrodziny białek AAA+ oraz domeny peptydazowej, która tworzy proteolityczną komorę odpowiedzialna za hydrolizę wiązań peptydowych (Baker i Sauer, 2006; Sauer i Baker, 2011). Rozpoznanie białka substratu opiera się na wykrywaniu hydrofobowych sekwencji wewnątrz substratu albo przez wiązanie ze specyficznymi motywami zwanymi degronami (Gur i Sauer, 2009). Proteazy mogą również oddziaływać z białkami adaptorowymi które pomagają dostarczyć substrat do proteazy (Erbse i wsp., 2006; Grimaud i wsp., 1998).

### 3 Cele pracy

- Identyfikacja czynnika odpowiadającego za aktywację systemu toksyna-antytoksyna *parDE* plazmidu RK2.
- Wpływ komponentów systemu *parDE* na stabilność antytoksyny ParD.
- Analiza oddziaływań pomiędzy elementami systemu *parDE*.
- Sprawdzenie stabilności plazmidu posiadającego operon *parDE* w różnych gatunkach bakterii.
- Sprawdzenie czy białko ParD jest uniwersalnym substratem dla homologów proteazy ClpAP z innych organizmów.

## 4 Materiały

### 4.1 Szczepy bakteryjne

*E. coli* ATC12017 C600 *lon510* (Kandror i wsp., 1994)

*E. coli* BL21(DE3) *F*<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (Studier i Moffatt, 1986)

*E. coli* C600 *F*<sup>-</sup> *tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1  $\lambda$*  (Appleyard, 1954)

*E. coli* DH5 $\alpha$  *F*<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r<sub>K</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>K</sub>*<sup>+</sup>),  $\lambda$* <sup>-</sup> (Woodcock i wsp., 1989)

*E. coli* JM109 *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (*r<sub>K</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>K</sub>*<sup>+</sup>), *relA1, supE44,  $\Delta$ (lac-proAB)*, [F' *traD36, proAB, laqI*<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15]

*E. coli* XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI*<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)].

*E. coli* SG22099 C600 *clpA319::kan<sup>R</sup>* (Katayama i wsp., 1988)

*E. coli* SG22080 C600 *clpX::kan<sup>R</sup>* (Gottesman i wsp., 1993)

*E. coli* SG12065 C600 *clpY::cat<sup>R</sup>* (Wu i wsp., 1999)

*P. putida* KT2440 *rmo*<sup>-</sup>, *mod*<sup>+</sup>

*P. putida* AD247 KT2440 *clpA::kan<sup>R</sup>* (Dubiel i wsp., 2018)

*C. crescentus* NA1000 Pochodna szczepu dzikiego CB15

*C. crescentus* UJ838 NA1000 *clpA:sm<sup>R</sup>* (szczep otrzymany od prof. Urs Jenal, Biozentrum - Universität Basel)

### 4.2 Plazmidy i oligonukleotydy

#### 4.2.1 Plazmidy

**pRR46** - wektor do konstytutywnej produkcji białka ParD (minireplikon plazmidu R6K z *p<sub>parDE</sub>*, genem *parD* i połowa genu *parE*), Amp<sup>R</sup> (Sobecky i wsp., 1996)

**pAS12** - wektor do nadprodukcji białka ParE ((ATG)-*parE* wklonowany w pGEX-KT), Kan<sup>R</sup> (Sobecky i wsp., 1996)

**pKD19L** - minireplikon plazmidu RK2, zawiera miejsce inicjacji replikacji *oriV*, gen białka inicjatorowego TrfA oraz origin plazmidu R6K (*oriγ*), Tet<sup>R</sup> (Doran i wsp., 1998)

**pBAD24** - wektor posiadający miejsca origin pBR322 i F1 oraz promotor arabinozowy *upstream* od miejsca MCS (ang. *multiple cloning site*), Amp<sup>R</sup> (Banerjee i wsp., 2009)

**pBAD24-ParD** - wektor do nadprodukcji białka ParD, Amp<sup>R</sup> (Dubiel i wsp., 2018)

**pABD2-4** - wektor do nadprodukcji białka ClpA *C. crescentus*, Amp<sup>R</sup> (skonstruowany w tej pracy)

**pBAD24ClpX** - wektor do nadprodukcji białka ClpX *E. coli*, Amp<sup>R</sup> (Banecki i wsp., 2001)

**pET-22b (+)** - wektor posiadający miejsca origin pBR322 oraz promotor T7 *upstream* od miejsca MCS, represor laktozowy *lacI*, sekwencje kodująca *pelB* i Amp<sup>R</sup>

**pET22b-ClpA $\Delta$ His** - wektor do nadprodukcji białka ClpA *P. putida*, bez znacznika histydynowego, Amp<sup>R</sup> (Dubiel i wsp., 2018)

**pET22b-ClpPPp** - wektor do nadprodukcji białka ClpP *P. putida*, Amp<sup>R</sup> (Dubiel i wsp., 2018)

**pETP** - wektor do nadprodukcji białka ClpP *C. crescentus* z znacznikiem histydynom, Amp<sup>R</sup> (Jenal i Fuchs, 1998)

**pBBR1MCS-5** - wektor posiadający miejsce origin pBBR1 oraz promotor laktozowy, T3 *upstream* od miejsca MCS oraz promotor T7 *downstream* od miejsca MCS, Gent<sup>R</sup> (Kovach i wsp., 1995)

**pABD6-1** - wektor pBBR1MCS-5 z wklonowanym operonem *parDE* Gent<sup>R</sup> (skonstruowany w tej pracy)

**pUHE21-2fd $\Delta$ 12-ClpA** - wektor do nadprodukcji białka ClpA, Amp<sup>R</sup> (Dougan i wsp., 2002)

**pSK20** - wektor do nadprodukcji białek ClpX i ClpP, Amp<sup>R</sup> (Gottesman i wsp., 1993)

**pBS59GyrAB** - wektor do nadprodukcji gyrazy bakteryjnej GyrAB (A. Maxwell)

**RK2** – plazmid IncP o szerokim spektrum gospodarza, Tet<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup> (Kolatka, i wsp., 2010)

## 4.2.2 Oligonukleotydy

Oligonukleotydy użyte w tej pracy zostały wymienione w Tabeli 1. Wszystkie oligonukleotydy zostały zamówione w Genomed S.A. (Polska)

## 4.3 Bufory i roztwory

### 4.3.1 Bufory

- barwnik obciążający do DNA: 0,25% błękit bromofenolowy; 0,25% cyjanol ksylenowy; 40% sacharoza (w/v)
- bufor do testu aktywności gyrazy: 40 mM HEPES-KOH pH 8,0; 25 mM Tris-HCl pH 7,6; 4% (w/v) sacharoza; 4 mM DTT; 80 µg/ml BSA; 11 mM octan magnezu; 5 mM ATP
- bufor do proteolizy: 40 mM HEPES-KOH pH 7,6; 25 mM Tris-HCl pH 7,6; 4% sacharoza (w/v); 4 mM DTT; 80 µg/ml BSA; 11 mM octan magnezu; 4 mM ATP
- bufor do oddziaływania białko-DNA: 40 mM HEPES-KOH pH 8,0; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 4% sacharoza (w/v); 4 mM DTT; 80 µg/ml BSA; 11 mM octan magnezu; 10 mM ATP
- bufor Laemmli (4x stężony): 0,25 M Tris pH 6,8; 6% SDS; 40% sacharoza (w/v); 0,04% błękit bromofenolowy (w/v); 10% β-merkaptoetanol
- bufor SDS (10× stężony): 196 mM glicyna; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,3
- CA: 50 mM KCl; 20 mM KPi pH 7,0; 10% glicerol; 1 mM DTT; 1 mM EDTA
- CAPS: 10 mM CAPS pH 11,0; 10% metanol
- CP1: 50 mM KCl; 20 mM KPi pH 7,5; 10% glicerol; 2 mM DTT; 2 mM EDTA
- CP2: 400 mM KCl; 20 mM KPi pH 7,5; 10% glicerol; 2 mM DTT; 2 mM EDTA
- CQ1: 50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 10% glicerol; 1 mM DTT; 1 mM EDTA
- CQ2: 500 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 10% glicerol; 1 mM DTT; 1 mM EDTA
- D: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol
- D25: 25 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol

- D400: 400 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol
- DL: 25 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM DTT; 0,1 mM Spermidyna
- GA: 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,1; 20 mM EDTA; 10% sacharoza; 20 mM spermidyna; 0,1% Brij-58; 1 mM DTT;
- HA: 50 mM Tris-HCl pH 7,2; 5 mM DTT; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol; 0,02% Triton X-100
- HB: 200 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,2; 5 mM DTT; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol; 0,02% Triton X-100
- HBS-EP: 10mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,005% Surfaktant P20; 3 mM EDTA
- P1: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 10% glicerol
- P2: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 10% glicerol; 100 mM KCl
- P3: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 10% glicerol; 400 mM KCl
- P4: 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol; 100 mM KCl
- PA: 50 mM HEPES pH 7,2; 25 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM ATP; 1 mM DTT; 10% glycerol
- PB: 50 mM HEPES pH 7,2; 600 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM ATP; 1 mM DTT; 10% glycerol
- PBS: 10mM NaPi pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM KCl
- PBST: 20 mM KPi pH 7,6; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% β-merkaptioetanol
- PSA: 50 mM NaPi pH 7,5; 2 mM DTT; 10% glicerol; 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- QSA: 100 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM DTT; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol
- QSB: 700 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM DTT; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glycerol



- SA: 25 mM NaCl; 50 mM HEPES pH 7,2; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol
- SB: 500 mM NaCl; 50 mM HEPES pH 7,2; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol
- SEN: 0,2 M EDC; 0,05 M NHS
- TBE: 90mM Tris-boran, 2mM EDTA
- TBST 125 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 0,1% Tween 20
- TCB: 50 mM Tris-HCL pH 8,0; 150 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,1% β-merkaptioetanol; 10% glicerol
- TNE: 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA
- UF: 100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol
- WA: 0,2% BSA; 10mM NaPi pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM KCl
- WB: 25 mM HEPES-KOH pH 7,6; 150 mM KCl; 25 mM NaCl; 1 mM DTT; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5% glicerol; 0,1 mM EDTA; 0,05% Triton X-100; 0,2% BSA
- XL: 100 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM DTT; 1 mM PMSF; 10% glicerol

#### 4.3.2 Roztwory

- roztwór arabinozy: 20% arabinoza (roztwór wodny)
- roztwór barwnika Coomasie: 0,28% Coomasie Brilliant Blue G (m/v); 50% metanol
- roztwór bromku etydy: 10 mg/ml w H<sub>2</sub>O
- roztwór chlorku wapnia: 100 mM CaCl<sub>2</sub> (roztwór wodny)
- roztwór glukozy: 20% glukoza (roztwór wodny)
- roztwór odbarwiający: 10% kwas octowy; 20% metanol
- roztwór PMSF: 10 mg/ml w izopropanolu
- roztwór polietylenoiminy: 10% polietylenoimina (roztwór wodny)

#### 4.4 Podłoża hodowlane

LA: 0,5% ekstrakt drożdżowy; 1% pepton; 1% NaCl; 1,5% agar

LB: 0,5% ekstrakt drożdżowy; 1% pepton; 1% NaCl

PYE: 0,01% ekstrakt drożdżowy; 0,02% pepton; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>

PYE agar; 0,01% ekstrakt drożdżowy; 0,02% pepton; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2% agar

Antybiotyki dodawano do podłoża w następujących stężeniach końcowych:

ampicylinę 50-100 µg/ml

kanamycynę 50-75 µg/ml

chloramfenikol 25-40 µg/ml

tetracyklinę 12,5-50 µg/ml

gentamycynę 5-10 µg/ml

#### **4.5 Złoża chromatograficzne**

CM-Sepharose (Amersham biosciences; USA)

DEAE Sepharose (Pharmacia; USA)

HiTrap Heparin (GE Healthcare; USA)

Ni-NTA agarose (Qiagen; USA)

P11 (Whatman; USA)

Q-Sepharose FF (Amersham biosciences; USA)

Source 15Q (Amersham Pharmacia; USA)

Superdex 200 (GE Healthcare; USA)

#### **4.6 Odczynniki**

A&A Biotechnology, Polska - zestawy do izolacji plazmidowego DNA (Plazmid Mini, Plazmid Midi), zestaw do izolacji chromosomalnego DNA (Genomic Mini)

Applichem, Niemcy – jednozasadowy fosforan potasu, dwuzasadowy fosforan potasu

Biacore, Szwecja – EDC, NHS, Surfaktant P20,

Bio-Rad, USA – zestaw substratów TMB EIA

Substrat HRP WesternBright Quantum (Advansta, USA)

Zestaw do oczyszczania DNA po reakcji i z żelu agarowego NucleoSpin Gel and PCR (Macherey-Nagel, Germany)

Chempur, Polska – izopropanol

Fermentas, Litwa – IPTG, Wzorzec masowy do DNA (Gene Ruler, drabinka 1kb DNA), Wzorzec masowy do białek (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), bufora dla enzymów

Fluka, Niemcy – octan magnezu, glicerol,

ICN Biomedicals – cyjanol ksylenowy

J.T.Baker, Holandia – etanol

Merck, Niemcy – agar, Coomassie Brilliant Blue, ekstrakt drożdżowy, KCl, pepton

MP Biomedicals, USA – dwuzasadowy fosforan sodu, glukoza

POCh, Polska – błękit bromofenolowy, butanol, HCl, kwas cytrynowy, kwas octowy, kwas siarkowy, metanol, sacharoza

Serva, Niemcy – Brij 58, jednozasadowy fosforan sodu

Sigma-Aldrich, USA – ampicylina, kanamycyna, APS, arabinoza, ATP, ATP $\gamma$ S,  $\beta$ -merkptoetanol, bromek etydyny, BSA, CaCl<sub>2</sub>, CAPS, chloramfenikol, gentamycyna CsCl<sub>2</sub>, DTT, EDTA, etanolamina, formaldehyd, glicyna, glutaminian potasu, HEPES, imidazol, tetracyklina, KOH, kwas borowy, lizozym, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>OH, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PMSF, poli-L-lizyna, polietylenoimina, SDS, TEMED, tetracyklina, Tris, Triton X-100, Tween 20

## **4.7 Białka**

Ec Lon, Ec ClpQ, Ec ClpY,  $\lambda$ O – kolekcja ZBM

Enzymy restrykcyjne, fragment Klenowa, kinaza T4, ligaza T4, polimeraza *Pfu*, polimeraza *Taq*, SAP – Fermentas, Litwa

$\alpha$ -kazeina, BSA – Sigma, USA

ParD, GST-ParE, Ec ClpA, Cc ClpA, Pp ClpA, Ec ClpP, Cc ClpP, Pp ClpP, Ec ClpX, Ec GyrAB – oczyszczono w tej pracy

## **4.8 Przeciwciała**

Mysie przeciwciała poliklonalne anty-ParD i anty-ParE – kolekcja ZBM

Kozie monoklonalne przeciwciała anty-mysie koniugowane z peroksydazą chrzanową HRP (ang. horseradish peroxidase) – (Bio-Rad, USA)

## **4.9 Inne materiały**

szkiełka podstawowe, szkiełka nakrywkowe – Comex, Polska,

filtr Millipore HA 0,45µm – Millipore, USA

membrana nitrocelulozowa PROTRAN – Whatman, USA

sensor CM5, sensor SA – GE Healthcare, USA

Płytki 96-dółkowe ELISA – Costar

Alexa Fluor 555-aha-dCTP (Thermo Fisher Scientific, USA)

Worki dializacyjne Spectra/Por (Spectrum Laboratories Inc., USA)

## **4.10 Sprzęt**

Systemy chromatograficzne AKTApriime plus (GE Healthcare, USA)

Wstrząsarka wodna Aquatron Waterbath (Infors AG, Szwajcaria)

Wirówka Avanti J-30I High-Speed (Beckman Coulter, USA)

Spektrofotometr Beckman DU-640i UV-Vis (Beckman, USA)

Blok grzewczy Benchmark Digital Dry Bath (Benchmark Scientific, USA)

Biacore 2000 (Biacore AB, Szwecja)

Binder Incubators (Binder, Niemcy)

Fermentor Biostat C (Sartorius, Niemcy)

Wirówka 5424 R (Eppendorf, Niemcy)

System do wizualizacji ChemiDoc MP (Bio-Rad, USA)

Czytnik płytek DTX880 Multimode (Beckman Coulter, USA)

System do elektroporacji Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, USA)

Horizontal Mini-Gel Systems MGU-202T (C.B.S. Scientific, USA)

Sub-Cell GT (Bio-Rad, USA)

PCR MasterCycler Gradient (Eppendorf, Niemcy)

PCR MasterCycler Personal (Eppendorf, Niemcy)

System dejonizacji wody Milli-Q Ultrapure (Millipore, USA)

Aparat do transferu Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA)

Aparat do rozdzielania Mini-PROTEAN Tetra Cell system (Bio-Rad, USA)

Spektrofotometr Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA)

Rotor NVT 90 (Beckman Coulter, USA)

Wyrząsarka wodna OLS200 (Grant, UK)

Ultrawirówka Optima L-90K Ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA)

Sonikator Q700 (Qsonica, USA)

Thermomixer Comfort (Eppendorf, Niemcy)

Spektrofotometr V-650 UV-Vis (Jasco, USA)

## **5 Metody**

### **5.1 Oczyszczanie DNA**

Do izolacji chromosomalnego DNA bakterii użyłem komercyjnego zestawu Genomic Mini kit (Materiały 4.6). Plazmidowy DNA oczyszczałem metodą lizy alkalicznej (Sambrook i wsp., 2006) lub przy użyciu zestawu Plazmid Mini (Materiały 4.6). Dużą skalę oczyszczania superzwiniętego DNA plazmidu przeprowadziłem z użyciem metody lizy alkalicznej wirowania w gradiencie CsCl<sub>2</sub> według procedury opisanej w podręczniku „Molecular Cloning” (Sambrook i wsp., 2006). DNA po trawieniu restrykcyjnym oczyszczałem z użyciem komercyjnego zestawu NucleoSpin Gel and PCR (Materiały 4.6) zgodnie z instrukcją producenta.

### **5.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)**

Reakcję PCR przeprowadzałem w celu amplifikacji fragmentu DNA używając polimerazy DNA Pfu lub Taq (Materiały 4.7) zgodnie z instrukcją producenta. Mieszanina reakcyjna o objętości 50 µl zawierała 20 ng matrycy DNA, bufor dla polimerazy (Materiały 4.6), trójfosforany każdego z deoksynukleotydów w stężeniu 0,2 µM, każdy ze starterów w stężeniu 0,8 µM, 1,25 U polimerazy Pfu lub 1,5 U polimerazy Taq. Standardowo prowadziłem wstępną denaturację w temp. 95°C przez czas 30 sek., a następnie 33 cykle właściwej reakcji PCR w termocyklerze (Materiały 4.10). Jeden cykl obejmował denaturację w temp. 95°C przez czas 30 sek., hybrydyzację oligonukleotydów w temp. charakterystycznej dla danej pary starterów przez 30 sek. oraz wydłużanie łańcucha DNA w temp. 72°C przez 1 min. na każde 1000 pz. matrycy. W końcowym etapie inkubowałem próbki w temp. 72°C przez okres 15 min., a następnie schładzałem ją do temp. 10°C.

### **5.3 Trawienie restrykcyjne DNA**

Trawienie restrykcyjne preparatywne prowadziłem z użyciem około 2 µg DNA w mieszaninie reakcyjnej o objętości 20 µl zawierającej po 2 U odpowiednich enzymów. Trawienie restrykcyjne w celu weryfikacji poprawności uzyskanych plazmidów wykonywałem z użyciem około 150 ng DNA w mieszaninie reakcyjnej o objętości 10 µl, wykorzystując po 0,2 U odpowiednich enzymów. Trawienie przeprowadzałem w odpowiednim dla zastosowanych enzymów buforze, dostarczonym przez producenta (Materiały 4.7), w temperaturze 37°C

przez okres od 1 do 2 h. Mieszaninę reakcyjną analizowałem z wykorzystaniem elektroforezy agarozowej (Metody 5.8). Jeżeli trawiłem DNA w celu preparatywnym, po rozdziale elektroforetycznym oczyszczałem go z wykorzystaniem komercyjnego zestawu (Metody 5.1).

#### **5.4 Wypełnianie lepkich końców DNA fragmentem Klenowa**

Wektor przeznaczony do klonowania po trawieniu restrykcyjnym modyfikowałem za pomocą fragmentu Klenowa. Enzym ten wypełnia lepkie końce liniowego DNA w kierunku 5'-3'. Mieszanina reakcyjna miała objętość 20  $\mu$ l i zawierała 15  $\mu$ l plazmidu po trawieniu restrykcyjnym oczyszczonego z żelu agarozowego za pomocą komercyjnego zestawu, 1x stężony bufor Tango (Fermentas), każdy z deoksynukleotydów w stężeniu 1 mM oraz 1 U fragmentu Klenowa (Fermentas). Próbkę inkubowałem w temp. 37°C przez 30 min. po czym przeprowadzałem termiczną denaturację enzymu w temp. 75°C przez 15 min.

#### **5.5 Defosforylacja**

Plazmid przeznaczony do konstrukcji wektora ekspresyjnego był po trawieniu restrykcyjnym i wypełnianiu fragmentem Klenowa przeze mnie defosforylowany. Do mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio po reakcji wypełniania dodawałem 1 U alkalicznej fosfatazy (SAP) i inkubowałem w temp. 37°C przez 1h. Następnie enzym inaktywowałem przez inkubację w temp. 65°C przez 10 min.

#### **5.6 Ligacja**

Ligację przeprowadzałem w mieszaninie reakcyjnej o objętości 15  $\mu$ l zawierającej około 10 ng przeciętego enzymami restrykcyjnymi, wypełnionego fragmentem Klenowa i defosforylowanego wektora, od 10 do 50 ng produktu PCR po trawieniu restrykcyjnym, 1x stężony bufor dla ligazy T4, 1 mM ATP i 1 U ligazy T4 (Fermentas). Ligację prowadziłem przez noc w temp. 22°C. Mieszaniny ligacyjnej w porcjach o objętości od 2 do 10  $\mu$ l używałem następnie do transformacji komórek kompetentnych.

#### **5.7 Przygotowanie komórek kompetentnych i transformacja**

Komórki kompetentne przygotowywałem z użyciem chlorku wapnia, a transformację komórek bakteryjnych plazmidowym DNA wykonywałem wg procedury opisanej w podręczniku „Molecular Cloning” (Sambrook i wsp., 2006). Po transformacji plazmidowym DNA komórki wysiewałem na podłoże LA z odpowiednim antybiotykiem.

## **5.8 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym**

DNA rozdzielałem w 1% żelach agarozowych z użyciem buforu TBE, w aparatach do elektroforezy agarozowej (Materiały 4.10) przy napięciu 25-90 V. Żele barwiłem bromkiem etydyny i analizowałem w świetle UV w systemie Chemi-Doc Image Lab 5.1 (Bio-Rad, USA).

## **5.9 Elektroforeza w denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)**

Rozdziały elektroforetyczne SDS-PAGE prowadziłem w 12.5% lub 15% żelach poliakrylamidowych z 5% żelem zagęszczającym (Laemmli, 1970). Elektroforezę wykonywałem w aparatach do elektroforezy wg instrukcji producenta (Materiały 4.10).

## **5.10 Barwienie żeli poliakrylamidowych barwnikiem Coomassie**

Jeżeli nie wyszczególniłem innej metody, wizualizację rozdziału wykonywałem przez inkubację żelu w roztworze barwnika Coomasie (Materiały 4.3.2) przez 30 min, a następnie odbarwiałem przez noc w roztworze odbarwiacza (Materiały 4.3.2).

## **5.11 Western Blotting**

Żele poliakrylamidowe przeznaczone do analizy metodą Western Blotting równoważyłem przez 15 min w buforze do transferu. Dla transferu mokrego stosowałem bufor 10 mM CAPS pH 11,0 (Materiały 4.3.1). Następnie białka przenosiłem z żelu na membranę nitrocelulozową (Materiały 4.9) w aparacie do transferu mokrego (Materiały 4.10) przy stałym natężeniu prądu 400 mA przez 1 h. Membranę blokowałem 3% roztworem odtłuszczonego mleka w proszku rozpuszczonego w buforze TBS-T (Materiały 4.3.1) i inkubowałem z mysimi przeciwciałami I-rzędowymi anty-ParD lub anty -ParE przez 1 h. Po kilkukrotnym płukaniu buforem TBS-T membranę inkubowałem z II-rzędowymi przeciwciałami anty-mysimi (Materiały 4.8) przez 45 min. Membranę wywoływałem z użyciem zestawu „Substrat HRP WesternBright Quantum” (Advansta, USA) (Materiały 4.6). Otrzymany obraz analizowałem densytometrycznie przy użyciu programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin).



## 5.12 Określenie stężenia białek i DNA

Określanie stężenia białek odbywało się za pomocą pomiaru densytometrycznego, który wykonywałem po rozdzielaniu elektroforetycznym na żelu poliakrylamidowym i barwieniu Coomassie. Jako wzorca użyłem znanej ilości białka BSA. Pomiaru dokonywałem z użyciem programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin). Określenie stężenia DNA odbywało się spektrofotometrycznie (Sambrook i wsp., 2006).

## 5.13 Oczyszczanie białek

### 5.13.1 Oczyszczanie białka ParD plazmidu RK2

Bakterie szczepu BL21 (pBAD-ParD) (Materiały 4.1) hodowałem przez noc w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny. Hodowlę odmładzałem do pożywki LB (6 x 1 litr) w stosunku 1:50 i hodowałem w temp. 37°C do OD<sub>600</sub>=0,6. Indukowałem nadprodukcję białka przez dodanie arabinozy do stężenia 0,2% i prowadziłem hodowlę przez kolejną godzinę. Osad bakteryjny osadzałem przez wirowanie (4,900 obr/min, 15 min; rotor JLA 10.500) (Materiały 4.10), zamrażałem i przechowywałem w temperaturze -70°C. Po rozmrożeniu osad zawieszałem w buforze DL (Materiały 4.3.1) (10 ml buforu/1 g osadu), dodawałem niewielką ilość lizozymu i PMSF do stężenia 0,3mM, po czym inkubowałem przez 30 min łaźni lodowej. Następnie prowadziłem sonikację zawiesiny bakteryjnej (5 impulsów po 1 min.) (Materiały 4.10). Lizat po sonikacji wirowałem (25 000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50). Do supernatantu dodałem siarczan amonu do stężenia 0,2 mg/ml a następnie wirowałem (25 000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) w celu usunięcia wytrąconych białek. Do otrzymanego supernatantu dodałem ponownie siarczan amonu do końcowego stężenia 0,4 mg/ml i wirowałem (25 000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50). W osadzie po wysalaniu znajdowało się białko ParD. Otrzymany osad zawieszałem w 4 ml buforu D i dializowałem przez noc do buforu D. Preparat po dializie wirowałem (25 000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) w celu usunięcia nierozpuszczonych białek. Supernatant rozcieńczałem buforem D pięciokrotnie i nanosiłem na kolumnę DEAE-Sepharose (Materiały 4.5) (obj. 60 ml) zrównoważoną buforem D. Po naniesieniu białka kolumnę płukałem 180 ml buforu D25, a następnie eluowałem związane ze złożem białko liniowym gradientem 0-100% buforu D400 (Materiały 4.3.1) o objętości 500 ml. Połączone frakcje zawierające ParD dializowałem do buforu D (Materiały 4.3.1). Preparat białka po dializie nanosiłem na kolumnę HiTrap Heparayne (Materiały 4.5) o objętości 1 ml zrównoważoną buforem D, przy przepływie 0,5 ml/min. Elucję białka z kolumny wykonałem

w liniowym gradiencie 0-100% buforu D400. Wybrane połączone frakcje dializowałem do buforu D i nanosiłem na 2 ml złoża Resource 15Q (Materiały 4.5). Kolumnę płukałem 10 ml buforu D25 i eluowałem w liniowym gradiencie 0-100% buforu D400. Frakcje zawierające białko ParD o zadowalającym stężeniu i czystości łączyłem i dializowałem do buforu D.

### **5.13.2 Oczyszczanie białka ParE plazmidu RK2**

Białko ParE posiadające jako znacznik S-Transferazę Glutationu GST (ang. Glutathione S-transferase) nadprodukowałem w komórkach szczepu JM109 (Materiały 4.1). Całoczną hodowlę komórek JM109 niosących plazmidy pAS12 do nadprodukcji *GST-parE* i pRR46 z którego ekspresja genu *parD* odbywa się konstytutywnie (Materiały 4.2.1) prowadziłem bez wytrząsania w temp. 30°C, Następnie hodowlę rozcieńczałem w stosunku 1:50 w 6 litrach pożywki LB z dodatkiem ampicyliny oraz kanamycyny i hodowałem w temp. 37°C z wytrząsaniem do osiągnięcia OD<sub>600</sub> 1,5. Następnie hodowlę indukowałem IPTG do osiągnięcia stężenia 1mM i hodowałem przez kolejne 3 godziny. Bakterie osadzałem przez wirowanie (5000 obr/min, 15 min; rotor JLA 10.500) (Materiały 4.10). Osad zawieszałem w buforze PBST (Materiały 4.3.1) i przeprowadzałem lizę komórek przez sonikację. Następnie lizat wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) (Materiały 4.10) i zachowywałem supernatant. Przygotowywałem złożo GST-agarose i równoważyłem buforem PBST z 10 mM glutationem. Supernatant po lizie bakterii (25 ml) nanosiłem na 1ml złoża GST-agarose i inkubowałem przez 3 h z mieszaniem. Złożo osadzałem przez wirowanie (5000 obr/min, 1 min; rotor 11133) (Materiały 4.10) i oddzielałem supernatant. Następnie złożo zawieszałem w buforze PBST z 10 mM glutationem i przenosiłem do kolumny chromatograficznej (Ø 0,5 cm). Złożo płukałem 10 ml buforu PBST z 10 mM glutationem. Elucję białka prowadziłem z użyciem buforu TCB z 50 mM glutationem (Materiały 4.3.1) zbierając frakcje o objętości 1 ml. Czystość białka określałem analizując frakcje metodą elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 5.9) i barwienia Coomassie. Połączone frakcje zawierające białko o zadowalającej czystości i stężeniu dializowałem do buforu TCB (4 zmiany buforu o objętości 1 l co 30 minut).

### **5.13.3 Oczyszczanie białka GyrAB *Escherichia coli***

Bakterie szczepu JM109 (Materiały 4.1) (pBS59GyrAB) (Materiały 4.2.1) hodowałem przez noc w pożywce LB z dodatkiem ampicyliny. Hodowlę odmładzałem w stosunku objętościowym 1:50 i prowadziłem dalszą hodowlę w fermentorze (Materiały 4.10) o objętości 6 litrów w temp. 30 °C do OD<sub>600</sub>=0,60. Nadprodukcję białka GyrAB indukowałem

termicznie w 42 °C przez 15 min. i kontynuowałem hodowlę przez 2 godziny w temp. 37°C. Bakterie osadzałem przez wirowanie (15 min z prędkością 4900 obr/min, rotor JLA 10.500)(Materiały 4.10), a następnie zawieszałem w buforze GA (Materiały 4.3.1), zamrażałem w ciekłym azocie i przechowywałem w temp. -70 °C. Osad rozmrażałem a następnie dodawałem 40 ml buforu GA (Materiały 4.3.1) oraz lizozym (0,2 mg/ml), inkubowałem 30 min., a następnie zamrażałem ponownie i rozmrażałem powoli mieszając. Mieszaninę wirowano (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) (Materiały 4.10), rozcieńczałem buforem SA (Materiały 4.3.1) nanosiłem na kolumnę DEAE-Sepharose (Materiały 4.5) (obj. 60 ml) zrównoważoną buforem SA. Po naniesieniu białka, płukałem kolumnę 180 ml buforu SA, a następnie eluowałem związane ze złożem białko liniowym gradientem 0-100% buforu SB (Materiały 4.3.1) o objętości 500 ml. Połączone frakcje zawierające GyrAB dializowałem do buforu PA (Materiały 4.3.1). Preparat białka po dializie nanosiłem na kolumnę P11 o objętości 15 ml zrównoważoną buforem PA, przy przepływie 0,2 ml/min. Kolumnę płukałem 50 ml buforu PA, elucję białka wykonałem w liniowym gradiencie 0-100% buforu PB. Zebrane frakcje zawierające białko GyrAB łączyłem i dializowałem do buforu PA i nanosiłem na kolumnę HiTrap Heparynie (Materiały 4.5) o objętości 1 ml. Kolumnę przemywałem buforem PA (10 ml), a białko eluowałem liniowym gradientem 0-100% buforu PB (Materiały 4.3.1) o objętości 20 ml zbierając frakcje o objętości 0,5 ml. Białko o zadowalającej czystości i stężeniu dializowałem do buforu PA (4 zmiany buforu o objętości 1 l co 60 minut)

#### **5.13.4 Oczyszczanie białka ClpA *Escherichia coli***

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* szczepu XL1-Blue (Materiały 4.1) niosących plazmid pUHE21 2fdΔ12 ClpA (Materiały 4.2.1) rozcieńczałem w stosunku 1:50 w 6 litrach pożywki LB z ampicyliną i hodowałem w temp. 37°C z wytrząsaniem. Po osiągnięciu przez kulturę bakteryjną OD<sub>600</sub>=0,6 indukowałem nadprodukcję białka dodając do pożywki IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Hodowlę prowadziłem przez kolejne 2 godziny. Bakterie osadzałem przez wirowanie (8000 obr/min, 5 min; rotor JLA 10.500) (Materiały 4.10). Osad (13 g) zamrażałem i przechowywałem w temp. -70°C. Po rozmrożeniu bakterie zawieszałem w 50 ml buforu CA (Materiały 4.3.1) i prowadziłem lizę przez sonikację zawiesiny. Lizat wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) (Materiały 4.10). Supernatant przenieśliem do zlewki i przy ciągłym mieszaniu dodawałem porcjami 10% roztwór polietylenoiminy (Materiały 4.3.2) do końcowego stężenia 0,3% w celu wytrącenia białek. Osadziłem wytrącone białka przez wirowanie (25000 obr/min, 30 min). Osad zawiesiłem w

małej ilości buforu CP1 (Materiały 4.3.1) i prowadziłem dializę zawiesiny do tego buforu w celu rozpuszczenia obecnych w niej białek. Po zakończeniu dializy preparat wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) aby osadzić nierozpuszczone białka. Supernatant nanosiłem na kolumnę CM-Sepharose (Materiały 4.5) (obj. 30 ml) zrównoważoną buforem CP1. Po naniesieniu białka, kolumnę płukałem 100 ml buforu CP1, a następnie eluowałem związane ze złożem białko liniowym gradientem 0-100% buforu CP2 (Materiały 4.3.1) o objętości 150 ml. Połączone frakcje zawierające ClpA dializowałem do buforu CQ1 (Materiały 4.3.1). Preparat białka po dializie nanosiłem na kolumnę Source 15Q (Materiały 4.5) o objętości 1,2 ml zrównoważoną buforem CQ1, przy przepływie 0,5 ml/min. Elucję białka z kolumny wykonywałem trój etapowym gradientem buforu CQ2 (Materiały 4.3.1): (i) 15 ml 0-25% CQ2, (ii) 10 ml 25-30% CQ2, (iii) 10 ml 30-80% CQ2. Frakcje zawierające białko ClpA o zadowalającym stężeniu i czystości połączyłem i dializowałem do buforu CQ1.

#### **5.13.5 Oczyszczanie białka ClpA *Caulobacter crescentus* i ClpA *Pseudomonas putida***

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* szczepów BL21 (Materiały 4.1) niosących plazmidy pBAD24-ClpAPp i pBAD24\_ClpPcc (Materiały 4.2.1) rozcieńczałem w stosunku 1:50 w 6 litrach pożywki LB z ampicyliną i hodowałem w temp. 37°C z wytrząsaniem. Po osiągnięciu przez kulturę bakteryjną  $OD_{600}=0,6$ , indukowałem nadprodukcję białka dodając do pożywki arabinozę do końcowego stężenia 0,2%. Hodowlę prowadziłem przez kolejne 2 godziny. Bakterie osadzałem przez wirowanie (8000 obr/min, 5 min; rotor JLA 10.500) (Materiały 4.10). Osad (8 g) zamrażałem i przechowywałem w temp. -70°C. Po rozmrożeniu bakterie zawieszałem w 50 ml buforu CA (Materiały 4.3.1) i przeprowadzałem lizę przez sonikację zawiesiny. Lizat wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) (Materiały 4.10). Supernatant przenosiłem do zlewki i w celu wytrącenia białek, przy ciągłym mieszaniu dodawałem porcjami 10% roztwór polietylenoiminy (Materiały 4.3.2) do końcowego stężenia 0,3%. Osadziłem wytrącone białka przez wirowanie (25000 obr/min, 30 min). Osad zawieszałem w małej ilości buforu CP1 (Materiały 4.3.1) i przeprowadzałem dializę zawiesiny do tego buforu w celu rozpuszczenia obecnych w niej białek. Po zakończeniu dializy preparat wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50), aby osadzić nierozpuszczone białka. Supernatant nanosiłem na kolumnę CM-Sepharose (Materiały 4.5) (obj. 30 ml) zrównoważoną buforem CP1. Po naniesieniu białka, kolumnę płukałem 100 ml buforu CP1, a następnie eluowałem związane ze złożem białko liniowym gradientem 0-100% buforu CP2 (Materiały 4.3.1) o objętości 150 ml. Połączone frakcje zawierające ClpA dializowałem do buforu CQ1 (Materiały 4.3.1). Preparat białka po dializie nanosiłem na

kolumnę Source 15Q (Materiały 4.5) o objętości 1,2 ml zrównoważoną buforem CQ1, przy przepływie 0,5 ml/min. Elucję białka z kolumny wykonywałem trójetapowym gradientem buforu CQ2 (Materiały 4.3.1): (i) 15 ml 0-25% CQ2, (ii) 10 ml 25-30% CQ2, (iii) 10 ml 30-80% CQ2. Frakcje zawierające białko ClpA o zadowalającym stężeniu i czystości połączyłem i dializowałem do buforu CQ1.

#### **5.13.6 Oczyszczanie białka ClpX *Escherichia coli***

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* szczepu BL21 (Materiały 4.1) niosących plazmid pBAD24ClpX (Materiały 4.2.1) rozcieńczałem w 6 litrach pożywki LB z ampicyliną w stosunku 1:50 i hodowałem w temp. 30°C do OD<sub>600</sub>=0,65. Indukowałem nadprodukcję białka ClpX przez dodanie arabinozy do końcowego stężenia 0,1% i prowadziłem hodowlę przez 3 godziny. Bakterie osadzałem przez wirowanie (8000 obr/min, 5 min; rotor JLA 10.500) (Materiały 4.10). Osad (10 g) zamroziłem i przechowywałem w temp. -70°C. Po rozmrożeniu bakterie zawieszałem w 120 ml buforu XL (Materiały 4.3.1) i wykonałem lizę poprzez sonikację. Lizat wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) (Materiały 4.10), a supernatant przenoszono do zlewki. Następnie precypitowałem białka z lizatu przez wysalanie siarczanem amonu (0,3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 1 ml lizatu) z mieszaniem. Białka osadziłem przez wirowanie (25000 obr/min, 1 h; rotor JA-30.50). Osad przeniosłem do worka dializacyjnego i dializowałem przez noc w buforze XL. Do preparatu po dializie dodałem siarczanu amonu w celu wyrównania jego przewodnictwa z przewodnictwem buforu PSA (Materiały 4.3.1) (około 1200 μS). 8 ml preparatu naniosłem na kolumnę phenyl-agarose o objętości 20 ml zrównoważonej buforem PSA. Kolumnę płukałem 100 ml PSA, a elucję białka wykonałem z użyciem gradientu 0-100% buforu PSB (Materiały 4.3.1) o objętości 120 ml zbierając frakcje o objętości 5 ml. Frakcje zawierające białko ClpX połączyłem i dializowałem do buforu QSA (Materiały 4.3.1), a następnie naniosłem na kolumnę Q Sepharose FF (20 ml) (Materiały 4.5) zrównoważoną buforem QSA. Następnie kolumnę płukałem 120 ml buforu QSA. Elucję białka wykonałem używając liniowego gradientu 0-100% buforu QSB (Materiały 4.3.1) o objętości 120 ml, zbierając frakcje o objętości 3 ml. Frakcje zawierające białko ClpX połączyłem i dializowałem do buforu HA (Materiały 4.3.1) i naniosłem na kolumnę HiTrap Heparayne (Materiały 4.5) o objętości 5 ml. Kolumnę przemywano buforem HA (50 ml), a białko eluowałem liniowym gradientem 0-100% buforu HB (Materiały 4.3.1) o objętości 60 ml zbierając frakcje o objętości 1,5 ml. Białko ClpX znajdowało się we frakcjach zawierających 28-35% buforu HB. Frakcje zawierające białko ClpX o zadowalającym stężeniu i czystości połączyłem i dializowałem do buforu HB.

### **5.13.7 Oczyszczanie białka ClpP *Escherichia coli***

Nocną hodowlę bakterii szczepu BL21 (Materiały 4.1), zawierających plazmid pSK20 (Materiały 4.2.1), odmładzałem w stosunku 1:25 i hodowałem w fermentorze (Materiały 4.10) w temp. 30°C. Nadprodukcję białka indukowałem za pomocą IPTG o końcowym stężeniu 1 mM przy OD<sub>600</sub> hodowli równym 1. Po dwóch godzinach od indukcji bakterie osadzałem przez wirowanie przez 5 minut przy 8000 obr/min (rotor JLA 10.500), a osad bakterii zawieszałem w zimnym buforze do sonikacji P1 (Materiały 4.3.1). Zawiesinę komórek poddawałem sonikacji, a następnie wirowałem 30 minut przy prędkości 25000 obr/min (rotor JA-30.50). Do uzyskanego supernatantu powoli dodawałem roztworu polietylenoiminy do końcowego stężenia 0,01%, a następnie całość wirowałem 30 minut przy prędkości 25000 obr/min (rotor JA-30.50). Do supernatantu po wirowaniu dodawałem chlorku potasu do końcowego stężenia 100 mM i nakładałem na złożę Q-Sepharose (Materiały 4.5) (Ø 1 cm, objętość złoża 15 ml) zrównoważone buforem P2 (Materiały 4.3.1). Po naniesieniu preparatu, kolumnę płukałem 60 ml buforu P2 zbierając frakcje o objętości 30 ml (przepływ 0,5 ml/min.). Następnie związane białka eluowałem liniowym gradientem 0-100% buforów P2 i P3 (Materiały 4.3.1) o objętości 150 ml zbierając frakcje o objętości 5 ml. Obecność białek we frakcjach sprawdziłem przez barwienie czernią amidową, a następnie przez ich analizę elektroforetyczną w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Dalsze oczyszczanie przeprowadzałem wykorzystując metodę filtracji żelowej. Jedną z frakcji zawierających białko ClpP naniosłem na kolumnę Superdex 200 o długości 80 cm, przemytą buforem P4 (Materiały 4.3.1) i zbierałem frakcje o objętości 0,5 ml. Obecność białek we frakcjach sprawdzałem przez ich analizę elektroforetyczną w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Stężenie uzyskanego preparatu białka oznaczyłem densytometrycznie (Metody 5.12).

### **5.13.8 Oczyszczanie białka ClpP *Caulobacter crescentus* i ClpP *Pseudomonas putida***

Białko ClpP posiadające znacznik histydynowy nadprodukowałem w komórkach *E. coli* BL21 (Materiały 4.1). Całonocną hodowlę komórek BL21 niosących plazmid pET22b-His6-ClpPPP lub pETP (Materiały 4.2.1) rozcieńczałem w stosunku 1:100 w 6 litrach pożywki LB z dodatkiem ampicyliny i hodowałem do osiągnięcia OD<sub>600</sub> 0,6 w temp. 37°C z wytrząsaniem. Hodowlę indukowałem dodając IPTG do końcowego stężenia 1mM i kontynuowałem hodowlę przez 2 godziny. Następnie bakterie osadzałem przez wirowanie (8000 obr/min, 5 min; rotor JLA 10.500) (Materiały 4.10). Osad (4 g) zawiesiłem w buforze T0 (Materiały 4.3.1) i przeprowadzałem lizę komórek przez sonikację. Następnie lizat

wirowałem (25000 obr/min, 30 min; rotor JA-30.50) (Materiały 4.10) i zachowałem supernatant. Złóże Ni-NTA (Materiały 4.5) równoważyłem buforem T1. Supernatant po lizie bakterii (20 ml) nanosiłem na 2 ml złoża Ni-NTA i inkubowałem przez 3 h z mieszaniem. Złóże osadzałem przez wirowanie (5000 obr/min, 1 min; rotor 11133) i oddzieliłem supernatant. Następnie złóże zawiesiłem w buforze T2 (Materiały 4.3.1) i przenieśliem do kolumny chromatograficznej ( $\varnothing$  0,5 cm). Złóże płukałem 10 ml buforu T2. Elucję białka prowadziłem z użyciem buforu T3 (Materiały 4.3.1) zbierając frakcje o objętości 0,5 ml. Czystość białka określano analizując frakcje metodą elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 5.9). Połączone frakcje zawierające białko o zadowalającej czystości i stężeniu dializowałem do buforu UF (Materiały 4.3.1) (4 zmiany buforu o objętości 1 l co 45 minut).

### **5.14 Test aktywności gyrazy**

W celu analizy działania białek ParD i ParE na gyrazę z *E. coli* GyrAB używałem testu aktywności gyrazy (Jiang i wsp., 2002). Gyraza jest ATP zależną topoizomerazą II wprowadzającą ujemne superzwinięcia do matrycy DNA. Test przeprowadzałem w mieszaninach reakcyjnych o objętości 20  $\mu$ l, które zawierały 120 ng GyrAB oraz różne ilości białek ParD lub ParE w buforze reakcyjnym (Materiały 4.3.1). Po pięciominutowej preinkubacji białek do mieszaniny reakcyjnej dodawałem superzwiniętą formę plazmidu pKD19L (300 ng). Następnie przeprowadzałem inkubację białek z DNA w temp. 32°C przez 30 min. Reakcję zatrzymywałem przez dodanie SDS i EDTA do końcowego stężenia odpowiednio 0,25% i 20 mM. Mieszaninę reakcyjną inkubowałem przez 2 min w temp. 65°C, po czym do mieszanin dodawałem 4  $\mu$ l buforu obciążającego. Tak przygotowane próbki rozdzielałem, przeprowadzając elektroforezę w 1% żelu agarozowym (Metody 5.8) przez 20 h w buforze TBE i napięciu 25 V. W celu uwidocznienia DNA żel agarozowy inkubowałem w buforze TBE z dodatkiem EtBr. Następnie wyniki obrazowałem przy użyciu ChemiDoc MP (Bio-Rad) i poddawałem analizie densytometrycznej przy użyciu programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin).

### **5.15 Proteoliza *in vitro***

Doświadczenia degradacji białek *in vitro* przeprowadzałem w buforze do proteolizy (Materiały 4.3.1). Mieszaniny reakcyjne miały objętość 25 lub 50  $\mu$ l i zawierały proteolizowane białko ( $\alpha$ -kazeinę,  $\lambda$ O, ParD lub ParE), oraz proteazy (ClpXP, ClpAP, ClpYQ lub Lon). Próbki inkubowałem w temp. 32°C w czasie od 0 do 120 minut. Reakcje

zatrzymywałem przez dodanie 4x stężonego buforu Laemmli (Materiały 4.3.1). Na 12,5% żel poliakrylamidowy nanosiłem jedną trzecią całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej i rozdzielałem przy użyciu metody SDS-PAGE (Metody 5.9). Wyniki rozdziału uwidaczniałem przez barwienie barwnikiem Coomassie (Metody 5.10). Żele analizowałem za pomocą ChemiDoc MP (Bio-Rad) w programie Image Lab 5.1. Następnie wykonywałem pomiar densytometryczny przy użyciu programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin).

### **5.16 Test immunoenzymatyczny (ELISA)**

Do testów ELISA używałem 96-studzienkowych plastikowych płytek (Materiały 4.9). Cały test wykonywałem w temp. pokojowej. Immobilizacja białek na płytce odbywała się poprzez umieszczenie w studzienkach mieszanin o objętości 60  $\mu$ l zawierających białko (BSA, ParE, ClpX, ClpA, ClpY lub Lon) o stężeniu 200 nM w buforze PBS (Materiały 4.3.1) i inkubowałem przez 1h. Następnie oczyszczałem studzienki poprzez usuwanie mieszaniny i dwukrotne przemycie buforem WA (Materiały 4.3.1) oraz pozostawiane w tym buforze na okres 1h w celu zablokowania wolnych powierzchni studzienki. Po tym czasie płukałem studzienki buforem WB (Materiały 4.3.1), a następnie do studzienek dodawałem rosnące ilości białka ParD: 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng, 2000 ng, 4000 ng w buforze WB. Po inkubacji z białkiem ParD (30 min.) płytki płukałem jednokrotnie buforem WB i trzykrotnie buforem WA, następnie do dołków dodałem 100  $\mu$ l roztworu mysich, poliklonalnych przeciwciał anti-ParD (1:500 w buforze WA). Płytki inkubowałem z przeciwciałami przez 2h i płukałem trzykrotnie buforem WA. Następnie dodałem 100  $\mu$ l drugorzędowych przeciwciał anti-mysich koniugowanych z peroksydazą chrzanową (HRP) i inkubowałem 45 min. Po inkubacji trzykrotnie płukałem płytki buforem WA. Reakcja będąca wynikiem przekształcenia substratu w barwny produkt przez peroksydazę pozwalała na względną ocenę ilości białka ParD oddziałującego z poszczególnymi, immobilizowanymi białkami. Reakcja barwna była wywoływana za pomocą zestawu substratów TMB Peroxydase EIA (BioRad) wg instrukcji producenta. Po przerwaniu reakcji 4N kwasem siarkowym dokonywałem pomiaru absorpcji przy 450 nm w czytniku płytek ELISA.

### **5.17 Test EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Próbki DNA były przygotowane przez znakowanie DNA znacznikiem Alexa-555 (Materiały 4.9) przy użyciu terminalnej transferazy (TdT) (promega) tak jak wcześniej opisano w pracy (Kolotka i wsp., 2008) dla Cy3-dCTP. Dwuniciowy DNA zawierający fragment *pparDE*



otrzymałem w trakcie reakcji PCR używając specyficznych starterów (Materiały 4.2.2) i plazmidu RK2 (Materiały 4.1) jako matrycy. Mieszanina reakcyjna o objętości 15  $\mu$ l zawierała fluorescencyjnie znakowany DNA i wzrastające stężenie ParD w buforze do oddziaływania białko-DNA (Materiały 4.3.1). Reakcja przeprowadzałem przez 20 min w 32°C. Po inkubacji dodawałem Ficoll 4000 do 2,5% (v/v) i całość nanosiłem na 5% żel poliakrylamidowy. Rozdział przeprowadzałem w buforze TBE (Materiały). Wyniki obrazowałem przy użyciu ChemiDoc MP (Bio-Rad).

## **5.18 Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR)**

Doświadczenia prowadzone z wykorzystaniem zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonowego pozwalają na badanie oddziaływań ligand-substrat zachodzących w czasie rzeczywistym, a także na wyznaczenie parametrów kinetycznych takich oddziaływań. Ligand immobilizuje się na powierzchni sensora pokrytego warstwą złota i warstwą dekstranu. Następnie na powierzchnię sensora nastrzykuje się roztwór substratu. Urządzenie, takie jak użyty w czasie realizacji niniejszej pracy Biacore 2000 (Materiały 4.10), wykrywa przyrost masy na powierzchni sensora będący wynikiem oddziaływania ligand-substrat. Przyrost masy wyraża się w jednostkach RU (ang. response units, jednostki odpowiedzi) i jest określany na podstawie zmiany intensywności wiązki promieniowania elektromagnetycznego odbitego od warstwy złota. 1 RU odpowiada 1 pg substratu na 1 mm<sup>2</sup> powierzchni sensora. Zmiana intensywności promienia odbitego jest sumą zmian długości fali i kąta odbicia tego promienia. Wynik pomiaru przedstawiony jest w postaci sensorgramu, który jest wykresem obrazującym zmiany mierzonego sygnału w czasie. Sensorgram składa się z trzech części odpowiadających fazom asocjacji, dysocjacji i regeneracji. W pierwszej fazie następuje wiązanie substratu do liganda immobilizowanego na powierzchni sensora, następnie oddysocjowanie substratu, a każdy cykl kończy faza regeneracji powierzchni sensora.

### **5.18.1 Analiza oddziaływań typu białko-białko**

Analizę oddziaływania pomiędzy białkami ClpA, ParE, ParD wykonywałem na sensorze CM5. Białko immobilizowałem na jego powierzchni za pomocą procedury sprzęgania aminowego (ang. amine coupling). Aktywacja powierzchni sensora odbywała się przez nastrzyk 100  $\mu$ l buforu aktywacyjnego SEN (Materiały 4.3.1) przy prędkości przepływu 10  $\mu$ l/min. Następnie nastrzykiwałem białko w stężeniu 10-50 ng/ $\mu$ l w buforze octanowym o pH 5,5. Immobilizację kontynuowałem do uzyskania sygnału około 7000, 900 i 700 RU dla kolejno ClpA, ParE i ParD. Dezaktywację powierzchni sensora wykonałem przez nastrzyk 60

μl 1 M roztworu etylenoaminy pH 8,5. W celu opłukania luźno związanego białka trzykrotnie nastrzykiwałem 5 μl 0,1% roztworu SDS.

W trakcie analiz, białka nastrzykiwałem na sensor w buforze HBS-EP, przy przepływie buforu 15 μl/min. Czas kontaktu w powierzchnią sensora oraz czas dysocjacji analitu wynosiły po 2 minuty. Po fazie dysocjacji powierzchnia sensora była regenerowana przez nastryk 5 μl 0,1% roztworu SDS.

### **5.18.2 Analiza danych SPR**

Wyniki otrzymane w postaci sensorgramów i analizowałem z wykorzystaniem oprogramowania BIAevaluation Software™ Ver 2.1. Sensorgramy doświadczalne tworzyłem przez odjęcie sygnału sensorgramu uzyskanego dla kanału kontrolnego nie zawierającego immobilizowanego ligandu od sygnału uzyskiwanego dla kanału z ligandem. Ponadto, od sensorgramów uzyskanych po nastryku analitów na kanał z ligandem odejmowałem sensorgramy uzyskane po nastryku na ten kanał takiej samej objętości odpowiedniego buforu, w którym znajdował się dany analit.

## **5.19 Analiza stabilności białka *in vivo***

Bakterie szczepów C600, SG22099, ATC12017, SG22080, SG12065 transformowałem plazmidami pBAD24\_ParD lub pAS12 oraz pRR46. Bakterie hodowałem przez noc z wytrząsaniem w pożywce LB z ampicyliną lub ampicyliną i kanamycyną w temperaturze 30°C. 1 ml hodowli nocnej przenosiłem do 50 ml nowej pożywki LB z ampicyliną lub ampicyliną i kanamycyną i hodowałem z wytrząsaniem w temperaturze 30°C do osiągnięcia  $OD_{600} \approx 0,6$ . Indukowałem nadprodukcję białka ParE przez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM, lub nadprodukcję białka ParD przez dodanie arabinozy do stężenia 0,2%. Po upływie 60 min. od indukcji zatrzymywałem syntezę białek przez dodanie tetracykliny w stężeniu 50 μg/ml, hodowle kontynuowana. W momencie dodania tetracykliny oraz po 10, 20, 40, 60 i 120 minutach, z hodowli pobierałem próbki zawierające liczbę bakterii, odpowiadającą 1 ml hodowli o  $OD_{600} = 0,075$ . Bakterie z próbek osadziłem przez wirowanie (14000 obr/min, 30 sek.) a następnie zawiesiłem w 10 μl 1x stężonego buforu Laemmli. Próbki rozdziałałem na 12,5% żelu poliakrylamidowym (Metody 5.9), a wyniki rozdziału analizowałem metodą Western Blotting (Metody 5.11) z użyciem przeciwciał anti-ParD lub anti-ParE. Otrzymany obraz analizowałem densytometrycznie przy użyciu programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin)

## 5.20 Określenie liczby komórek w komorze Petroffa-Hausera

Hodowle bakterii szczepów C600, SG22099, KT2440, AD247, NA1000 i UJ838 niosące plazmid pBBR1-MCS5 prowadziłem w pożywce LB z dodatkiem gentamycyny do osiągnięcia  $OD_{600} \approx 0,6$ . Następnie z hodowli pobierałem próbkę o objętości 5  $\mu$ l i umieszczano w komorze Petroffa-Hausera. Komora ma kształt kwadratu o powierzchni 1  $mm^2$  i jest podzielona na 25 kwadratowych pól o boku długości 200  $\mu$ m. Każde z pól jest podzielone na 16 sektorów w kształcie kwadratów o boku 50  $\mu$ m, czyli każdy sektor ma powierzchnię 1/400  $mm^2$ . Próbkę umieszczoną w komorze obserwowałem z wykorzystaniem mikroskopu OLYMPUS BX51 i zliczałem ilość komórek z 16 losowych sektorów. Uśredniona wartość ze zliczeni była mnożona przez  $2 \times 10^7$ , aby otrzymać liczbę komórek w 1 ml hodowli. Otrzymana wartość była przeliczana na 1 ml hodowli o  $OD_{600} \approx 1$  z uwzględnieniem rzeczywistej gęstości optycznej analizowanej hodowli.

## 5.21 Analiza stabilności plazmidu

Całoczną hodowlę bakterii zawierających badany plazmid odmładzałem w stosunku 1:50 w pożywce LB lub PYE zawierającej odpowiednie antybiotyki i hodowałem w temp. 27, 30, 32 lub 37°C do uzyskania  $OD_{600} \approx 0,1-0,6$ . Następnie odmładzałem hodowlę bakteryjną w pożywce LB lub PYE niezawierającej antybiotyku i kontynuowałem hodowlę do uzyskania  $OD_{600} \approx 0,1-0,6$ . Cykle odmładzania i hodowli prowadzono przez określoną liczbę generacji. Podczas odmładzania wykonywałem rozcieńczenia seryjne hodowli. Przyjmując, że 1 ml hodowli o  $OD_{600} = 1$  zawiera odpowiednią liczbę bakterii obliczoną przy pomocy komory Petroffa-Hausera (Metody 5.20), tak aby na podłoże LA lub agar PYE nie zawierające antybiotyku wysiano ilości bakterii odpowiadające teoretycznie 100-200 komórek. Płytki inkubowałem 24h w 30°C. Z uzyskanych na płytkach kolonii przygotowywałem repliki na podłoże stałe LA lub agar PYE z odpowiednim antybiotykiem, lub bez dodatku antybiotyku (Lederberg i Lederberg, 1952). Odsetek komórek zawierających plazmid stanowił stosunek liczby kolonii, które wyrosły na podłożu z antybiotykiem do liczby kolonii, które wyrosły na podłożu bez jego dodatku. Utratę plazmidu na generację liczyłem na podstawie wzory  $(1 - \sqrt[n]{F_t/F_i}) \times 100$ , gdzie  $F_t$  to frakcja komórek, które posiadały plazmid po czasie  $t=x$ ,  $F_i$  to frakcja komórek posiadający plazmid w czasie  $t=0$ . Liczba generacji była obliczana na podstawie wartości  $OD_{600}$  hodowli w oparciu o wzór:  $N_0 = \frac{C_{OD600}}{2^n}$  gdzie  $C_{OD600}$  to liczba komórek w czasie  $t=x$ ,  $N_0$  to liczba komórek w czasie  $t=0$ ,  $n$  to liczba generacji.

## 5.22 Analiza statystyczna otrzymanych wyników

Dla porównania czy dwa zestawy wyników są statystycznie różne od siebie użyłem dwustronnego homoskedastycznego testu T-studenta. Wartość P obliczałem z wyników otrzymanych z trzech powtórzeń każdego analizowanego eksperymentu. Wartość P mniejsza lub równa 0,05 była brana przeze mnie jako statystycznie istotna. Wszystkie obliczenia wykonywałem w programie Microsoft Excel. Wyniki analizy umieściłem w kolejnych tabelach.

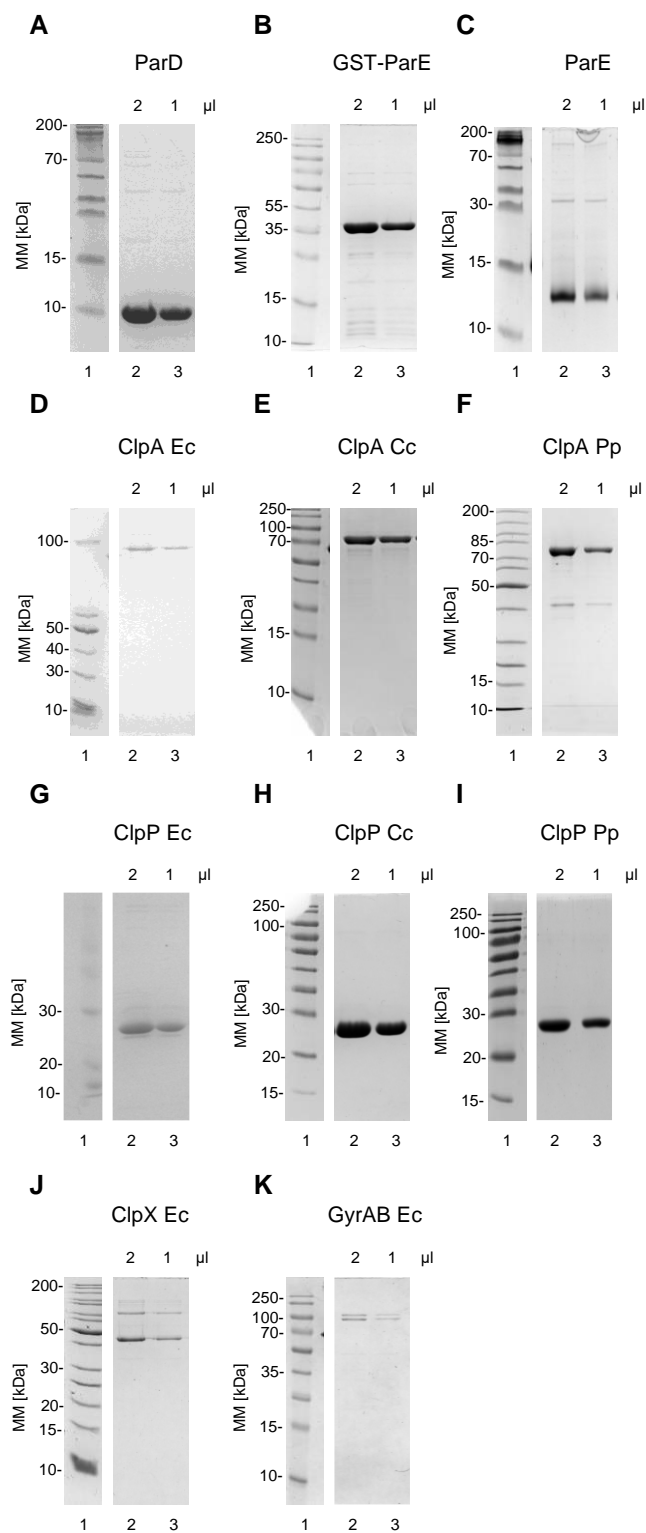
## 5.23 Analiza struktur białek i kompleksów nukleoproteinowych systemu *parDE*

Modele kompleksów ParD<sub>2</sub>, ParE<sub>2</sub> i ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> uzyskano na podstawie modelowania homologicznego przy użyciu programu RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>). Dla homodimeru ParD użyto struktury PDB:2AN7 zdeponowanej na <http://www.rcsb.org> (Oberer i wsp., 2007). Dla homodimeru ParE i heterotetrameru ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> użyto struktury PDB:3KXE zdeponowanej na <http://www.rcsb.org> (Dalton i Crosson, 2010). Do dokowania ParD do DNA wykorzystano model dimeru antytoksyny uzyskany w wyniku modelowania homologicznego. Modelowanie kompleksów białkowych oraz dokowanie ParD do DNA, zostały wykonane przez dr Urszulę Uciechowską w ramach współpracy wewnątrz ZBM. Oryginalne pliki dodano w formie elektronicznej w postaci załączników 1-4. Do edycji, analizy i superpozycjonowania otrzymanych modeli oraz przygotowania rycin użyłem programu Chimera 1.13.1 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

## 6 Wyniki

### 6.1 Oczyszczanie komponentów białkowych systemu TA *parDE* i proteaz bakteryjnych

Aby zrealizować cel projektu i zidentyfikować czynnik odpowiedzialny za aktywację systemu *parDE*, niezbędne było oczyszczenie białkowych komponentów systemu *parDE* i proteaz bakteryjnych. W doświadczeniach *in vitro* używałem oczyszczonych przez mnie preparatów białek ParD i ParE systemu TA *parDE* plazmidu RK2, proteaz cytozolowych ClpAP, ClpXP, gyrazy GyrAB z *E. coli* oraz proteaz ClpAP z *C. crescentus* i *P. putida*. Wymienione białka uzyskałem w wyniku przeprowadzenia procedur oczyszczania opisanych w rozdziale Metody 5.13. Otrzymałem preparaty o następujących stężeniach końcowych: ParD – 1,87 mg/ml, GST-ParE – 1,34 mg/ml, ParE – 0,9 mg/ml, Ec ClpA – 0,47 mg/ml, Cc ClpA – 0,94 mg/ml, Pp ClpA – 0,73 mg/ml, Ec ClpP – 1,2 mg/ml, Cc ClpP – 1,54 mg/ml, Pp ClpP – 1,03 mg/ml, Ec ClpX – 0,5 mg/ml, Ec GyrAB – 0,08 mg/ml (Ryc. 4). Pozostałe wykorzystane przez mnie białka pochodziły z kolekcji ZBM.



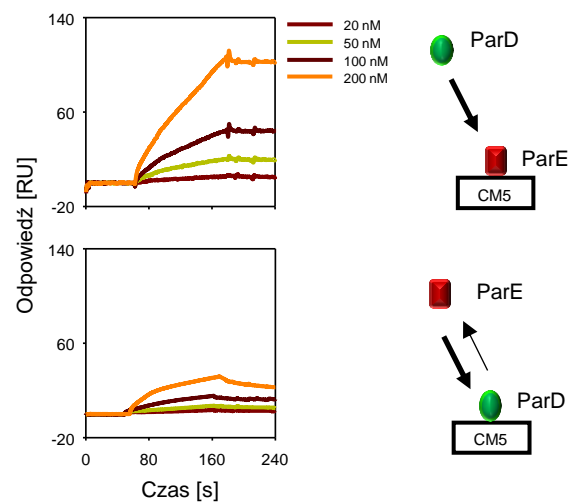
**Rycina 4. Analiza elektroforetyczna uzyskanych preparatów białek: (A) ParD, (B) GST-ParE, (C) ParE, (D) ClpA *E. coli*, (E) ClpA *C. crescentus*, (F) ClpA *P. putida*, (G) ClpP *E. coli*, (H) ClpP *C. crescentus*, (I) ClpP *P. putida*, (J) ClpX *E. coli*, (K) GyrAB *E. coli* uzyskanych w wyniku oczyszczania metodami chromatograficznymi (Metody 5.13). Na żele SDS-PAGE naniesiono odpowiednio: ścieżka 1 Marker Masowy, ścieżka 2 po 2 µl preparatów, ścieżki 3 po 1 µl preparatów.**

## 6.2 Analiza aktywności oczyszczonych komponentów systemu TA *parDE*

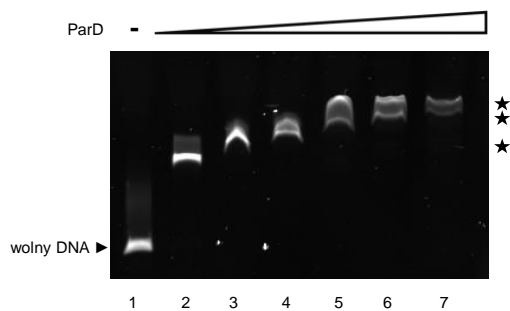
Wykonałem testy pozwalające sprawdzić czy oczyszczone przez mnie komponenty białkowe systemu *parDE* wykazują właściwości opisane we wcześniejszych pracach. Aby sprawdzić oddziaływanie pomiędzy toksyną ParE i antytoksyną ParD, wykonałem analizę SPR (Metody 5.18). W tym celu na zimmobilizowane na sensorze białko ParE nastrzykiwałem białko ParD o

wzrastających stężeniach (Ryc. 5 panel górny). Wyniki pokazały, że oddziaływanie pomiędzy białkami ParD i ParE jest silne. Świadczą o tym, szybkość asocjacji ParD do ParE i brak rozpadu uformowanego kompleksu po zakończeniu nastrzyku. Analizę wykonałem również dla zimmobilizowanego na sensorze białka ParD (Ryc. 5 panel dolny). W tym przypadku także obserwowałem wzrost odpowiedzi na sensorze i uformowanie stabilnego kompleksu również po zakończeniu nastrzyku.

We wcześniejszej pracy udowodniono, że białko ParD wiąże się do sekwencji promotorowej operonu *parDE* (Roberts i wsp., 1993). Dla potwierdzenia tego oddziaływania wykorzystałem doświadczenie typu EMSA (Metody 5.17). Do analizy użyłem dwuniciowego DNA otrzymanego z reakcji PCR (Metody 5.2), w której matrycą był plazmid RK2 (Materiały 4.2.1) posiadający operon *parDE*. W reakcji użyłem dwóch starterów: ParD\_BS\_fw i ParD\_BS\_rev (Tab. 1), zaprojektowanych tak, aby 400 nukleotydowy fragment powielonego DNA zawierał miejsce wiązania ParD (5'-CCTCACGCCACATATGTGCTAATGTGGTTACG-3'), z palindromową sekwencją CACAT/ATGTG (Roberts i wsp., 1993). Następnie otrzymany fragment DNA znakowałem używając znacznika Alexa Fluor-555 (Metody 5.17). Tak przygotowany DNA użyłem w eksperymencie. Otrzymane wyniki pokazały wiązanie białka ParD do promotorowego fragmentu DNA, co obserwowałem poprzez opóźnienie migracji DNA w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 6).

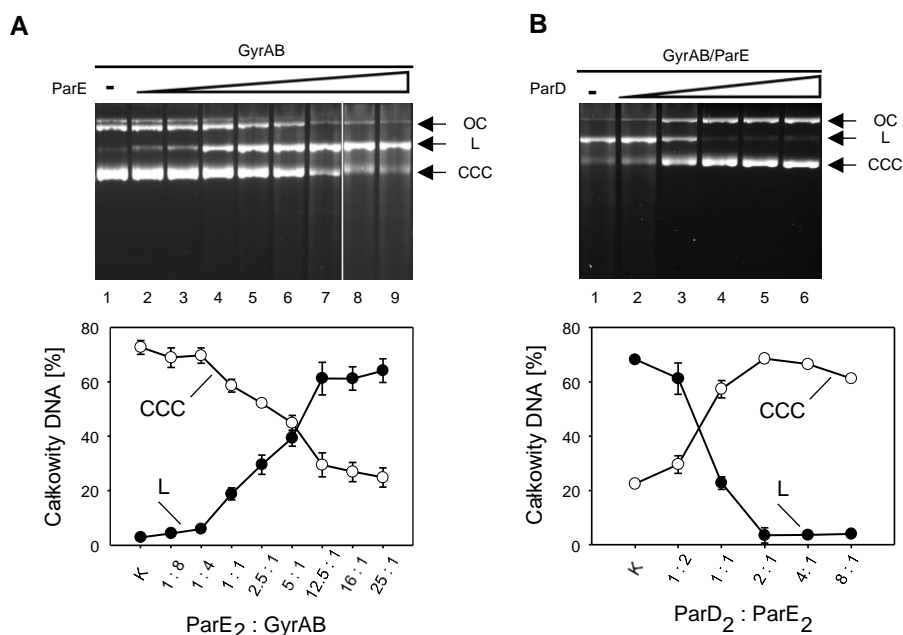


**Rycina 5. Analiza oddziaływania pomiędzy białkami ParD i ParE przy użyciu SPR.** Eksperyment został wykonany tak jak opisano w rozdziale Metody 5.18. ParE (panel górny) i ParD (panel dolny) zostały zimmobilizowane na powierzchni sensora CM5. Białka ParD (panel górny) lub ParE (panel dolny) o następujących stężeniach (20, 50, 100, 200 nM) nastrzyknięto na sensor. Wyniki zostały przedstawione w postaci sensogramów zależności przyrostu masy [RU] od czasu.



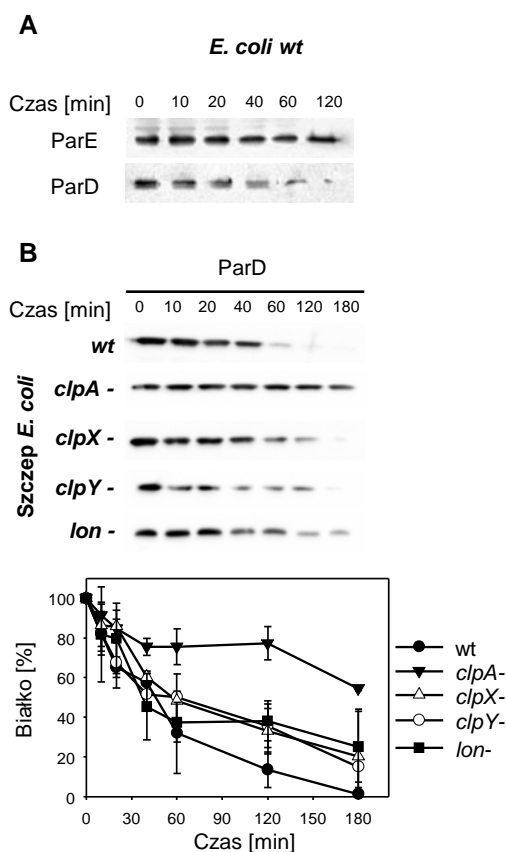
**Rycina 6. Wiązanie antytoksyny ParD do DNA.** Analizę oddziaływania pomiędzy ParD i DNA *p<sub>parDE</sub>* (fragment zawierający promotor *parDE*) przeprowadzono z wykorzystaniem techniki EMSA (Metody 5.17). Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej znakowany fluorescencyjnie fragment DNA *p<sub>parDE</sub>* (2.45 pmola) dodano antytoksynę ParD o wzrastających stężeniach (ścieżki 2-7: 20, 41, 102, 205, 620, 1640 pmola kolejno). Jako kontroli negatywnej użyto wyznakowanego fragmentu *p<sub>parDE</sub>* bez ParD (ścieżka 1). Wolny DNA oznaczono strzałką (▶), kompleksy DNA-ParD oznaczono gwiazdkami (★). Opóźnienie migracji w żel poliakrylamidowym obserwowano przy użyciu detekcji fluorescencji.

Dowiedziano że celem komórkowym toksyny ParE jest gyraza *E. coli* GyrAB (Jiang i wsp., 2002). Gyraza należy do topoizomeraz II i jest odpowiedzialna za wprowadzanie ujemnych superzwnięć na chromosomie bakteryjnym. Aktywność gyrazy jest niezbędna do utrzymania właściwej konformacji chromosomalnego DNA. Podczas replikacji chromosomalnego DNA gyraza przeciwdziała powstaniu naprężeń, wywołanych rozplataniem dupletu DNA przez helikazę wraz propagacją oczka replikacyjnego. Pokazano, że obecność toksyny ParE hamuje replikację DNA *in vitro* a dodanie ParE do mieszaniny reakcyjnej w trakcie testu aktywności gyrazy powoduje powstanie uszkodzonej liniowej formy DNA (Jiang i wsp., 2002).



**Rycina 7. Toksyna ParE hamuje aktywność gyrazy GyrAB, a antytoksyna ParD przeciwdziała temu efektowi.** Test aktywności gyrazy wykonano tak jak pisano w rozdziale Metody 5.14. **(A)** Badanie aktywności toksyny ParE. Jako substratu dla GyrAB, o stałym stężeniu (200 ng) użyto zamkniętej formy plazmidowego DNA pKD19L (300 ng), a następnie dodano białko ParE o wzrastających stężeniach (ścieżki 2-9: kolejno 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ng). Jako kontroli użyto mieszaniny reakcyjnej bez obecności toksyny ParE (ścieżka 1). **(B)** Badanie aktywności antytoksyny ParD. Do GyrAB (200 ng), ParE (500 ng) i pKD19L (300 ng) dodano białko ParD o wzrastających stężeniach (ścieżki 2-6: kolejno 320, 640, 1280, 2560, 5120 ng). Jako kontroli użyto mieszaniny reakcyjnej bez antytoksyny ParD (ścieżka 1). Każdy eksperyment został wykonany trzy razy, a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy ilości DNA w formie zamkniętej CCC (ang. covalently closed circular) i formie liniowej L (ang. linear) w stosunku do całkowitej ilości DNA, zostały przedstawione na wykresie densytometrycznej (Metody 5.8).

Natomiast dodanie antytoksyny ParD do reakcji niweluje działanie toksyny (Jiang i wsp., 2002). Aby potwierdzić czy oczyszczone przeze mnie białka ParE i ParD wykazuje swoje właściwości, wykonałem testy aktywności gyrazy (Metody 5.14). Jako substratu dla gyrazy użyłem wyizolowanego przeze mnie plazmidu pKD19L (Materiały 4.2.1) w superzwiniętej formie (Metody 5.1). Jako pierwszą sprawdziłem aktywność toksyny ParE względem gyrazy GyrAB. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej stałe stężenie gyrazy i DNA, dodawałem toksynę ParE o wzrastających stężeniach. W wyniku zwiększania się stosunku ParE do GyrAB, zauważyłem powstanie niewłaściwej liniowej formy DNA. Świadczyło to o blokowaniu aktywności ligacyjnej gyrazy GyrAB przez toksynę ParE. Już w stosunku ilościowym 1:1 ParE do GyrAB zaobserwowałem powstanie niewłaściwej formy DNA, a w stosunku 5:1 ParE do GyrAB około 50% DNA po reakcji znajdowało się w formie liniowej (Ryc. 7A). Żeby sprawdzić aktywność antytoksyny ParD wykonałem eksperyment analogiczny do poprzedniego. Do mieszaniny reakcyjnej zawieranej stałe stężenia białek ParE, GyrAB oraz DNA, dodawałem białko ParD o wzrastających stężeniach. W tym wypadku początkowo zablokowana gyraza odzyskała swoją aktywność i wraz ze wzrostem stężenia antytoksyny ParD zaobserwowałem odtworzenie superzwiniętej formy DNA po zatrzymaniu reakcji. Największy efekt przywrócenia aktywności gyrazy obserwowałem, kiedy stosunek toksyny ParE do antytoksyny ParD wynosił 1:1 (Ryc. 7B).



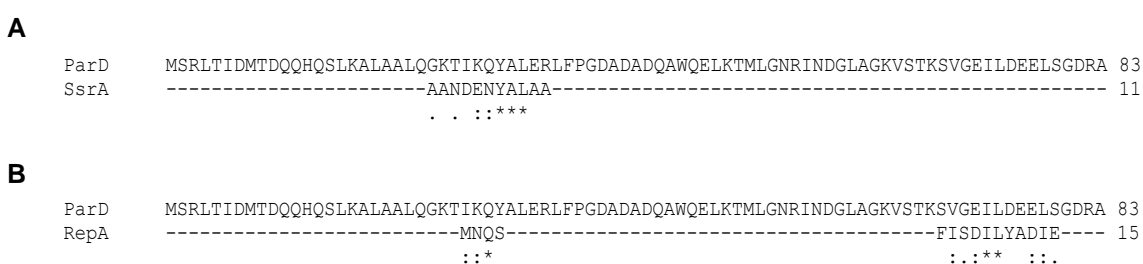
**Rycina 8. Stabilność antytoksyny ParD *in vivo* jest większa w szczepie *E. coli* z inaktywacją genu *clpA*.** (A) Stabilność antytoksyny ParD i toksyny ParE w czasie. Szczepu *E. coli* C600 był transformowany odpowiednimi plazmidami w celu nadprodukcji białka ParD (pBAD24-ParD), lub ParE (pRR46 i pAS12). Próbkę były pobierane z hodowli w wyznaczonych punktach czasowych. Za czas t=0 przyjęto dodanie tetracykliny do hodowli. (B) Stabilność białka ParD była sprawdzana w komórkach *E. coli* C600 typu dzikiego wt (●), i mutantach *clpA*(-) (▼), *clpX*(-) (Δ), *clpY*(-) (○), i *lon*(-) (■) niosących plazmid do nadprodukcji białka ParD pBAD24-ParD. Próbkę były pobierane z hodowli w wyznaczonych punktach czasowych. Za czas t=0 przyjęto dodanie tetracykliny do hodowli. Ilość białka ParD lub ParE była sprawdzana z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał techniką Western Blotting (Metody 5.11). Każdy eksperyment wykonano trzy razy, a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie (Metody 5.19). Dane liczbowe i wartości P znajdują się w Tabeli 2 (Metody 5.22).



Wykonane przeze mnie doświadczenia wykazały, iż oczyszczone w tej pracy białka posiadały aktywności, opisane we wcześniejszych publikacjach.

### 6.3 Proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za degradację białka ParD

Ponieważ stabilność antytoksyny ParD i potencjalna proteaza odpowiedzialna za jej degradację nie zostały poznane, wykonałem testy stabilności białka ParD *in vivo* w szczepie *E. coli* C600. W tym celu plazmid pBAD24\_ParD, służący do ekspresji genu *parD* pod kontrolą promotora arabinozowego, wprowadziłem do komórek *E. coli*. Testy stabilności białka ParD (Ryc. 8) wykonałem tak, jak opisano w rozdziale Metody 5.19. Godzinę po indukcji nadprodukcji białka ParD zatrzymywałem translację białek poprzez dodanie do hodowli bakteryjnej tetracykliny (czas  $t=0$ ). Próbkę z hodowli zbierałem w wyznaczonych punktach czasowych. Następnie przeprowadziłem analizę Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-ParD. Po upływie 120 min zaobserwowałem znaczący ubytek białka ParD (Ryc. 8A). Testy stabilności białka ParD zostały również wykonane w szczepach z inaktywowanym genem proteazy *lon(-)* lub podjednostkami AAA+ proteaz *clpA(-)*, *clpX(-)*, *clpY(-)* (Materiały 4.1). Jedynie dla szczepu z inaktywacją genu *clpA(-)* zauważyłem znaczący wzrost stabilności białka ParD (Ryc. 8B) (wartość  $p=1,3 \times 10^{-3}$ ) (patrz Tab. 2). Dla szczepu *lon(-)* również zaobserwowałem wzrost stabilności białka ParD (Ryc. 8B), jednak analiza statystyczna nie potwierdziła istotności tego wyniku (Tab. 2). Wyniki te sugerują, że to proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za wydajną proteolizę białka ParD.



**Rycina 9. Porównanie sekwencji antytoksyny ParD z sekwencjami motywów rozpoznawanych przez ClpA w białkach SsrA i RepA.** Dopasowanie sekwencji wykonano przy użyciu narzędzi Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). **(A)** Sekwencja antytoksyny ParD była porównywana z motywem AANDENYALAA znajdującym się w białku SsrA (1-11 aa) **(B)** i motywem MNQSFISDILYADIE znajdującym się w białku RepA (1-15 aa), które są rozpoznawane przez białko ClpA. [\*] (gwiazdka) wskazuje pozycję z pojedynczą, w pełni konserwowaną resztą; [:] (dwukropek) wskazuje pozycję z resztą o bardzo podobnych właściwościach; [.] (kropka) wskazuje pozycję z resztą o małym podobieństwie.

Aby sprawdzić czy antytoksyna ParD zawiera motywy rozpoznawane przez białko opiekuńcze ClpA, przeanalizowałem jej sekwencję aminokwasową i porównałem ze znanymi

substratami proteazy ClpAP. Analiza sekwencji wykazała, że w rzeczywistości antytoksyna ParD posiada dwa domniemane motywy rozpoznawane przez podjednostkę AAA+ ClpA proteazy ClpAP. Jeden motyw wcześniej zdefiniowany dla białka RepA (Hoskins i wsp., 2000; Hoskins i wsp., 2002) znajduje się w C-końcowej części białka, a drugi który jest podobny do motywu z białka SsrA (Weber-Ban i wsp., 1999) znajduje się bliżej N-końca (Ryc. 9).

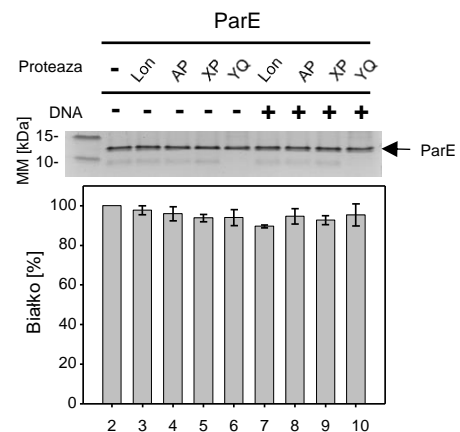
#### 6.4 Białko ParE jest stabilne w komórkach gospodarza

Aby sprawdzić czy toksyna ParE jest degradowana w komórkach *E. coli*, wykonałem analizę stabilności *in vivo* w szczepie C600. W czasie 120 min. nie zauważyłem spadku ilości białka ParE w komórkach *E. coli* (Ryc. 8A). Wykonałem również testy stabilności toksyny *in vitro* z wykorzystaniem proteaz *E. coli*: Lon, ClpAP, ClpXP i ClpYQ (Ryc. 10). Żadna z wyżej wymienionych proteaz nie była w stanie degradować ParE, w zastosowanych warunkach eksperymentalnych.

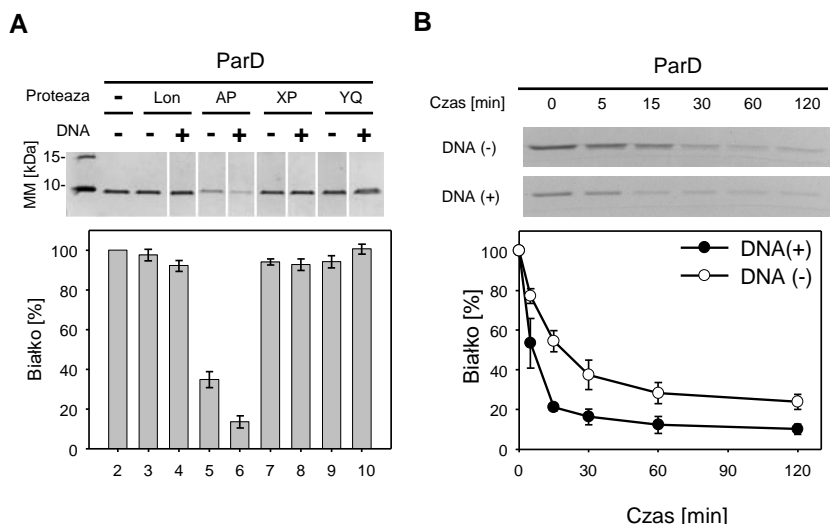
#### 6.5 DNA stymuluje proteazę ClpAP do degradacji ParD

Podjednostka ClpA proteazy ClpAP jest odpowiedzialna za rozpoznawanie i ATP-zależne rozwijanie oraz translokację substratu do centralnego kanału podjednostki proteolitycznej ClpP (Grimaud i wsp., 1998; Maglica i wsp., 2008). Wcześniejsze wyniki pokazały, że proteaza

ClpAP jest zdolna do wiązania DNA i ponadto, oddziaływanie ClpAP-DNA zwiększa aktywność ATPazową proteazy i wydajność proteolizy (Kubik i wsp., 2011). Aby sprawdzić, czy w przypadku proteolizy ParD, obecność DNA wpływa na wydajność reakcji, wykonałem proteolizy *in vitro* z użyciem proteaz *E. coli* Lon, ClpAP, ClpXP i ClpYQ w obecności lub braku DNA (Metody 5.15). Znaczący spadek ilości białka ParD obserwowałem tylko, gdy w mieszaninie reakcyjnej była użyta proteaza ClpAP (Ryc. 11A ścieżka 5 i 6).

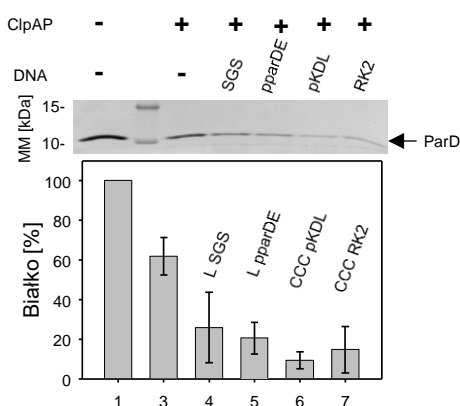


**Rycina 10. Reakcja proteolizy *in vitro* toksyny ParE przez proteazy *E. coli*.** Białko ParE (1,5 µg) dodano do mieszanin reakcyjnych zawierających proteazy Lon (ścieżka 3 i 7), ClpAP (ścieżka 4 i 8), ClpXP (ścieżka 5 i 9), i ClpYQ (ścieżka 6 i 10). Reakcje zostały przeprowadzone bez DNA (ścieżki 3-6), oraz w obecności superzwiniętej formy plazmidowego DNA pKD19L (300 ng) (ścieżki 7-10). Kontrola negatywna, bez dodatku proteazy (ścieżka 2). Marker Masowy (ścieżka 1). Eksperyment był prowadzony przez 120 min. Reakcje przeprowadzono tak jak opisano w rozdziale Metody 5.15. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie.



**Rycina 11. Białko ParD jest degradowane przez proteazę ClpAP z *E. coli*.** (A) Reakcja proteolizy *in vitro* białka ParD przez proteazy Lon (ścieżki: 3 i 4), ClpAP (ścieżki: 5 i 6), ClpXP (ścieżki: 7 i 8), i ClpYQ (ścieżki: 9 i 10). Reakcje zostały przeprowadzane w obecności superzwiniętej formy plazmidowego DNA pKD19L (300 ng) (ścieżki: 4, 6, 8, 10) lub bez DNA (ścieżki: 3, 5, 7, 9). Kontrola negatywna, bez dodatku proteazy (ścieżka 2). Marker Masowy (ścieżka 1). Eksperyment był prowadzony przez 120 min. (B) Porównanie tempa degradacji ParD przez ClpAP w obecności (●) albo bez (○) DNA. Mieszanina reakcyjna z ClpAP i z DNA lub bez DNA była preinkubowana przez 5 min, po czym dodano ParD. Reakcje zatrzymano w wyznaczonych punktach czasowych przez dodanie 8  $\mu$ l buforu 4x Laemmli. Eksperymenty wykonano tak jak opisano w rozdziale Metody 5.15. Każdy eksperyment wykonano trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) zostały przedstawione na wykresie. Dane liczbowe i wartości P znajdują się w Tabeli 3 (Metody 5.22).

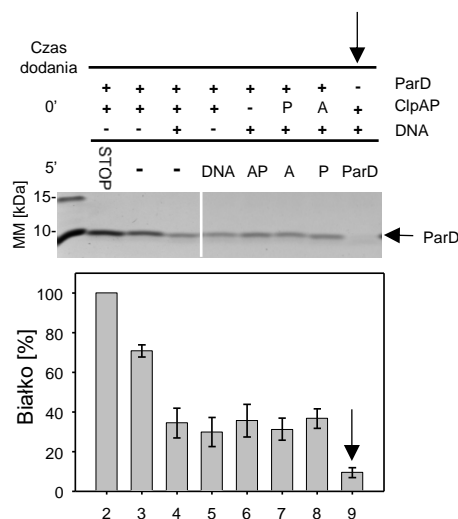
Zauważyłem również, że obecność superzwiniętej formy plazmidowego DNA, zwiększyła skuteczność proteolizy (ryc. 11A ścieżka 6). Aby określić dynamikę degradacji ParD przez ClpAP, wykonałem eksperyment proteolizy w czasie. Analizę przeprowadziłem w obecności i bez DNA w mieszaninach reakcyjnych (Ryc. 11B). Analiza wykazała, że w obecności DNA około 50% ubytek ilości antytoksyny ParD następuje w czasie krótszym niż 5 min od momentu rozpoczęcia reakcji. W przypadku, kiedy mieszanina reakcyjna nie zawierała DNA czas potrzeby do degradacji 50% ilości ParD był trzykrotnie dłuższy. Wyniki analizy danych statystycznych z eksperymentu proteolizy w czasie przedstawiłem w Tabeli 3.



**Rycina 12. Porównanie tempa degradacji ParD przez ClpAP z *E. coli* w obecności różnych rodzajów DNA.** Białko ParD (1.5  $\mu$ g) było inkubowane z ClpAP i 300 ng DNA: zawierającym sekwencję wiązania gyrazy SGS (ang. Specific Gyrase Side) (360 pz), linowa forma DNA (L) (ścieżka 4), z fragmentem promotorowym operonu *parDE* (*p<sub>parDE</sub>*) (400 pz), linowa forma DNA (L) (ścieżka 5), plazmidem pKD19L (9.1 kpz) superzwinięta forma DNA (CCC) (ścieżka 6) i plazmidem RK2 (60 kpz), superzwinięta forma DNA (CCC) (ścieżka 7). Kontrola negatywna, reakcja zatrzymana w czasie 0 (ścieżka 1), kontrola reakcji bez DNA (ścieżka 3). Marker Masowy (ścieżka 2). Reakcje była prowadzona przez 30 min. Eksperymenty wykonano tak jak opisano w rozdziale Metody 5.15. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie.

Żeby dokładniej zbadać wpływ DNA na degradację ParD, podczas proteolizy użyłem różnych wariantów DNA. W tym celu wykorzystałem liniową i superzwiniętą formę DNA oraz DNA zawierający lub niezawierający sekwencji *pparDE* (białko ParD wiąże się w miejscu promotorowym operonu *parDE* (Roberts i wsp., 1993)) (Ryc. 12). We wszystkich przypadkach, w których dodałem DNA do proteolizy, zaobserwowałem znaczny wzrost wydajności reakcji w stosunku do proteolizy prowadzonej bez obecności DNA. Sugeruje to, że białko ParD jest wydajnie proteolizowane przez proteazę ClpAP w obecności DNA. Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują, że degradacja ParD jest szybka i stymulowana przez DNA. Forma DNA i obecność sekwencji *pparDE* nie miały znaczenia dla zwiększenia wydajności proteolizy. Aby sprawdzić jaki wpływ na wydajność proteolizy ParD przez ClpAP, ma sposób tworzenia kompleksu proteolitycznego (proteaza, DNA i ParD), wykonałem eksperyment, w którym kolejność dodawania poszczególnych komponentów proteolitycznych była zmienna. W każdym przypadku DNA stymulował degradację substratu, jednak, gdy proteaza ClpAP była preinkubowana z DNA przed dodaniem ParD, stymulacja była najwyższa (Ryc. 13). Ta kolejność składania kompleksu proteolitycznego sugeruje, że to proteaza ClpAP jest stymulowana przez DNA do przetwarzania substratu.

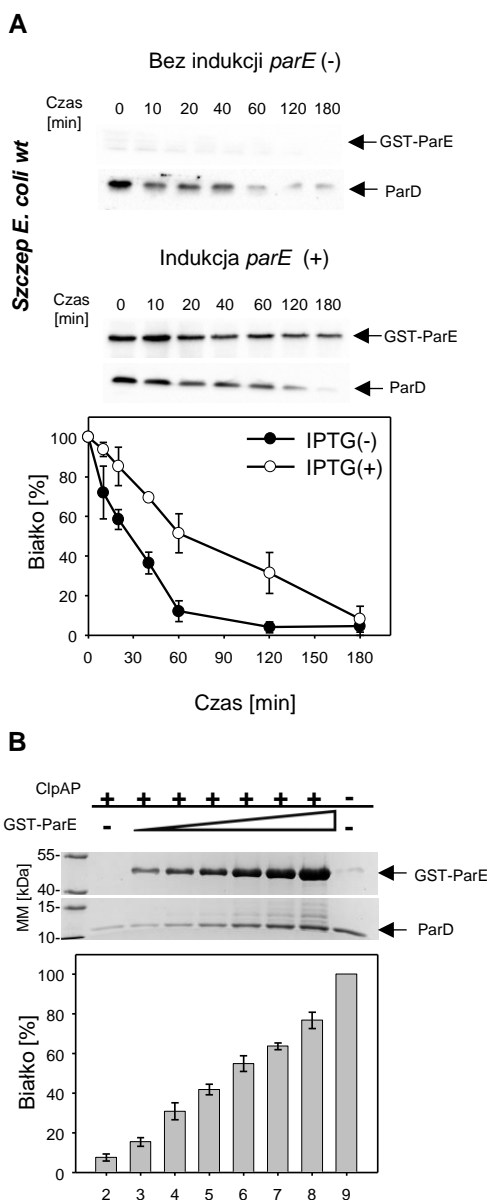
Sprawdziłem również, czy DNA wpływa na proteolizę toksyny ParE przez którąkolwiek z proteaz. Obecność DNA w mieszaninie reakcyjnej nie wpływała na wydajność proteolizy ParE *in vitro* przez żadną z proteaz *E. coli*: Lon, ClpAP, ClpXP, ClpYQ (Ryc. 10).



**Rycina 13. Kolejność dodawania komponentów reakcji proteolizy wpływa na efektywność degradacji ParD przez ClpAP *in vitro*.** Komponenty reakcyjne ParD, pKD19L (oznaczony jako DNA) i podjednostki proteaz ClpA (oznaczona jako A), i ClpP (oznaczona jako P) zostały dodane do mieszaniny reakcyjnej w różnej kolejności. Mieszanina składająca się z dwóch lub więcej komponentów była preinkubowana przez 5 min, a następnie dodawano brakujący komponent, po czym kontynuowano reakcję przez 30 min. (ścieżki 5-9). W ścieżkach 3 i 4 po 5 min. preinkubacji żaden komponent nie został dodany a mieszanina była inkubowana przez 30 min. Reakcja kontrolna została zatrzymana po 5 min. preinkubacji (ścieżka 2). Marker Masowy (ścieżka 1). Najbardziej wydajna reakcja została oznaczona strzałką (↓). Eksperymenty wykonano tak jak opisano w rozdziale Metody 5.15. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie.

## 6.6 Stabilność ParD wzrasta, gdy jest związane z ParE

Aby zbadać jak obecności toksyny ParE wpływa na proteolizę antytoksyny ParD przez ClpAP, przeprowadziłem serię eksperymentów *in vivo* i *in vitro*.

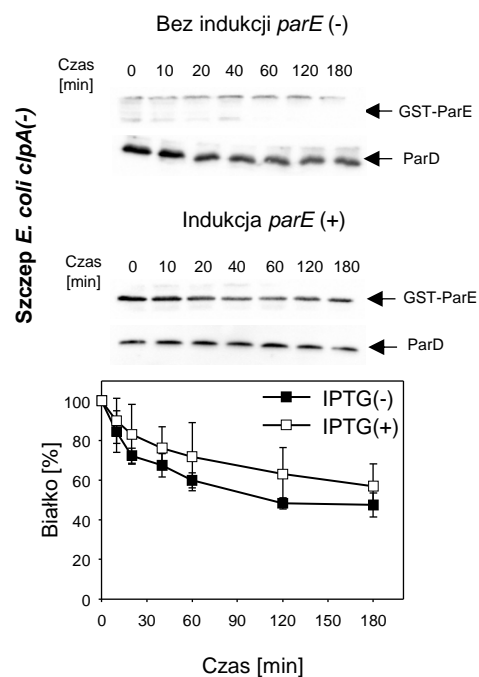


**Rycina 14. ParE chroni ParD przed proteolizą przez ClpAP. (A)** Stabilność ParD w szczepie *E. coli* typu dzikiego, niosącym plazmidy do konstytutywnej produkcji ParD i nadprodukcji GST-ParE (indukowanej IPTG) w obecności (○) oraz bez (●) ParE. Eksperyment był wykonany jak opisano w rozdziale Metody 5.19. Próbkę pobrane z hodowli w określonym czasie były analizowane pod względem obecności ParD i ParE przy użyciu specyficznych przeciwciał anti-ParD i anti-ParE techniką Western Blotting. Za czas  $t=0$  uznaje się dodanie tetracykliny do hodowli. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie. Dane liczbowe i wartości P znajdują się w Tabeli 4 (Metody 5.22). **(B)** Proteoliza ParD (1.5  $\mu$ g) przez proteazę ClpAP w obecności ParE. Białko GST-ParE o wzrastających stężeniach zostało dodane do mieszaniny reakcyjnej (ścieżki 3-8: kolejno 0.2, 0.4, 0.75, 1.5, 3 i 6  $\mu$ g.). W kontroli pozytywnej do mieszaniny reakcyjnej nie dodano ParE (ścieżka 2). W kontroli negatywnej do mieszaniny reakcyjnej nie dodano proteazy (ścieżka 8). Marker Masowy (ścieżka 1). Eksperyment był prowadzony przez 120 min., tak jak opisano w rozdziale Metody 5.15. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy, a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie.

W trakcie eksperymentów *in vivo* szczep *E. coli* C600 został transformowany plazmidem pAS12, który koduje gen *GST-parE* (ekspresja indukowana IPTG) i plazmidem pRR46, z którego ekspresja genu *parD* odbywa się konstytutywnie. Nocne hodowle bakteryjne odmładzałem w stosunku 1:100 w świeżej pożywce LB i równolegle prowadziłem dwie hodowle w temperaturze 37°C. Po osiągnięciu  $OD_{600}=0,6$ , w jednej hodowli indukowałem ekspresję genu *parE* przez dodanie IPTG, natomiast druga hodowla była prowadzona bez dodatku IPTG. Godzinę po indukcji, translacja białek w komórkach gospodarza była hamowana poprzez dodanie tetracykliny. Próbkę pobierałem w wybranych punktach czasowych, gdzie za początek pomiaru (czas  $t=0$ ) uznaje się dodanie tetracykliny do pożywki. Próbkę zbierałem i analizowałem tak jak opisano w sekcji Metody 5.19. Analizę przeprowadziłem używając mysich przeciwciał anti-ParD i anti-ParE. Gdy toksyna ParE

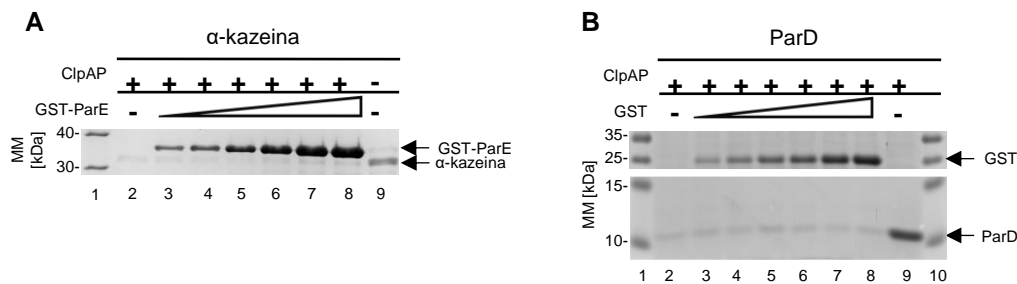
była nadprodukowana w komórkach gospodarza, stabilność antytoksyny ParD wyraźnie wzrastała (Ryc. 14A, analiza statystyczna Tab. 4). Biorąc pod uwagę wielkość białek ParD i ParE oraz czułość użytych przeciwciał, szacowana stechiometria ParD:ParE w lizacie komórkowym po dodaniu tetracykliny (czas  $t=0$ ) wynosiła 1:1. Potwierdza to, że kompleks ParDE może składać się jako heterotetramer ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> (Dalton i Crosson, 2010). Wykonałem eksperymenty *in vitro*, sprawdzające jaki wpływ na proteolizę ParD ma obecność w mieszaninie reakcyjnej białka ParE. Do reakcji dodawałem białko ParE o wzrastających stężeniach. Obecność białka w mieszaninie reakcyjnej analizowałem przy pomocy żelu poliakrylamidowego SDS-PAGE, barwionego błękitem Coomassie. Analiza densytometryczna wykazała, że wydajność proteolizy ParD w obecności ParE spadała wraz ze wzrostem stężenia białka ParE (Ryc. 14B). Szacowana stechiometria ParD:ParE w mieszaninie reakcyjnej wynosiła od 1:0,03 do 1:1 i była porównywalna ze stechiometrią tych białek w testach *in vivo* (Ryc. 14A). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że w przypadku badania stabilności *in vivo* i wydajności proteolizy *in vitro* białka ParD, toksyna ParE miała znaczący wpływ na protekcję antytoksyny. Natomiast toksyna ParE nie miała wpływu na stabilność antytoksyny ParD w szczepie *E. coli clpA(-)*. Niezależnie czy nadprodukcja ParE była indukowana w trakcie hodowli przez dodanie IPTG, czy do hodowli nie dodawałem IPTG, nie zaobserwowałem żadnych znaczących różnic w stabilności antytoksyny ParD (Ryc. 15). Wynik ten potwierdził rolę proteazy ClpAP w degradacji ParD.

Sprawdziłem również czy obecność toksyny ParE ma wpływ na aktywność proteazy ClpAP względem innych substratów. W tym celu w obecności ParE wykonałem proteolizę  $\alpha$ -kazeiny, która jest substratem ClpAP. Toksyna ParE nie miała wpływu na aktywność ClpAP



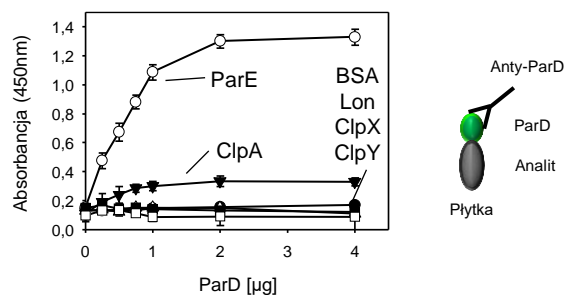
**Rycina 15. ParE nie ma wpływu na stabilność ParD w szczepie *E. coli* z inaktywacją genu *clpA*.** Stabilność ParD *in vivo* analizowana była w szczepie *E. coli* z inaktywacją genu *clpA* niosącym plazmidy do konstytutywnej produkcji ParD i nadprodukcji GST-ParE (indukowanej IPTG) w obecności (□) oraz bez (■) ParE. Eksperyment był wykonany jak opisano w rozdziale Metody 5.19. Próbkę pobrane z hodowli w określonym czasie były analizowane pod względem obecności ParD i ParE przy użyciu specyficznych przeciwciał anty-ParD i anty-ParE techniką Western Blotting. Za czas  $t=0$  uznaje się dodanie tetracykliny do hodowli. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie.

względem  $\alpha$ -kazeiny (Ryc. 16A). Aby upewnić się, że znacznik GST również nie ma wpływu na protekcję ParD przez ParE podczas proteolizy, wykonałem eksperyment, w którym do mieszanin reakcyjnych dodawałem oczyszczone białko GST o wzrastających stężeniach. Wykazałem, że znacznik GST nie wpływał na proteolizę antytoksyny ParD przez proteazę ClpAP (Ryc. 16B). Powyższe wyniki pokazują, że to ParE chroni ParD przed degradacją, ale nie ma wpływu na aktywność proteazy ClpAP względem innych substratów.



**Rycina 16. Wpływ GST-ParE i GST na proteolizę substratów przez ClpAP (A)** Proteoliza *in vitro*  $\alpha$ -kazeiny (1.5  $\mu$ g) przez proteazę ClpAP w obecności GST-ParE. Białko GST-ParE o wzrastających stężeniach zostało dodane do mieszaniny reakcyjnej (ścieżki 3-8: kolejno 0,2, 0,4, 0,75, 1,5, 3 i 6  $\mu$ g). W kontroli pozytywnej do mieszaniny reakcyjnej nie dodano GST-ParE (ścieżka 2). W kontroli negatywnej do mieszaniny reakcyjnej nie dodano proteazy (ścieżka 9). Marker Masowy (ścieżka 1). **(B)** Proteoliza *in vitro* ParD (1.5  $\mu$ g) przez proteazę ClpAP w obecności GST. Białko GST o wzrastających stężeniach zostało dodane do mieszaniny reakcyjnej (ścieżki 3-8: kolejno 0,2, 0,4, 0,75, 1,5, 3 i 6  $\mu$ g). W kontroli pozytywnej nie dodano GST (ścieżka 2). W kontroli negatywnej reakcje zatrzymano w czasie  $t=0$  (ścieżka 9). Marker Masowy (ścieżki 1 i 10). Czas trwania eksperymentów wynosił 120 min. Eksperyment był wykonany jak opisano w rozdziale Metody 5.14.

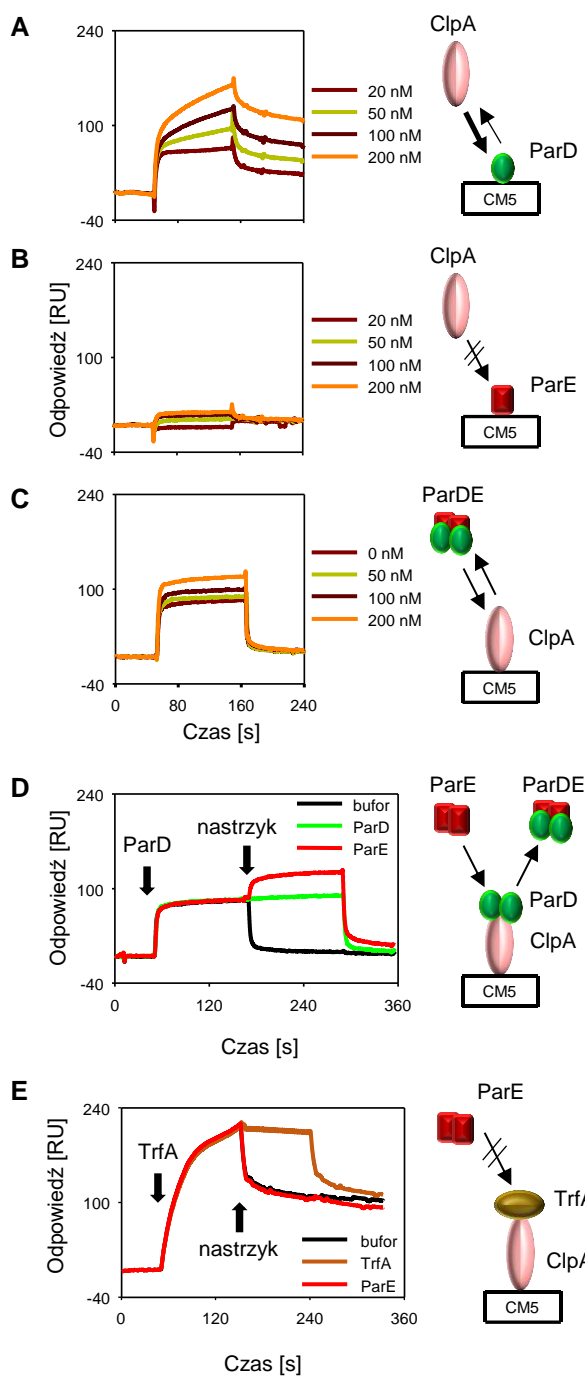
Aby sprawdzić w jaki sposób komponenty systemu *parDE* tworzą kompleksy z proteazami, przeprowadziłem serię eksperymentów analizujących oddziaływania białko-białko. Sprawdziłem oddziaływania pomiędzy białkami ParD i ParE a proteazą Lon oraz podjednostkami AAA+ pozostałych proteaz (ClpA, ClpX, ClpY). W tym celu wykonałem testy immunoenzymatyczne ELISA (Ryc. 17) (Metody 5.16). Na zimmobilizowane w 96 dołkowej płytce białka: ParE, Lon, ClpA, ClpX, ClpY i BSA, dodawałem białko ParD o wzrastających stężeniach. Następnie detekcja obecności ParD była prowadzona przy użyciu przeciwciał anti-ParD. Wyniki testu pokazały, że białko ParD oddziałuje z podjednostką ClpA proteazy ClpAP (wartość absorbancji dla ClpA przy najwyższym stężeniu ParD wynosiła  $A_{450}=0,345$  i była ponad dwukrotnie wyższa od kontroli



**Rycina 17. Analiza oddziaływania białek Clp i Lon z ParD metodą ELISA.** Wykresy obrazują zależność wartości absorbancji, będącej wynikiem reakcji immunoenzymatycznej (Metody 5.16), od ilości ParD dodanego do dołków 96-dołkowej płytki zawierających immobilizowane białka: ParE (o), BSA (□), ClpX (■), ClpA (▼), ClpY (●) lub Lon (Δ). Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błęd) zostały przedstawione na wykresie.

negatywnej z BSA  $A_{450}=0,162$ ) (Ryc. 17). Test dla kontroli pozytywnej z zimmobilizowanym ParE dały wynik  $A_{450}=1,36$  i był wyższy od odpowiedzi dla ClpA o cztery razy i ośmiokrotnie wyższy niż dla BSA (Ryc. 17). Dlatego, aby potwierdzić oddziaływanie pomiędzy ClpA i ParD wykorzystałem analizę SPR (Metody 5.18). Sprawdziłem oddziaływania pomiędzy ClpA, ParD i ParE. Na zimmobilizowane na sensorze białka ParD lub ParE nastrzykiwałem podjednostkę proteazy ClpA o wzrastających stężeniach. Wzrost odpowiedzi zaobserwowałem w przypadku nastrzyku białka ClpA na zimmobilizowane ParD (Ryc. 18A). Potwierdziło to oddziaływanie pomiędzy ParD i ClpA. Natomiast ParE nie było rozpoznawane przez ClpA (Ryc. 18B). Przy użyciu analizy SPR sprawdziłem również, jak obecność toksyny ParE wpływa na wzajemne oddziaływanie pomiędzy ParD i ClpA. Na sensor z immobilizowanym białkiem ClpA nastrzykiwałem preinkubowaną mieszaninę białek ParD i ParE. Preinkubowane mieszaniny zawierały antytoksynę ParD (stałe stężenie 200 nM) oraz toksynę ParE (o wzrastającym stężeniu od 0 do 200 nM). W trakcie nastrzyku preinkubowanego kompleksu ParDE, zaobserwowałem większy wzrost odpowiedzi niż w przypadku nastrzyku samego białka ParD (Ryc. 18C). Wyniki analizy SPR wykazały, że potencjalnie uformowany heterotetramer  $ParD_2-ParE_2$  jest w stanie oddziaływać z białkiem ClpA. Aby sprawdzić czy białko ParE może oddziaływać z kompleksem ClpA-ParD, wykonałem eksperyment, w którym na uformowany na sensorze kompleks ClpA-ParD nastrzykiwałem ParE. W trakcie nastrzykiwania ParE na kompleks ClpA-ParD zauważyłem wzrost sygnału (Ryc. 18D). Wyniki tej analizy pokazały, że toksyna ParE może wiązać się do wcześniej uformowanego kompleksu ClpA i antytoksyny ParD. Tworzenie tego kompleksu następuje poprzez oddziaływanie toksyny ParE z antytoksyną ParD, a nie bezpośrednio oddziaływanie ClpA i ParE. Sprawdziłem również, czy toksyna ParE wpływa na oddziaływanie ClpA z innymi substratami. W tym celu wykonałem analogiczny eksperyment używając znanego substratu proteazy ClpAP jakim jest białko TrfA. W przypadku nastrzyku toksyny na uformowany kompleks ClpA-TrfA, zaobserwowałem spadek odpowiedzi na sensorze porównywalny z odpowiedzią dla samego buforu (Ryc.18E). Otrzymany wynik wskazał, że toksyna ParE nie wchodzi w interakcję z kompleksem ClpA-TrfA i potwierdził, że oddziaływanie ParE z kompleksem ClpA-ParD jest zależne od specyficznego oddziaływania ParE z ParD.



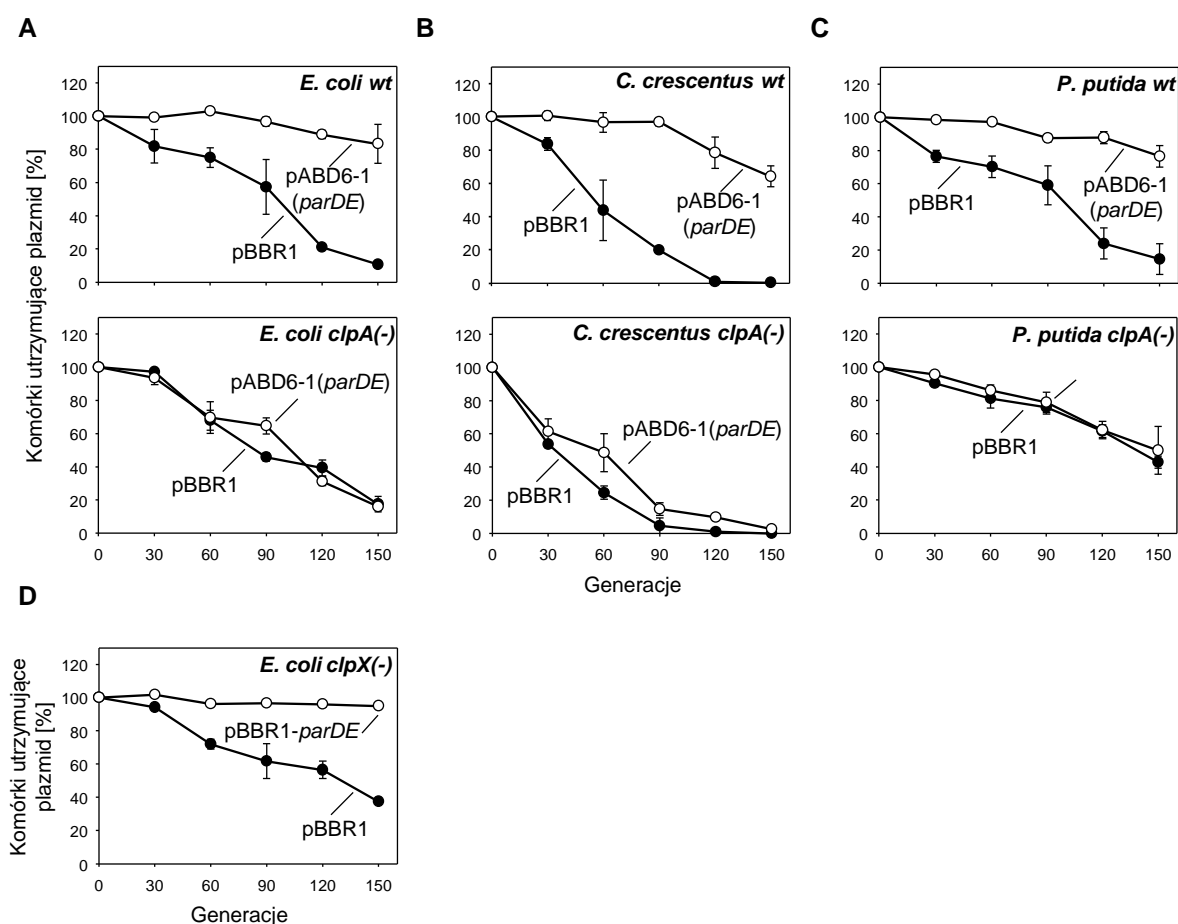


**Rycina 18. Analiza oddziaływań ParD i ParE z ClpA przy użyciu SPR.** Eksperyment został wykonany jak opisano w rozdziale Metody 5.18. Bufor reakcyjny był dodatkowo wzbogacony o 10 mM octan magnezu i 2 mM ATP. Białka ParD (**A**) i ParE (**B**) zostały zimmobilizowane na powierzchni sensora CM5. Białko ClpA o przedstawionych stężeniach było nastrzykiwane na sensor. (**C**) Białko ClpA zostało zimmobilizowane powierzchni sensora CM5. Wykonano nastrzyk mieszanki białek ParD i ParE, gdzie białko ParD w mieszaninie znajdowało się w stałym stężeniu (200 nM), a stężenie białka ParE zwiększano (0, 20, 50, 100, 200, nM). (**D**) Białko ClpA zostało zimmobilizowane na powierzchni sensora CM5. W pierwszej kolejności nastrzykiwano białko ParD (200 nM) aby uformować kompleks ClpA-ParD, a następnie nastrzykiwano ParE (200 nM) (krzywa czerwona). Jako kontroli podczas drugiego nastrzyku na uformowany kompleks ClpA-ParD, użyto ponownie białka ParD (krzywa zielona), lub buforu reakcyjnego (krzywa czarna). (**E**) Białko ClpA zostało zimmobilizowane na powierzchni sensora CM5. W pierwszej kolejności nastrzykiwano białko TrfA (200 nM), aby uformować kompleks ClpA-TrfA, a następnie nastrzykiwano ParE (200 nM) (krzywa czerwona). Jako kontroli podczas drugiego nastrzyku na uformowany kompleks ClpA-TrfA, użyto ponownie białka TrfA (krzywa brązowa), lub buforu reakcyjnego (krzywa czarna).

## 6.7 Proteaza ClpAP jest niezbędna do aktywacji systemu TA *parDE* plazmidu RK2

Ponieważ stabilne utrzymywanie plazmidu RK2 w komórkach różnych gatunków bakterii jest w dużej mierze zależne od systemu *parDE*, postanowiłem sprawdzić czy system ten będzie również stabilizował inny plazmidowy replikon oraz czy funkcjonalność systemu *parDE* będzie zależna od homologów proteazy ClpAP. W tym celu sklonowałem operon *parDE* plazmidu RK2 i wklonowałem go do plazmidu pBBR1MCS-5 (Materiały 4.2.1) o

szerszym spektrum gospodarza, który nie zawiera żadnego innego systemu TA (Metody 5.21). Otrzymany plazmid pABD6-1 (pBBR1-*parDE*) (Materiały 4.2.1) użyłem do transformacji dzikich szczepów *E. coli*, *P. putida* i *C. crescentus* oraz szczepów z inaktywacją genu *clpA* (Materiały 4.1). Jako kontroli stabilności plazmidu użyto niemodyfikowanego plazmidu pBBR1MCS-5. Wydajność utrzymywania plazmidów analizowałem przez 150 generacji w szczepach *E. coli* (Ryc. 19A), *C. crescentus* (Ryc. 19B), *P. putida* (Ryc. 19C) (Metody 5.21). Dla wszystkich analizowanych gatunków w szczepach typu dzikiego plazmid pABD6-1 utrzymywał się w 75% populacji po 150 generacjach, a plazmid kontrolny pBBR1MCS-5 był tracony całkowicie (Ryc. 19A-C panel górny).

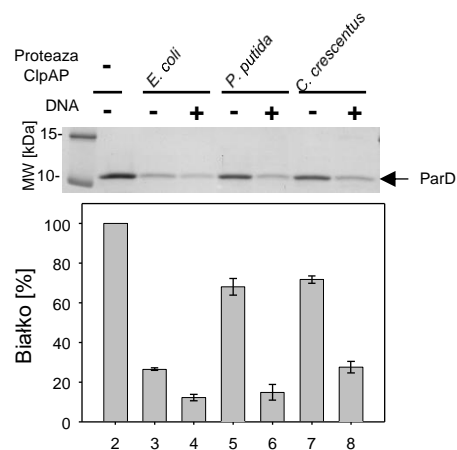


**Rycina 19. System *parDE* wpływa na stabilność plazmidu w różnych gatunkach bakterii.** Testy stabilności plazmidu zostały wykonane w szczepach typu dzikiego (panel górny) i z inaktywacją genu *clpA*(-) (panel dolny). W testach wykorzystano hodowle komórek **(A)** *E. coli* **(B)** *C. crescentus* i **(C)** *P. putida* niosące plazmidy pABD6-1 (○), pochodny pBBR1MCS-5 posiadający loci *parDE* jako jedyny system TA, lub pBBR1MCS-5 (●) jako kontrolę. **(D)** Kontrola stabilności plazmidów w komórkach *E. coli clpX*(-) niosących plazmidy pABD6-1 (○), pochodny pBBR1MCS-5 posiadający loci *parDE* jako jedyny system TA, lub pBBR1MCS-5 (●) jako kontrolę. Eksperymenty zostały wykonane tak jak opisano w rozdziale Metody 5.21. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błęd) zostały przedstawione na wykresie. Dane liczbowe i wartości P znajdują się w Tabeli 5 (Metody 5.22).

W szczepach z inaktywacją genu *clpA* nie zaobserwowałem statystycznie istotnej różnicy w utrzymywaniu się plazmidu posiadającego operon *parDE* a utrzymywaniu się plazmidu

kontrolnego (Ryc. 19A-C panel dolny) (Tab. 5). Otrzymane wyniki jednoznacznie sugerują, iż system *parDE* zapewnia utrzymywanie plazmidu w komórkach gospodarza a proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za aktywowanie kodowanego na plazmidowym DNA systemu *parDE*. Przeprowadziłem też test stabilności plazmidu pABD6-1 i plazmidu kontrolnego pBBR1MCS-5 w szczepie *E. coli* z inaktywacją genu *clpX*. Analogicznie do poprzednich testów, sprawdziłem czy oba plazmidy będą utrzymane w komórkach gospodarza przez 150 generacji. W przypadku szczepu z inaktywacją genu *clpX* nie zaobserwowałem różnic w stosunku do szczepu dzikiego (Ryc. 19D). Świadczy to o tym, iż wyłączenie proteazy ClpXP nie ma wpływu na działanie systemu *parDE*.

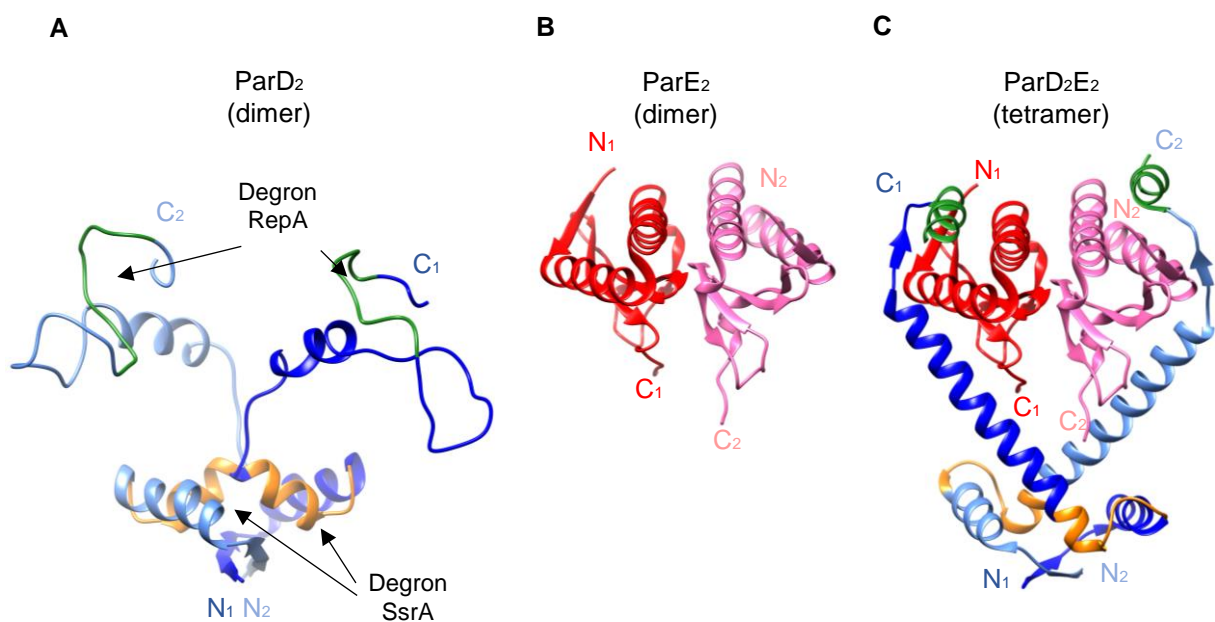
Aby zweryfikować wyniki otrzymane w testach *in vivo*, w których pokazałem, że w szczepach z delecjami genu *clpA*, plazmid RK2 nie jest stabilnie utrzymywany (Ryc. 19), wykonałem proteolizy *in vitro* białka ParD z użyciem homologów proteazy ClpAP z gatunków bakterii będących gospodarzami dla plazmidu RK2. W tym celu oczyściłem zarówno ATPazy ClpA, jak i podjednostki proteolityczne ClpP z *C. crescentus* i *P. putida*. W mieszaninach reakcyjnych, w których znajdowały się homologi proteazy ClpAP zauważyłem spadek ilości białka ParD (Ryc. 20 ścieżki 3, 5, 7). Otrzymane wyniki potwierdziły, że białko ParD jest degradowane przez proteazę ClpAP zarówno z *C. crescentus* jak i *P. putida*. Tak jak w przypadku ClpAP z *E. coli*, DNA stymulował proteolizę ParD (Ryc. 20 ścieżki 4, 6, 8). Otrzymane wyniki jednoznacznie pokazały, że to proteaza ClpAP jest odpowiedzialna za degradowanie antytoksyny ParD i aktywację systemu *parDE* a proces ten jest uniwersalny w różnych gatunkach bakterii.



**Rycina 20. Białko ParD jest degradowane przez proteazy ClpAP z różnych gatunków bakterii.** Proteoliza *in vitro* antytoksyny ParD (1,5 µg) przez proteazy ClpAP z *E. coli* (ścieżki 3 i 4), *P. putida* (ścieżki 5 i 6) i *C. crescentus* (ścieżki 7 i 8) została wykonana w obecności (ścieżki 4, 6 i 8) oraz braku (ścieżki 3, 5 i 7) DNA. W kontroli negatywnej nie dodano proteazy (ścieżka 2). Marker Masowy (ścieżka 1). Czas trwania eksperymentu wynosił 120 min. Eksperyment był wykonany jak opisano w rozdziale Metody 5.15. Każdy eksperyment został wykonany trzy razy a wartości średnie i odchylenia standardowe (słupki błędów) z analizy densytometrycznej zostały przedstawione na wykresie.

## 6.8 Formowanie kompleksu ParDE wpływa na struktury i funkcje obu białek systemu *parDE* plazmidu RK2

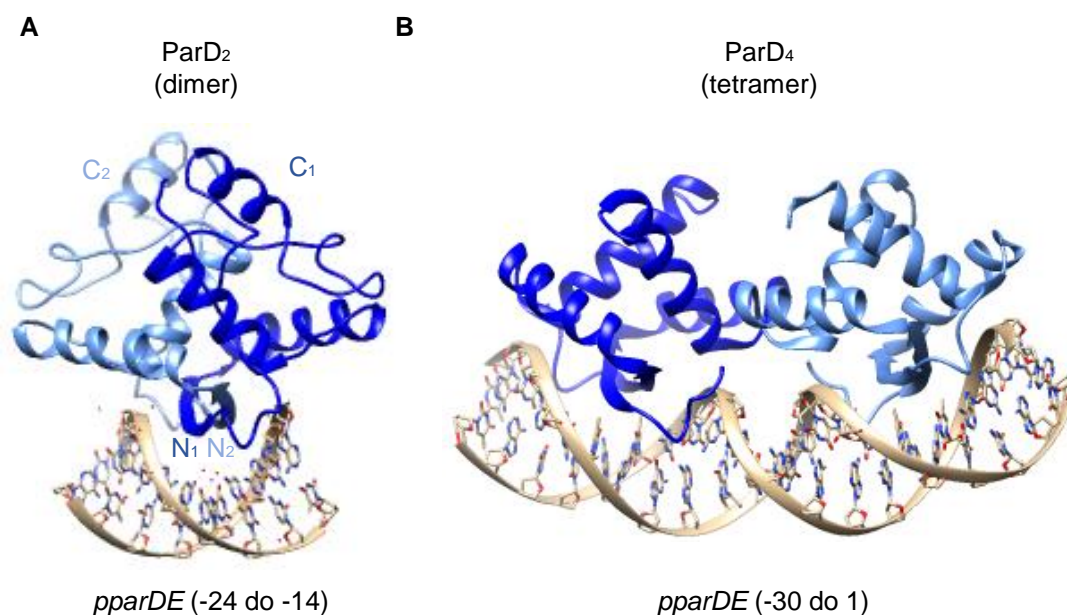
Aby poszerzyć analizę systemu *parDE* w kontekście degradacji i mechanizmu protekcji antytoksyny przez proteazę ClpAP, przeanalizowałem wyniki modelowania homologicznego dimeru ParD, dimeru ParE, heterotetrameru ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> oraz kompleksu ParD-DNA. Do analizy wykorzystałem dane (załączniki 1, 2 i 3) uzyskane we współpracy z dr Urszula Uciechowską z w wykorzystaniem wcześniej opisanych metod (Metody 5.23). Edycję i analizę modeli i przygotowanie rycin (Ryc. 21 ABC, Ryc. 22 AB i Ryc. 24 AB) przeprowadziłem w wykorzystaniu programu Chimera (Metody 5.23).



**Rycina 21. Modele białek systemu *parDE* z plazmidu RK2 (A) homodimeru ParD (B) homodimeru ParE i (C) heterotetrameru ParDE (Metody 5.23).** [N] N-koniec białka, [C] C-koniec białka. Na modelach ParD zaznaczono potencjalne degrony rozpoznawane przez proteazę ClpAP, zidentyfikowane w białkach SsrA (kolor pomarańczowy, aa 24-34) i RepA (kolor zielony, aa 68-79) (Ryc. 9).

Antytoksyna ParD składa się z dwóch domen. N-końcowa domena o zdefiniowanej strukturze jest odpowiedzialna za dimeryzację i oddziaływanie z DNA. Natomiast nieustrukturyzowana C-końcowa domena jest odpowiada za wiązanie z ParE. Wyniki modelowania homologicznego kompleksu ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> pokazały znaczące zmiany zachodzące w C-końcowej domenie ParD po związaniu z ParE (Ryc. 21A i 21C). W literaturze opisano przykłady, kiedy zmiana części struktury antytoksyny lub jej całości może zwiększać stabilność antytoksyny (Brzozowska i Zielenkiewicz, 2013).

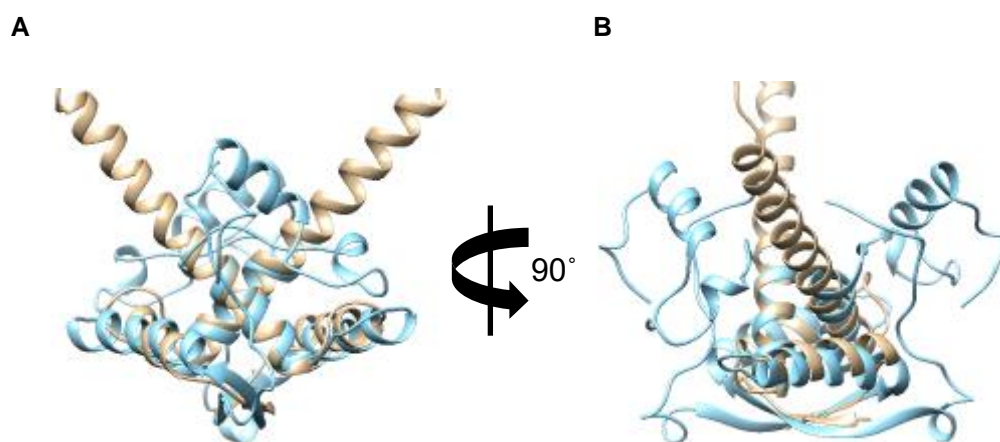
Kolejną funkcją, na którą wpływa formowanie kompleksu ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> jest aktywność toksyny. Wyniki modelowania homologicznego białek systemu *parDE* plazmid RK2 oraz dane strukturalne dla systemu *parDE* z *C. vibrioides*, sugerują sposób hamowania aktywności toksyny ParE względem gyrazy. W obu przypadkach dimer toksyny ParE jest zamykany przez C-koniec ParD wewnątrz kompleksu toksyna-antytoksyna, co prawdopodobnie blokuje możliwość wiązania toksyny ParE w miejscu aktywnym gyrazy GyrAB (Ryc. 21B i 21C).



**Rycina 22. Wiązanie dimeru ParD do sekwencji promotorowej operonu *parDE*.** Wyniki dokowania (A) dimeru ParD do sekwencji palindromowej DNA 5'-CACATATGTG-3' (-24 do -14 nukleotydu od miejsca startu transkrypcji) promotora *parDE* i (B) dwóch dimerów do sekwencji 5'-CCTCACGCCACATATGTGCTAATGTGGTTACG-3' (-30 do +1 nukleotydu od miejsca startu transkrypcji) zawierającej sekwencję palindromową 5'-CACATATGTG-3' (silne miejsce wiązania) oraz jedną sekwencję okalającą 5'-ATGTG-3' (słabe miejsce wiązania) (Oberer i wsp., 2007). Do dokowania wykorzystano model białka ParD uzyskany na podstawie modelowania homologicznego (Metody 5.23).

Ostatnim z dotychczas zbadanych efektów tworzenia kompleksu ParDE, jest dysocjacja ParD od DNA. Model dimeru ParD otrzymany w wyniku modelowania homologicznego (Uciechowska, załącznik 1), wykorzystano do wykonania dokowania antytoksyny do DNA (Uciechowska, załącznik 3 i 4). We wcześniejszych pracach zidentyfikowano dwie sekwencje w promotorze *parDE*, które są rozpoznawane przez antytoksynę ParD na DNA (silna 5'-CACATATGTG-3' i słaba '5-ATGTGGTTACG-3' (Davis i wsp., 1992; Eberl i wsp., 1992; Oberer i wsp., 2007; Roberts i wsp., 1993)). Wyniki dokowania sugerują, że kluczowymi motywami odpowiedzialnymi za wiązanie dimeru antytoksyny ParD do sekwencji 5'-CACATATGTG-3' DNA są N-końcowe β-kartka i pierwsza α-helisa (Ryc. 22A). Wcześniej opisano, że kluczowymi aminokwasami odpowiedzialnymi za wiązanie białka ParD do DNA

są Arg3, Thr5 i Asp7 ( $\beta$ -kartka), które tworzą wiązania wodorowe w dużym rowku DNA i Ile27 oraz Lys28 ( $\alpha$ -helisa), które oddziałują z resztami fosforanowymi szkieletu DNA (Oberer i wsp., 2007). Wykonano też dokowanie dwóch dimerów ParD z silnym 5'-CACATATGTG-3' i słabszym '5-ATGTGGTTACG-3' miejscem oddziaływania na DNA (Ryc. 22B). W przypadku wiązania dimeru i tetrameru ParD do DNA, aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie białka do DNA są takie same. Aby sprawdzić jaki wpływ na strukturę N-końca antytoksyny ParD oraz oddziaływanie ParD z DNA, ma wiązanie dimeru toksyny ParE, wykonałem superpozycjonowanie struktur dimeru ParD i dimeru ParD w kompleksie z ParE (Ryc. 23) (Metody 5.23). Wiązanie toksyny ParE do antytoksyny ParD w znacznym stopniu zmienia konformację N-końca antytoksyny. Pierwsza  $\beta$ -kartka sugerowana jako istotna w oddziaływaniu z DNA ulega skróceniu oraz zmienia się kąt pomiędzy pierwszą  $\beta$ -kartką i pierwszą  $\alpha$ -helisą (Ryc. 23). Prawdopodobnie obserwowane zmiany wpływają na możliwość wiązania ParD do DNA i powodują oddysocjowanie kompleksu ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> od promotora.



**Rycina 23. Zmiana struktury N-końca antytoksyny ParD po związaniu toksyny ParE.** Superpozycjonowanie dimeru ParD (niebieski) z dimerem ParD w kompleksie z ParE (złoty) (Metody 5.23). Dla przejrzystości struktur nie pokazano dimeru ParE. Po związaniu dimeru toksyny ParE do dimeru antytoksyny ParD możemy zaobserwować (A) zmianę kąta pomiędzy  $\beta$ -kartką pierwszą i  $\alpha$ -helisą pierwszą oraz uformowanie długiej  $\alpha$ -helisy drugiej z wcześniej nieustrukturyzowanego fragmentu. (B)  $\beta$ -kartka pierwsza odpowiedzialna za oddziaływanie z DNA ulega znacznemu skróceniu podczas tworzenia kompleksu ParDE.

## 7 Dyskusja

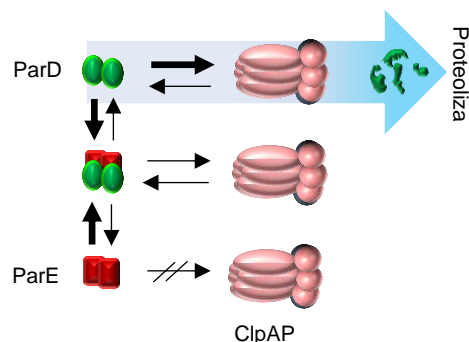
Poprawne funkcjonowanie systemów TA zapewnia stabilne utrzymywanie ruchomych elementów genetycznych w komórkach gospodarza oraz możliwość przetrwania bakterii w warunkach stresu. Oddziaływania pomiędzy elementami systemu i specyficzna substratowo aktywność proteolityczna, są dla systemów TA typu II kluczowe. W mojej pracy analizowałem system TA *parDE*, kodowany przez plazmid RK2. Na wstępie pracy oczyściłem komponenty białkowe systemu *parDE*: toksynę ParE i antytoksynę ParD i sprawdziłem, czy posiadają one aktywności opublikowane we wcześniejszych pracach. Otrzymane przeze mnie wyniki potwierdziły oddziaływanie pomiędzy toksyną ParE i antytoksyną ParD (Dalton i Crosson, 2010) a także antytoksyną i DNA (Johnson i wsp., 1996). Potwierdziłem również wpływ ParE na działanie gyrazy bakteryjnej GyrAB (Jiang i wsp. 2002). Oddziaływanie toksyny na gyrazę powoduje powstanie liniowej formy DNA w mieszaninie reakcyjnej. Efekt toksyczności jest niwelowany przez pojawienie się antytoksyny ParD, która blokuje działanie toksyny na gyrazę. Do tej pory nie było wiadomo jaki czynnik jest odpowiedzialny za aktywację systemu *parDE*. Proteazy komórkowe wydają się być kluczowymi graczami aktywującymi większość systemów TA typu II poprzez degradację antytoksyn (Kędzierska i Hayes, 2016a). Stabilność wielu antytoksyn została zbadana w komórkach *E. coli* przy użyciu analiz *in vivo*. W swojej pracy sprawdziłem stabilność białek ParD i ParE systemu *parDE*. W tym celu wykorzystałem komórki *E. coli* C600 oraz mutanty z inaktywacjami genów proteaz cytozolowych. W szczepie dzikim antytoksyna ParD była wydajnie degradowana w komórkach gospodarza, natomiast toksyna ParE pozostawała stabilna. W trakcie testów stabilności w szczepach z inaktywacjami genów proteaz, zaobserwowałem wzrost stabilności antytoksyny w szczepach *clpA(-)* i *lon(-)*. Jednak statystycznie istotny wzrost stabilności białka ParD występował tylko w szczepie z inaktywacją genu *clpA*. Przeprowadzone testy *in vivo* stabilności białka ParD wyraźnie wskazały, że spośród wszystkich cytoplazmatycznych proteaz *E. coli*, to proteaza ClpAP jest głównie odpowiedzialna za degradowanie białka ParD. Otrzymane wyniki potwierdziła również analiza *in vitro*. W przeciwieństwie do ParD, białko ParE było stabilne w trakcie testów *in vivo* a także w trakcie proteoliz *in vitro* nie zauważyłem znaczącej degradacji ParE w żadnych warunkach. Wyniki te wskazują, że ParE jest białkiem stabilnym i nie jest substratem dla żadnej z analizowanych proteaz. Otrzymane przeze mnie wyniki są zgodne z wynikami opublikowanymi dla innych systemów TA typu II: system  $\epsilon$ - $\zeta$  plazmidu pSM19035, którego antytoksyna  $\epsilon$  jest degradowana przez proteazę ClpXP z *Bacillus subtilis*

(Brzozowska i Zielenkiewicz, 2014); system *parD* plazmidu R1, którego antytoksyna Kis jest degradowana przez proteazę ClpAP z *E. coli* (Diago-Navarro i wsp., 2013); system *ccdAB* plazmidu F1, którego antytoksyna CcdA jest degradowana przez proteazę Lon z *E. coli* (Van Melderren i wsp., 1996). We wszystkich wyżej wymienionych systemach, toksyny były stabilne w komórkach gospodarzy i nie ulegały degradacji przez żadną ze sprawdzanych proteaz. Różnica w stabilności białek ParD i ParE jest kluczowym czynnikiem wyjaśniającym selektywną aktywację systemu *parDE* po utracie plazmidu. W sytuacji, kiedy spadek stężenia labilnej antytoksyny nie może być kompensowany w komórce gospodarza bez plazmidowego DNA a tym samym i bez operon *parDE*, następuje nagromadzenie się wolnej toksyny, która oddziałuje z celem komórkowym. Eksperymenty proteolizy *in vitro* wykazały, że degradacja białka ParD jest szybka. Zaobserwowałem znaczny ubytek antytoksyny w czasie krótszym niż 30 min. Oszacowałem, że okres półtrwania ParD to około 15 min. Wykonane przeze mnie eksperymenty (Ryc. 6) i wcześniejsze prace (Oberer i wsp., 2007; Roberts i wsp., 1993) pokazały, że ParD wiąże się do sekwencji DNA znajdujących się w promotorze *parDE*. Dlatego sprawdziłem jaki wpływ na proteolizę ma obecność DNA w mieszaninie reakcyjnej. Okazało się że DNA stymuluje proces proteolizy i skraca czas półtrwania ParD w mieszaninie reakcyjnej do około 5 min. Czas ten jest podobny do degradacji antytoksyny Kis przez proteazę ClpAP (Diago-Navarro i wsp., 2013). Wynik eksperymentu badającego wpływ kolejności dodawania poszczególnych komponentów do reakcji proteolizy pokazał, że to stymulacja ClpAP przez DNA jest kluczowa dla zwiększenia wydajności proteolizy, a nie oddziaływanie antytoksyny ParD z DNA. Niemniej jednak wcześniejsze badania na temat stymulacji proteolizy przez DNA pokazały, że w przypadku proteazy Lon, substraty które utraciły zdolność do wiązania DNA, również nie są wydajnie proteolizowane (Kubik i wsp., 2011). Dlatego nie jest wykluczone, że zdolność oddziaływania antytoksyny z DNA i stymulacja aktywności proteolitycznej proteazy ClpAP przez DNA, dają efekt synergiczny. Zaobserwowane przeze mnie różnice w stabilności ParD i ParE są zbieżne z informacjami dostępnymi dla innych systemów TA typu II. Większość antytoksyn typu II ma krótki okres półtrwania w komórkach *E. coli* i wynosi on 5-15 min. Jest to cecha umożliwiająca szybką reakcję komórek na zmieniające się warunki środowiskowe (Goeders i Van Melderren, 2014). Taka różnica stabilności pomiędzy komponentami białkowymi systemów typu II jest niezwykle istotna dla ich poprawnego funkcjonowania a w przypadku systemów, które wywołują śmierć komórki indukowaną przez PSK i w odpowiedzi na infekcja fagową, jest wręcz kluczowa (Jensen i Gerdes, 1995; Van Melderren i wsp., 1994).



Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty wskazały, że obecność toksyny ParE zwiększała stabilność antytoksyny. W eksperymentach *in vivo*, w których indukowałem ekspresję genu *parE*, obserwowałem stabilizację białka ParD. W testach proteolitycznych *in vitro* stabilność ParD znacząco wzrastała po dodaniu ParE. Efekt hamowania aktywności proteazy ClpAP przez ParE względem substratu był widoczny tylko w przypadku proteolizy ParD. Istotne w tym wypadku wydają się wzajemne interakcje pomiędzy białkami ParD, ParE i ClpA. Dane otrzymane w wyniku analizy SPR i testów ELISA pokazują, że antytoksyna ParD oddziałuje z ATPazą ClpA. W przeprowadzonych eksperymentach wykazałem, że ClpA rozpoznaje a proteaza ClpAP degraduje białko ParD. Natomiast ParE nie jest rozpoznawane przez ClpA i nie jest degradowane przez proteazę ClpAP. Biorąc pod uwagę brak jakichkolwiek interakcji pomiędzy białkami ParE i ClpA oraz wyniki eksperymentu wiązania kompleksu ParDE do ClpA, można stwierdzić, że toksyna ParE oddziałuje z proteazą ClpAP tylko za pośrednictwem antytoksyny ParD. Tak powstały kompleks jest mniej stabilny niż oddziaływanie ParD z ClpA. Pokazałem również, że toksyna ParE może wiązać się do wcześniej uformowanego kompleksu proteaza-antytoksyna, ale nie wiąże się do innych substratów oddziałujących z ClpA.

Podsumowując wyniki otrzymane przy pomocy analizy SPR, badania stabilności białek *in vivo* i proteolizy *in vitro*, można postulować, że tworzenie kompleksu ParD-ParE nie zapobiega oddziaływaniu antytoksyny ParD z proteazą ClpAP, ale chroni ją przed proteolizą (Ryc. 24). Dlatego gdy oba składniki białkowe systemu TA są obecne w komórce gospodarza i tworzą kompleks, mamy do czynienia z protekcją antytoksyny przed degradacją.



**Rycina 24. Schemat interakcji pomiędzy białkami: ParD, ParE i ClpAP.** Strzałki wskazują asocjacje lub dysocjacje kompleksów. Strzałka pogrubiona pokazuje przesunięcie równowagi w stronę bardziej stabilnego kompleksu.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów *in vivo* i *in vitro* pokazały, że aktywność systemu *parDE* plazmidu RK2 oparta jest na stabilnej toksynie ParE i labilnej antytoksynie ParD, która jest degradowana przez proteazę ClpAP z *E. coli*. Już w pracach z lat dziewięćdziesiątych opisano zjawisko stabilizacji plazmidów zawierających systemy TA w komórkach *E. coli* (Roberts i wsp., 1994; Lehnher i wsp., 1993; Tsuchimoto i wsp., 1988; Ogura i Hiraga, 1983). Pomimo coraz większej liczby doniesień o systemach TA z innych

organizmów, wciąż mało wiemy o stabilności antytoksyn i plazmidów zawierających systemy TA w innych gatunkach bakterii. Ponieważ plazmid RK2, jako plazmid o szerokim spektrum gospodarzy, utrzymywany jest w wielu gatunkach bakterii, w swoich badaniach sprawdziłem aktywność systemu *parDE* w innych niż *E. coli* bakteriach. Wykonałem eksperymenty *in vivo*, w których użyłem plazmidu pABD6-1. Plazmid ten skonstruowałem wykorzystując plazmid pBBR1MSC-5. Plazmid pABD6-1 jako jedyny moduł TA zawierał system TA *parDE*. Analiza stabilności plazmidu *in vivo* potwierdziła, że system TA *parDE* zwiększał stabilność plazmidu pABD6-1 w porównaniu do plazmidu kontrolnego niezawierającego systemu TA. Wyższą stabilność plazmidu obserwowałem nie tylko w komórkach *E. coli*, ale i *C. crescentus* oraz *P. putida*. Biorąc pod uwagę wyniki eksperymentów, w których wykazałem, że degradacja białka ParD *in vivo* i *in vitro* jest zależna od proteazy *E. coli* ClpAP, postanowiłem sprawdzić czy proteazy ClpAP z innych niż *E. coli* bakterii, również są istotne dla aktywności *parDE*. W tym celu wykorzystałem szczepy *E. coli*, *C. crescentus* i *P. putida* z inaktywacją genów *clpA*. W analizowanych przeze mnie szczepach nie wykazałem żadnej różnicy pomiędzy plazmidem pABD6-1 z systemem TA i plazmidem kontrolnym pBBR1MSC-5. Świadczy to o tym, iż w bakteriach *E. coli*, *C. crescentus* i *P. putida* to proteaza ClpAP jest elementem odpowiedzialnym za aktywację PSK i utrzymanie plazmidu w komórkach gospodarza. Wyniki proteolizy *in vitro*, w których używałem oczyszczonych komponentów białkowych pokazały, że homologi proteazy ClpAP z bakterii *C. crescentus* i *P. putida* degradują antytoksynę ParD. Te eksperymenty potwierdziły analizy *in vivo* i wykazały, że aktywacja systemu TA kodowanego przez plazmid o szerokim spektrum gospodarza, zachodzi w analogiczny sposób w różnych gatunkach bakterii i jest zależna od aktywności homologów tej samej proteazy. Aktywność proteazy ClpAP okazała się kluczowa dla aktywacji systemu *parDE* plazmidu RK2. Brak funkcjonalnej podjednostki ClpA powodował znaczący wzrost stabilności antytoksyny ParD (tak jak pokazano na Ryc. 8B). W takiej sytuacji nawet jeżeli komórka potomna po podziale nie odziedziczyła plazmidu kodującego system TA, toksyna nie mogła działać na cel komórkowy, ponieważ znajdowała się w kompleksie ze stabilną antytoksyną.

Wyniki opisane w mojej pracy oraz wcześniejsze doniesienia literaturowe pokazują, że formowanie kompleksu ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> wpływa na aktywności obu białek tworzących ten heterotetramer. Wykazałem, że toksyna ParE chroni antytoksynę ParD przed proteolizą. Z kolei antytoksyna ParD powoduje zahamowanie aktywności ParE względem gyrazy GyrAB (Jiang i wsp., 2002), a ParE w wysokich stężeniach powoduje dysocjację ParD od kompleksu

z DNA (Johnson i wsp., 1996). Opisano kilka mechanizmów protekcji antytoksyn przed proteolizą po związaniu z toksyną. Wiązanie toksyny do antytoksyny może powodować zmianę struktury C-końca antytoksyny (Kamada i wsp., 2003). Może też dochodzić do ukrycia degronu antytoksyny wewnątrz kompleksu TA (Schumacher i wsp., 2009). Ostatnim opisanym efektem tworzenia kompleksu TA, jest zmiana struktury całej antytoksyny (Takagi i wsp., 2005). Wszystkie wyżej opisane efekty wywołane formowaniem kompleksów TA, powodują wzrost stabilności antytoksyn. Potencjalną stabilizację struktury nieuporządkowanego C-końca ParD w kompleksie z ParE pokazano w przypadku systemu z *C. vibrioides* (strain ATCC 19089 / CB15) (Dalton i Crosson, 2010). Podobny mechanizm może być prawdziwy dla systemu *parDE* co potwierdziły wyniki analizy strukturalnej kompleksów z wykorzystaniem modelowania homologicznego. Na rycinie 21 przedstawiłem potencjalne kompleksy ParD<sub>2</sub> (Ryc. 21A), ParE<sub>2</sub> (Ryc. 21B) i ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> (Ryc. 21C). Model ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> jest bardzo zbliżony do struktury z *C. vibrioides*, otrzymanej przy użyciu krystalografii (Dalton i Crosson, 2010). W obu przypadkach podczas formowania kompleksu TA obserwujemy zmiany w strukturze C-terminalnych końców dimeru ParD. Do tej pory nie było wiadomo czy to nieustrukturyzowana część ParD lub określony motyw w tym białku jest rozpoznawany przez podjednostkę ClpA. Porównanie sekwencji antytoksyny ParD do innych znanych substratów ClpAP wykazało dwa potencjalne motywy rozpoznawane przez proteazę ClpAP. Jeden podobny do motywu zidentyfikowanego w białku SsrA (Ryc. 8), znajdujący się na drugiej  $\alpha$ -helisie (aa 24-34) (Ryc. 21A) i drugi podobny do motywu zidentyfikowanego w białku RepA (Ryc. 8), znajdujący się nieustrukturyzowanej części ParD ulokowanej blisko C-końca (aa 68-79) (Ryc. 21A). W moich doświadczeniach wykazałem, że mimo zahamowania proteolizy, proteaza ClpAP wciąż była w stanie wiązać się do kompleksu ParDE. Świadczą o tym wyniki analizy SPR, które pokazały, że niezależnie czy ParD było związane z ParE, czy nie, było ono rozpoznawane przez podjednostkę ClpA. Analizując zmiany jakie zachodzą w C-końcowej domenie ParD po związaniu z ParE, można przypuszczać, że to zmiana struktury C-końca ParD powoduje zmniejszenie efektywności proteolizy, choć potencjalny degron wciąż jest dostępny dla proteazy ClpAP.

W przypadku proteazy ClpAP, to podjednostka ClpA jest odpowiedzialna za wiązanie substratu do proteolizy na jego wczesnym etapie i jego specyficzne rozpoznanie (Erbse i wsp., 2008). Dlatego ciekawym wydaje się, że homologii proteazy ClpAP z *C. crescentus* i *P. putida*, również degradują antytoksynę. Możliwe jest, że mechanizm rozpoznawania substratu jest identyczny wśród wszystkich homologów ClpA, co wyjaśniałoby uniwersalność

rozpoznawania ParD w różnych gatunkach bakterii. Jednak istnieje też możliwość, że nie wszystkie substraty ClpAP jednego gatunku są rozpoznawane i proteolizowane przez ClpAP innych gatunków bakterii. W takim wypadku to białko ParD jako element replikonu o szerokim spektrum gospodarzy, ewoluowało jako uniwersalny substrat dla proteaz ClpAP. Dlatego interesujące wydaje się sprawdzenie, czy wytypowane motywy są uniwersalnym sygnałem rozpoznawania substratu przez homologi proteazy ClpAP w różnych gatunkach bakterii.

Kolejnym skutkiem formowania kompleksu ParDE jest zahamowanie aktywności toksyny względem celu komórkowego. Efekt ten może być wywoływany przez wiązanie antytoksyny do miejsca aktywnego toksyny, tak jak ma to miejsce w przypadku RelE, MezF i VapC (Bøggild i wsp., 2012; Dienemann i wsp., 2011; Kamada i wsp., 2003; Takagi i wsp., 2005). Hamowanie aktywności toksyny może być też skutkiem sterycznej blokady dostępu toksyny do celu komórkowego, tak jak ma to miejsce w przypadku CcdB (De Jonge i wsp., 2009). Do blokowania oddziaływania pomiędzy toksyną a celem komórkowym może prowadzić wiązanie toksyny wewnątrz pojedynczego kompleksu TA lub sekwenstracja wolnych toksyn wewnątrz większego kompleksu TA (Cataudella i wsp., 2013). Analiza modelu kompleksu ParDE z plazmidu RK2 oraz danych strukturalnych kompleksu ParDE z *C. vibrioides* świadczą o tym, że dimer toksyny ParE jest oplatany przez C-końce dimeru antytoksyny ParD, co prawdopodobnie blokuje możliwość oddziaływania z gyrazą.

Ostatnim efektem tworzenia kompleksu ParDE jest dysocjacja ParD od DNA. Superpozycjonowanie struktur dimeru ParD i dimeru ParE w kompleksie z ParE (Ryc. 23), pokazało zmiany zachodzące w N-końcowej domenie ParD.  $\beta$ -kartka sugerowana jako istotna w oddziaływaniu z DNA ulega skróceniu, oraz zmienia się kąt pomiędzy pierwszą  $\alpha$ -helisą i pierwszą  $\beta$ -kartką (Ryc. 23). Zmiany te prawdopodobnie wpływają na zmniejszenie powinowactwa kompleksu ParD<sub>2</sub>-ParE<sub>2</sub> do DNA i oddysocjowanie ParD od sekwencji promotorowej po utworzeniu kompleksu z ParE. Otrzymane wyniki modelowania są zbieżne z danymi eksperymentalnymi, w których pokazano, że przy dostatecznie dużym stężeniu toksyny obserwuje się spadek powinowactwa wiązania ParD do DNA (Johnson i wsp., 1996). Stosunek stechiometryczny pomiędzy białkami ParD i ParE jest odpowiedzialny za represję operonu *parDE*. Wzrost stosunku toksyny do antytoksyny spowodowany nierównomierną dystrybucją elementów białkowych systemu TA w trakcie podziału komórkowego lub spowodowany czynnikami stresowymi, może powodować wznowienie transkrypcji operonu *parDE* i prowadzić do uzupełnienia elementów białkowych systemu TA. Natomiast w trakcie

wzrostu komórki przed podziałem, nie narażonej na czynniki stresowe, toksyna i antytoksyna występują w równowadze i stabilizują ekspresje operonu na stałym niskim poziomie. Możliwe, że tworzenie kompleksu ParD-ParE jest odpowiedzialne za utrzymanie odpowiedniego poziomu obu białek w komórce gospodarza, poprzez regulację ekspresji operonu *parDE* i zwiększenie stabilności antytoksyny ParD. Taki mechanizm zmniejsza wydatek energetyczny komórki gospodarza i został już opisany wcześniej (Gelens i wsp., 2013; Harms i wsp., 2018).

Wiadomo, że systemy TA mogą być kodowane zarówno na chromosomach bakteryjnych jak i plazmidach. Ponadto homologiczne systemy często występują u kilku różnych gatunków. Nierzadko zdarza się, że na jednym chromosomie bakteryjnym występuje kilka kopi danego systemu. Dlatego ciekawym aspektem jest fakt, iż na chromosomie bakterii *C. crescentus* znajdują się cztery homologiczne systemy *parDE* (Fiebig i wsp., 2010). Do tej pory czynnik aktywujący działanie systemów z *C. crescentus* jak również białko odpowiedzialne za degradację antytoksyn nie zostały poznane. Fiebig i współpracownicy wykazali, że ekspresja operonów *parDE* z *C. crescentus* może być zależna od czynników środowiskowych, takich jak obecność metali ciężkich, szok cieplny lub faza wzrostu hodowli (Fiebig i wsp., 2010). Opisano też, że antytoksyna z jednego systemu nie oddziałuje z toksynami systemów homologicznych i działanie każdego systemu *parDE* z *C. crescentus* jest niezależne od innych. Ponieważ plazmid RK2 jest wydajnie utrzymywany w komórkach *C. crescentus*, prawdopodobnie pomiędzy systemami *parDE* pochodzenia chromosomalnego i systemem *parDE* plazmidu RK2 również nie dochodzi do interakcji. Istnieje jednak możliwość, że w warunkach stresowych systemy chromosomalne mogą wpływać na stabilność plazmidu. Tak samo jak system plazmidowy może wpływać na komórkę gospodarza. Poza *C. crescentus* systemy TA *parDE* zidentyfikowano również na chromosomie II *Vibrio cholerae*. Trzy systemy *parDE* utrzymują selekcję tego składnika genetycznego, pełniąc funkcję podobną do PSK (Yuan i wsp., 2011). W przypadku systemu *parDE2* z *Mycobacterium tuberculosis* zaobserwowano niewielki wzrost przeżywalności po ekspozycji na stres oksydacyjny komórek, w których następowała ekspresja genu toksyny *parE*, co wskazuje na efekt ochronny, a nie toksyczny (Gupta i wsp., 2016). Pozostaje niejasne, czy systemy *parDE* są częścią jednej rodziny o jednolitej roli w fizjologii komórek bakteryjnych np. PSK, czy systemy te możemy podzielić na grupy o różnych funkcjach i sposobie aktywacji, w których jedynym elementem spójnym jest działanie toksyny na cel komórkowy, którym jest gyraza. Najnowsze doniesienia literaturowe mówią o wpływie chromosomalnego systemu *parDE* na

wzrost antybiotykoodporności patogennych bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (Muthuramalingam i wsp., 2019). Pokazano, że indukcja ekspresji genu *parE* zwiększa odporność hodowli *P. aeruginosa* na ciprofloksacin, levofloksacin i nowobiocynę względem hodowli kontrolnej bez indukcji. Przy pomocy eksperymentów *in vitro* pokazano, że toksyna ParE z *P. aeruginosa* może hamować działanie gyrazy z *E. coli* (Muthuramalingam i wsp., 2019). W świetle przedstawionych wyników nasuwa się pytanie, czy system *parDE* plazmidu RK2 również może odgrywać istotną rolę w zwiększaniu oporności na antybiotyki poprzez oddziaływanie toksyny z gyrazą. Jest to bardzo prawdopodobne, ponieważ wykazano, że w przypadku systemu *ccdAB* znajdującego się na chromosomie *E. coli* i systemu *ccdAB* plazmidu F, ekspresja operonu TA powoduje wzrost odporności gospodarza na niektóre antybiotyki (Gupta i wsp., 2017; Tripathi i wsp., 2012). W świetle doniesień literaturowych mówiących o wpływie plazmidowych systemów TA na zwiększenie odporności gospodarzy na czynniki stresowe, ciekawym wydaje się fakt, że w trakcie badań stabilności antytoksyny ParD *in vivo* zauważyłem, iż w szczepie *E. coli lon(-)* stabilność antytoksyny nieznacznie wzrasta. W literaturze opisano zjawisko aktywacji systemów TA typu II przez proteazę Lon, w odpowiedzi na stres środowiskowy (Kędzierska i Hayes, 2016a; Tsilibaris i wsp., 2006). Dla przykładu, antytoksyna ChpAI jest degradowana przez proteazę ClpAP w komórkach *E. coli* w fazie wzrostu stacjonarnego. Natomiast w momencie wystąpienia stresu środowiskowego w postaci głodu aminokwasowego, proteaza Lon przejmuje rolę czynnika degradującego antytoksynę ChpAI i aktywuje system TA *chpA* (Christensen i Gerdes, 2003b). Stabilność antytoksyny ParD w trakcie stresu środowiskowego i potencjalny wpływ systemu *parDE* plazmidu RK2 na komórkę gospodarza wymagają dalszych badań.

## Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiłem wyniki doświadczeń pokazujących, że proteaza ClpAP jest kluczowym czynnikiem aktywującym system TA *parDE* plazmidu RK2. Pokazałem, że obecność DNA stymuluje aktywność proteazy względem substratu, oraz że tworzenie kompleksu ParDE hamuje reakcje proteolizy. Wykazałem również, że antytoksyna ParD jest uniwersalnym substratem dla homologów proteazy ClpAP w komórkach bakterii będących gospodarzami dla plazmidu RK2. Wiedza zdobyta na temat systemu TA, który jest aktywny w różnych gatunkach bakterii oraz fakt, iż antytoksyna ParD degradowana jest przez

homologii proteazy ClpAP, mogą stanowić podstawę do prac nad nowymi strategiami zwalczania bakterii patogennych.

## Tabele

**Tabela 1. Oligonukleotydy użyte w eksperymentach**

Nr	Sekwencja oligonukleotydu	Zastosowanie
1	5'TGTCCCGGGTTAGCGATATAGCG3'	pBAD24-ParD 1
2	5'GGTACCGCGTAAATTGTAAGGGGTTAATATTTTGTTAAAATTGCGT TAAATTTTCGTGTATTTTATGGAG3'	pBAD24-ParD 2
3	5'CGGTCTAGATGCCCTCTTTTTCGCGCC3'	pABD2-4 1
4	5'GGCCAAGCTTCTATTCGGCCATGGCCGG3'	pABD2-4 2
5	5'AAGAAGGAGATATACATATGTAAACCGCGAGCTCGAAG3'	pET22b-ClpAPpΔHis 1
6	5'GGAGCTCGAATTCGGATCCTCACGCGACCTCAGCCGTG3'	pET22b-ClpAPpΔHis 2
7	5'AAGAAGGAGATATACATATGTCCCGCAATTCTTATATTCAGCAGA GCT3'	pET22b-ClpPPp 1
8	5'GTGGTGGTGGTGTCTCGAG GGAGGCCAGTTGCCG3'	pET22b-ClpPPp 2
9	5'CTGTGGATCCTTGGTCAAATTGGGTATAC3'	pABD6-1 1
10	5'TAGAGGATCCTAGCTGTTCTTTGGGTAAGT3'	pABD6-1 2
11	5'ATTTGGGCCTAGTCTAGCCGGC3'	ParD_BS_fw
12	5'GCGCGATCCCCGCTG3'	ParD_BS_rev

**Tabela2. Wartości liczbowe dla Ryciny 8B. Wszystkie szczepy z inaktywacją proteaz zostały porównane do szczepu dzikiego.**

Szczep <i>E. Coli</i>	Czas [min]								Wartość P
	0	10	20	40	60	120	180		
wt	100	82.2	65.2	57.5	32.6	13.6	1.3	ŚR [%]	-
	0	8.9	5.2	4.8	20.5	9.0	0.8	SD [%]	
<i>clpA</i> -	100	91.4	84.9	75.6	75.6	77.4	54.6	ŚR [%]	1.3x10 <sup>-3</sup>
	0	6.6	4.7	4.2	8.9	8.3	1.1	SD [%]	
<i>clpX</i> -	100	86.3	85.7	60.3	48.2	33.0	20.2	ŚR [%]	0.34
	0	10.7	8.2	3.2	13.6	11.4	23.9	SD [%]	
<i>clpY</i> -	100	82.4	64.7	51.6	50.2	37.7	15.1	ŚR [%]	0.59
	0	10.9	12.8	1.0	3.0	10.9	10.5	SD [%]	
<i>lon</i> -	100	81.8	79.8	45.4	37.4	38.2	25.2	ŚR [%]	0.56
	0	23.9	17.8	16.8	10.1	10.0	17.9	SD [%]	



**Tabela 3. Wartości liczbowe dla Ryciny 11B**

Obecność DNA	Czas [min]						$V_0$ [mol/min]	
	0	5	15	30	60	120		
(-) DNA	100	77.2	54.4	37.4	28.2	23.9	ŚR [%]	$1.9 \times 10^{-11}$
	0	3.7	5.3	7.5	5.4	3.8	SD [%]	$\pm 0.85$
(+) DNA	100	53.4	21.1	16.3	12.3	10.1	ŚR [%]	$4.9 \times 10^{-12}$
	0	12.5	1.9	3.9	4.2	2.6	SD [%]	$\pm 2.3$
Wartość P = $5 \times 10^{-4}$								

**Tabela 4. Wartości liczbowe dla Ryciny 14A**

Indukcja <i>parE</i>	Czas [min]							
	0	10	20	40	60	120	180	
(-) <i>parE</i>	100	72	58.4	36.5	12.2	4.1	4.6	ŚR [%]
	0	13.2	5.1	5.5	5.2	4.1	4.6	SD [%]
(+) <i>parE</i>	100	93.7	85.2	69.4	51.5	31.5	8.3	ŚR [%]
	0	3.6	9.7	1.9	9.8	10.3	6.5	SD [%]
Wartość P = 0.047								

**Tabela 5. Wartości liczbowe dla Ryciny 19**

	Utrata plazmidu na generację [%]					
	wt			<i>clpA</i> -		
	pBBR1	pABD6-1	Wartość P	pBBR1	pABD6-1	Wartość P
<i>E. coli</i>	1.107 $\pm 0.061$	0.129 $\pm 0.095$	$7.4 \times 10^{-5}$	1.223 $\pm 0.089$	0.886 $\pm 0.19$	0.9
<i>C. crescentus</i>	2.991 $\pm 0.372$	0.209 $\pm 0.1$	$3.7 \times 10^{-5}$	2.812 $\pm 0.324$	1.936 $\pm 0.056$	0.4
<i>P. putida</i>	1.05 $\pm 0.385$	0.178 $\pm 0.055$	$11.3 \times 10^6$	0.398 $\pm 0.161$	0.369 $\pm 0.051$	0.6

## Literatura

- Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., i Laub, M.T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the  $\beta$  sliding clamp. *Molecular cell* 52, 617-628.
- Afif, H., Allali, N., Couturier, M., i Van Melderen, L. (2001). The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the *ccd* poison–antidote system. *Molecular microbiology* 41, 73-82.
- Alawneh, A. M., Qi, D., Yonesaki, T., & Otsuka, Y. (2016). An ADP-ribosyltransferase A It of bacteriophage T 4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin–antitoxin module. *Molecular microbiology*, 99(1), 188-198.
- Anantharaman, V., i Aravind, L. (2003). New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome biology* 4, R81.
- Appleyard, R.K. (1954). Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from *Escherichia Coli* K12. *Genetics* 39, 440-452.
- Arbing, M.A., Handelman, S.K., Kuzin, A.P., Verdon, G., Wang, C., Su, M., Rothenbacher, F.P., Abashidze, M., Liu, M., i Hurley, J.M. (2010). Crystal structures of Phd-Doc, HlgA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure* 18, 996-1010.
- Arcus, V.L., McKenzie, J.L., Robson, J., i Cook, G.M. (2010). The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin–antitoxin array. *Protein Engineering, Design & Selection* 24, 33-40.
- Baharoglu, Z., i Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS microbiology reviews* 38, 1126-1145.
- Baker, T.A., i Sauer, R.T. (2006). ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends in biochemical sciences* 31, 647-653.
- Banecki, B., Wawrzynow, A., Puzewicz, J., Georgopoulos, C., i Zylicz, M. (2001). Structure-function analysis of the zinc-binding region of the ClpX molecular chaperone. *The Journal of biological chemistry* 276, 18843-18848.
- Banerjee, S., Salunkhe, S.S., Apte-Deshpande, A.D., Mandi, N.S., Mandal, G., i Padmanabhan, S. (2009). Over-expression of proteins using a modified pBAD24 vector in *E. coli* expression system. *Biotechnol Lett* 31, 1031-1036.
- Bendtsen, K. L., Xu, K., Luckmann, M., Winther, K. S., Shah, S. A., Pedersen, C. N., & Brodersen, D. E. (2017). Toxin inhibition in *C. crescentus* VapBC1 is mediated by a flexible pseudo-palindromic protein motif and modulated by DNA binding. *Nucleic acids research*, 45(5), 2875-2886.
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., & Wang, J. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, 379(6562), 225.
- Berghoff, B.A., i Wagner, E.G.H. (2017). RNA-based regulation in type I toxin–antitoxin systems and its implication for bacterial persistence. *Current genetics* 63, 1011-1016.
- Bernard, P., i Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of molecular biology* 226, 735-745.
- Bøggild, A., Sofos, N., Andersen, K.R., Feddersen, A., Easter, A.D., Passmore, L.A., i Brodersen, D.E. (2012). The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity. *Structure* 20, 1641-1648.
- Brodersen, D.E. (2016). Toxin inhibition in *C. crescentus* VapBC1 is mediated by a flexible pseudo-palindromic protein motif and modulated by DNA binding. *Nucleic acids research* 45, 2875-2886.
- Brielle, R., Pinel-Marie, M.-L., i Felden, B. (2016). Linking bacterial type I toxins with their actions. *Current opinion in microbiology* 30, 114-121.

- Brinkman, C.L., Bumgarner, R., Kittichotirat, W., Dunman, P.M., Kuechenmeister, L.J., i Weaver, K.E. (2013). Characterization of the effects of an *rpoC* mutation that confers resistance to the Fst peptide toxin-antitoxin system toxin. *Journal of bacteriology* 195, 156-166.
- Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J.M., Davenport, A., Wood, T.K., Peti, W., i Page, R. (2009). Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS pathogens* 5, e1000706.
- Brzozowska, I., i Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70, 33-41.
- Brzozowska, I., i Zielenkiewicz, U. (2014). The ClpXP protease is responsible for the degradation of the Epsilon antidote to the Zeta toxin of the *streptococcal* pSM19035 plasmid. *Journal of Biological Chemistry* 289, 7514-7523.
- Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M.-H., Wyns, L., i Loris, R. (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends in biochemical sciences* 30, 672-679.
- Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., Van Nuland, N.A., Loris, R., i Zenkin, N. (2013). The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. *Nature chemical biology* 9, 811.
- Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K., & Mitarai, N. (2012). Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic acids research*, 40(14), 6424-6434.
- Cataudella, I., Sneppen, K., Gerdes, K., & Mitarai, N. (2013). Conditional cooperativity of toxin-antitoxin regulation can mediate bistability between growth and dormancy. *PLoS computational biology*, 9(8), e1003174.
- Chan, W.T., Espinosa, M., i Yeo, C.C. (2016). Keeping the wolves at bay: antitoxins of prokaryotic type II toxin-antitoxin systems. *Frontiers in molecular biosciences* 3, 9.
- Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M.G., i Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Molecular microbiology* 75, 333-348.
- Christensen, S.K., i Gerdes, K. (2003a). RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Molecular microbiology* 48, 1389-1400.
- Christensen, S. K., Pedersen, K., Hansen, F. G., & Gerdes, K. (2003b). Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *Journal of molecular biology*, 332(4), 809-819.
- Cook, G.M., Robson, J.R., Frampton, R.A., McKenzie, J., Przybilski, R., Fineran, P.C., i Arcus, V.L. (2013). Ribonucleases in bacterial toxin-antitoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 523-531.
- Cruz, J.W., Rothenbacher, F.P., Maehigashi, T., Lane, W.S., Dunham, C.M., i Woychik, N.A. (2014). Doc toxin is a kinase that inactivates elongation factor Tu. *Journal of Biological Chemistry* 289, 7788-7798.
- Dalton, K.M., i Crosson, S. (2010). A Conserved Mode of Protein Recognition and Binding in a ParD-ParE Toxin-Antitoxin Complex. *Biochemistry* 49, 2205-2215.
- Davis, T.L., Helinski, D.R., i Roberts, R.C. (1992). Transcription and autoregulation of the stabilizing functions of broad-host-range plasmid RK2 in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 6, 1981-1994.
- De Jonge, N., Garcia-Pino, A., Buts, L., Haesaerts, S., Charlier, D., Zangger, K., Wyns, L., De Greve, H., i Loris, R. (2009). Rejuvenation of CcdB-poisoned gyrase by an intrinsically disordered protein domain. *Molecular cell* 35, 154-163.
- Diago-Navarro, E., Hernández-Arriaga, A.M., Kubik, S., Konieczny, I., i Díaz-Orejas, R. (2013). Cleavage of the antitoxin of the *parD* toxin-antitoxin system is determined by the ClpAP protease and is modulated by the relative ratio of the toxin and the antitoxin. *Plasmid* 70, 78-85.

- Dienemann, C., Bøggild, A., Winther, K.S., Gerdes, K., i Brodersen, D.E. (2011). Crystal structure of the VapBC toxin–antitoxin complex from *Shigella flexneri* reveals a hetero-octameric DNA-binding assembly. *Journal of molecular biology* 414, 713-722.
- Doran, K.S., Konieczny, I., i Helinski, D.R. (1998). Replication origin of the broad host range plasmid RK2. Positioning of various motifs is critical for initiation of replication. *The Journal of biological chemistry* 273, 8447-8453.
- Dörr, T., Lewis, K., i Vulić, M. (2009). SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS genetics* 5, e1000760.
- Dörr, T., Vulić, M., i Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS biology* 8, e1000317.
- Dougan, D.A., Reid, B.G., Horwich, A.L., i Bukau, B. (2002). ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell* 9, 673-683.
- Dubiel, A., Wegrzyn, K., Kupinski, A.P., i Konieczny, I. (2018). ClpAP protease is a universal factor that activates the *parDE* toxin-antitoxin system from a broad host range RK2 plasmid. *Scientific reports* 8.
- Dy, R.L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G.P., i Fineran, P.C. (2014a). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin mechanism. *Nucleic acids research* 42, 4590-4605.
- Dy, R.L., Richter, C., Salmond, G.P., i Fineran, P.C. (2014b). Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual review of virology* 1, 307-331.
- Eberl, L., Givskov, M., i Schwab, H. (1992). The divergent promoters mediating transcription of the *par* locus of plasmid RP4 are subject to autoregulation. *Molecular microbiology* 6, 1969-1979.
- Engelberg-Kulka, H., Hazan, R., i Amitai, S. (2005). *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *Journal of cell science* 118, 4327-4332.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D., i Bukau, B. (2006). ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature* 439, 753.
- Erbse, A.H., Wagner, J.N., Truscott, K.N., Spall, S.K., Kirstein, J., Zeth, K., Turgay, K., Mogk, A., Bukau, B., i Dougan, D.A. (2008). Conserved residues in the N-domain of the AAA+ chaperone ClpA regulate substrate recognition and unfolding. *The FEBS journal* 275, 1400-1410.
- Feng, J., Kessler, D. A., Ben-Jacob, E., & Levine, H. (2014). Growth feedback as a basis for persister bistability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 544-549.
- Fiebig, A., Castro Rojas, C.M., Siegal-Gaskins, D., i Crosson, S. (2010). Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin–antitoxin systems. *Molecular microbiology* 77, 236-251.
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., i Salmond, G.P. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 894-899.
- Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E.V., i Storz, G. (2010). Abundance of type I toxin–antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic acids research* 38, 3743-3759.
- Garcia-Pino, A., Balasubramanian, S., Wyns, L., Gazit, E., De Greve, H., Magnuson, R.D., Charlier, D., van Nuland, N.A., i Loris, R. (2010). Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity. *Cell* 142, 101-111.
- Gelens, L., Hill, L., Vandervelde, A., Danckaert, J., & Loris, R. (2013). A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*. *PLoS computational biology*, 9(8), e1003190.

- Georgiades, K. (2012). Genomics of epidemic pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 213-217.
- Georgiades, K., i Raoult, D. (2011). Genomes of the most dangerous epidemic bacteria have a virulence repertoire characterized by fewer genes but more toxin-antitoxin modules. *PLoS one* 6, e17962.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., i Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Reviews Microbiology* 3, 371.
- Gerdes, K., Rasmussen, P.B., i Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 3116-3120.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., i Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular cell* 52, 248-254.
- Gillespie, J.J., Kaur, S.J., Rahman, M.S., Rennoll-Bankert, K., Sears, K.T., Beier-Sexton, M., i Azad, A.F. (2014). Secretome of obligate intracellular Rickettsia. *FEMS microbiology reviews* 39, 47-80.
- Goeders, N., Chai, R., Chen, B., Day, A., i Salmond, G. (2016). Structure, evolution, and functions of bacterial type III toxin-antitoxin systems. *Toxins* 8, 282.
- Goeders, N., Drèze, P.-L., i Van Melderen, L. (2013). Relaxed cleavage specificity within the RelE toxin family. *Journal of bacteriology* 195, 2541-2549.
- Goeders, N., i Van Melderen, L. (2014). Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins* 6, 304-324.
- Gottesman, S., Clark, W.P., de Crecy-Lagard, V., i Maurizi, M.R. (1993). ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities. *The Journal of biological chemistry* 268, 22618-22626.
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A.C., i Maurizi, M.R. (1998). Enzymatic and Structural Similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent Proteases, ClpXP and ClpAP. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12476-12481.
- Guglielmini, J., i Van Melderen, L. (2011). Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere. *Mobile genetic elements* 1, 283-306.
- Guo, Y., Quiroga, C., Chen, Q., McAnulty, M.J., Benedik, M.J., Wood, T.K., i Wang, X. (2014). RaiR (a DNase) and RaiA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 42, 6448-6462.
- Gupta, K., Tripathi, A., Sahu, A., i Varadarajan, R. (2017). Contribution of the Chromosomal *ccdAB* Operon to Bacterial Drug Tolerance. *Journal of Bacteriology* 199, e00397-00317.
- Gupta, M., Nayyar, N., Chawla, M., Sitaraman, R., Bhatnagar, R., i Banerjee, N. (2016). The chromosomal *parDE2* toxin-antitoxin system of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: genetic and functional characterization. *Frontiers in microbiology* 7, 886.
- Gur, E., i Sauer, R.T. (2009). Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18503-18508.
- Harms, A., Brodersen, D.E., Mitarai, N., i Gerdes, K. (2018). Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Molecular cell* 70, 768-784.
- Harms, A., Fino, C., Sørensen, M.A., Semsey, S., i Gerdes, K. (2017). Prophages and growth dynamics confound experimental results with antibiotic-tolerant persister cells. *MBio* 8, e01964-01917.
- Harms, A., Maisonneuve, E., i Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354, aaf4268.

- Harrison, J.J., Wade, W.D., Akierman, S., Vacchi-Suzzi, C., Stremick, C.A., Turner, R.J., i Ceri, H. (2009). The chromosomal toxin gene *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 2253-2258.
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496-1499.
- Hayes, F., i Van Melderen, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 46, 386-408.
- Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., i Holden, D.W. (2014). Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* 343, 204-208.
- Hoskins, J.R., Kim, S.-Y., i Wickner, S. (2000). Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *Journal of Biological Chemistry* 275, 35361-35367.
- Hoskins, J.R., Yanagihara, K., Mizuuchi, K., i Wickner, S. (2002). ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 11037-11042.
- Jahn, N., Brantl, S., i Strahl, H. (2015). Against the mainstream: the membrane-associated type I toxin BsrG from *Bacillus subtilis* interferes with cell envelope biosynthesis without increasing membrane permeability. *Molecular microbiology* 98, 651-666.
- Jenal, U., & Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *The EMBO journal*, 17(19), 5658-5669.
- Jensen, R.B., i Gerdes, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Molecular microbiology* 17, 205-210.
- Jensen, R.B., Grohmann, E., Schwab, H., Díaz-Orejas, R., i Gerdes, K. (1995). Comparison of *ccd* of F, *parDE* of RP4, and *parD* of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Molecular microbiology* 17, 211-220.
- Jiang, Y., Pogliano, J., Helinski, D.R., i Konieczny, I. (2002). ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Molecular microbiology* 44, 971-979.
- Johnson, E.P., Strom, A.R., i Helinski, D.R. (1996). Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. *Journal of Bacteriology* 178, 1420-1429.
- Kamada, K., Hanaoka, F., i Burley, S.K. (2003). Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Molecular cell* 11, 875-884.
- Kandror, O., Busconi, L., Sherman, M., i Goldberg, A.L. (1994). Rapid degradation of an abnormal protein in *Escherichia coli* involves the chaperones GroEL and GroES. *The Journal of biological chemistry* 269, 23575-23582.
- Karłowicz, A., Wegrzyn, K., Dubiel, A., Ropelewska, M., i Konieczny, I. (2016). Proteolysis in plasmid DNA stable maintenance in bacterial cells. *Plasmid* 86, 7-13.
- Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S., Clark, W. P., & Maurizi, M. R. (1988). The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *Journal of Biological Chemistry*, 263(29), 15226-15236.
- Kawano, M. (2012). Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: *hok/sok*, *ldr/rdl*, *symE/symR*. *RNA biology* 9, 1520-1527.
- Keren, I., Minami, S., Rubin, E., i Lewis, K. (2011). Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *MBio* 2, e00100-00111.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., i Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 186, 8172-8180.

- Kędzierska, B., i Hayes, F. (2016a). Transcriptional Control of Toxin–Antitoxin Expression: Keeping Toxins Under Wraps Until the Time is Right. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, 463-472.
- Kędzierska, B., i Hayes, F. (2016b). Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis. *Molecules* 21, 790.
- Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., i Yonesaki, T. (2011). *Escherichia coli* *rnIA* and *rnIB* compose a novel toxin–antitoxin system. *Genetics* 187, 123-130.
- Kolatka, K., Witosinska, M., Pierechod, M., i Konieczny, I. (2008). Bacterial partitioning proteins affect the subcellular location of broad-host-range plasmid RK2. *Microbiology* 154, 2847-2856.
- Kotte, O., Volkmer, B., Radzikowski, J.L., i Heinemann, M. (2014). Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Molecular systems biology* 10, 736.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175-176.
- Kubik, S., Wegrzyn, K., Pierechod, M., i Konieczny, I. (2011). Opposing effects of DNA on proteolysis of a replication initiator. *Nucleic acids research* 40, 1148-1159.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-5.
- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., & Yarmolinsky, M. B. (1993). Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: *doc*, which causes cell death on curing of prophage, and *phd*, which prevents host death when prophage is retained. *Journal of molecular biology*, 233(3), 414-428.
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dreze, P., i Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic acids research* 39, 5513-5525.
- Li, G. W., Burkhardt, D., Gross, C., & Weissman, J. S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*, 157(3), 624-635.
- Lin, C. Y., Awano, N., Masuda, H., Park, J. H., & Inouye, M. (2013). Transcriptional repressor HipB regulates the multiple promoters in *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 23(6), 440-447.
- Loris, R., & Garcia-Pino, A. (2014). Disorder-and dynamics-based regulatory mechanisms in toxin–antitoxin modules. *Chemical reviews*, 114(13), 6933-6947.
- Lou, C., Li, Z., & Ouyang, Q. (2008). A molecular model for persister in *E. coli*. *Journal of theoretical biology*, 255(2), 205-209.
- Maglica, Ž., Striebel, F., i Weber-Ban, E. (2008). An intrinsic degradation tag on the ClpA C-terminus regulates the balance of ClpAP complexes with different substrate specificity. *Journal of molecular biology* 384, 503-511.
- Maisonneuve, E., i Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* 157, 539-548.
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jørgensen, M.G., i Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 13206-13211.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., i Koonin, E.V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology direct* 4, 19.
- Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.P., i Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 84, 979-989.
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Bernal, P., Roca, A., de la Torre, J., i Ramos, J.L. (2016). Specific gene loci of clinical *Pseudomonas putida* isolates. *PLoS One* 11, e0147478.

- Moll, I., i Engelberg-Kulka, H. (2012). Selective translation during stress in *Escherichia coli*. *Trends in biochemical sciences* 37, 493-498.
- Monti, M. C., Hernandez-Arriaga, A. M., Kamphuis, M. B., López-Villarejo, J., Heck, A. J., Boelens, R., ... & van den Heuvel, R. H. (2007). Interactions of Kid–Kis toxin–antitoxin complexes with the *parD* operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid–Kis oligomers. *Nucleic acids research*, 35(5), 1737-1749.
- Moritz, E.M., i Hergenrother, P.J. (2007). Toxin–antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 311-316.
- Moyed, H.S., i Bertrand, K.P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of bacteriology* 155, 768-775.
- Muñoz-Gómez, A.J., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A., Lemonnier, M., i Díaz-Orejas, R. (2004). Insights into the specificity of RNA cleavage by the *Escherichia coli* MazF toxin. *FEBS letters* 567, 316-320.
- Muthuramalingam, M., White, J., i Bourne, C. (2016). Toxin-antitoxin modules are pliable switches activated by multiple protease pathways. *Toxins* 8, 214.
- Muthuramalingam, M., White, J. C., Murphy, T., Ames, J. R., & Bourne, C. R. (2019). The toxin from a *parDE* toxin-antitoxin system found in *Pseudomonas aeruginosa* offers protection to cells challenged with anti-gyrase antibiotics. *Molecular microbiology*, 111(2), 441-454.
- Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R.L., i Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin–antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS biology* 9, e1001033.
- Neubauer, C., Gao, Y.-G., Andersen, K.R., Dunham, C.M., Kelley, A.C., Hentschel, J., Gerdes, K., Ramakrishnan, V., i Brodersen, D.E. (2009). The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell* 139, 1084-1095.
- Norton, J.P., i Mulvey, M.A. (2012). Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS pathogens* 8, e1002954.
- Oberer, M., Lindner, H., Glatter, O., Kratky, C., i Keller, W. (1999). Thermodynamic properties and DNA binding of the ParD protein from the broad host-range plasmid RK2/RP4 killing system. *Biol Chem* 380, 1413-1420.
- Oberer, M., Zangger, K., Prytulla, S., i Keller, W. (2002). The anti-toxin ParD of plasmid RK2 consists of two structurally distinct moieties and belongs to the ribbon-helix-helix family of DNA-binding proteins. *Biochemical Journal* 361, 41-47.
- Oberer, M., Zangger, K., Gruber, K., i Keller, W. (2007). The solution structure of ParD, the antidote of the *parDE* toxin–antitoxin module, provides the structural basis for DNA and toxin binding. *Protein Science* 16, 1676-1688.
- Ogura, T., i Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 4784-4788.
- Otsuka, Y., i Yonesaki, T. (2012). Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins. *Molecular microbiology* 83, 669-681.
- Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M.G., i Gerdes, K. (2008). Messenger RNA interferase RelE controls *relBE* transcription by conditional cooperativity. *Molecular microbiology* 69, 841-857.
- Page, R., i Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature chemical biology* 12, 208.
- Pandey, D.P., i Gerdes, K. (2005). Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic acids research* 33, 966-976.
- Pansegrau, W., i Lanka, E. (1996). Enzymology of DNA transfer by conjugative mechanisms. *In Progress in nucleic acid research and molecular biology* (Elsevier), pp. 197-251.



- Pecota, D.C., i Wood, T.K. (1996). Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *Journal of bacteriology* 178, 2044-2050.
- Pedersen, K., Christensen, S.K., i Gerdes, K. (2002). Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Molecular microbiology* 45, 501-510.
- Rao, F., Short, F.L., Voss, J.E., Blower, T.R., Orme, A.L., Whittaker, T.E., Luisi, B.F., i Salmond, G.P. (2015). Co-evolution of quaternary organization and novel RNA tertiary interactions revealed in the crystal structure of a bacterial protein–RNA toxin–antitoxin system. *Nucleic acids research* 43, 9529-9540.
- Roberts, R.C., Burioni, R., i Helinski, D. (1990). Genetic characterization of the stabilizing functions of a region of broad-host-range plasmid RK2. *Journal of bacteriology* 172, 6204-6216.
- Roberts, R.C., Spangler, C., i Helinski, D. (1993). Characteristics and significance of DNA binding activity of plasmid stabilization protein ParD from the broad host-range plasmid RK2. *Journal of Biological Chemistry* 268, 27109-27117.
- Roberts, R.C., Ström, A.R., i Helinski, D.R. (1994). The *parDE* operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss. *Journal of molecular biology* 237, 35-51.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.-M., Biskri, L., Bouige, P., i Mazel, D. (2003). Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the *Vibrionaceae*. *Genome research* 13, 428-442.
- Sala, A., Calderon, V., Bordes, P., i Genevoux, P. (2013). TAC from *Mycobacterium tuberculosis*: a paradigm for stress-responsive toxin–antitoxin systems controlled by SecB-like chaperones. *Cell Stress and Chaperones* 18, 129-135.
- Sambrook, J., Russell, D. E., & Sambrook, J. (2006). The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press v.1ea
- Sauer, R.T., i Baker, T.A. (2011). AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annual review of biochemistry* 80, 587-612.
- Sberro, H., Leavitt, A., Kiro, R., Koh, E., Peleg, Y., Qimron, U., i Sorek, R. (2013). Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. *Molecular cell* 50, 136-148.
- Schifano, J.M., Cruz, J.W., Vvedenskaya, I.O., Edifor, R., Ouyang, M., Husson, R.N., Nickels, B.E., i Woychik, N.A. (2016). tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin. *Nucleic acids research* 44, 1256-1270.
- Schumacher, M.A., Piro, K.M., Xu, W., Hansen, S., Lewis, K., i Brennan, R.G. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* 323, 396-401.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A.B., Kaldalu, N., Kurg, K., i Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC microbiology* 6, 53.
- Shan, Y., Brown Gandt, A., Rowe, S.E., Deisinger, J.P., Conlon, B.P., i Lewis, K. (2017). ATP-Dependent Persister Formation in *Escherichia coli*. *mBio* 8, e02267-02216.
- Alawneh, A. M., Qi, D., Yonesaki, T., & Otsuka, Y. (2016). An ADP-ribosyltransferase A It of bacteriophage T 4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin–antitoxin module. *Molecular microbiology*, 99(1), 188-198.
- Short, F.L., Akusobi, C., Broadhurst, W.R., i Salmond, G.P. (2018). The bacterial Type III toxin-antitoxin system, *toxIN*, is a dynamic protein-RNA complex with stability-dependent antiviral abortive infection activity. *Scientific reports* 8, 1013.
- Short, F.L., Pei, X.Y., Blower, T.R., Ong, S.-L., Fineran, P.C., Luisi, B.F., i Salmond, G.P. (2013). Selectivity and self-assembly in the control of a bacterial toxin by an antitoxic noncoding RNA pseudoknot. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E241-E249.

- Sobecky, P.A., Easter, C.L., Bear, P., i Helinski, D.R. (1996). Characterization of the stable maintenance properties of the *par* region of broad-host-range plasmid RK2. *Journal of bacteriology* 178, 2086-2093.
- Soo, V. W., & Wood, T. K. (2013). Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD. *Scientific reports*, 3, 3186.
- Studier, F.W., i Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189, 113-130.
- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D., i Rowe-Magnus, D.A. (2007). Chromosomal toxin–antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Molecular microbiology* 63, 1588-1605.
- Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I., i Kimura, M. (2005). Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE–RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nature structural & molecular biology* 12, 327.
- Tan, Q., Awano, N., i Inouye, M. (2011). YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Molecular microbiology* 79, 109-118.
- Thomas, C.M., i Helinski, D.R. (1989). Vegetative replication and stable inheritance of IncP plasmids. Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria. *Academic Press, San Diego* 4, 1-25.
- Thomas, C.M., Meyer, R., i Helinski, D.R. (1980). Regions of broad-host-range plasmid RK2 which are essential for replication and maintenance. *Journal of bacteriology* 141, 213-222.
- Tripathi, A., Dewan, P.C., Barua, B., i Varadarajan, R. (2012). Additional role for the *ccd* operon of F-plasmid as a transmissible persistence factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 12497-12502.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., i Van Melderen, L. (2006). Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Research in microbiology* 157, 701-713.
- Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., i Ohtsubo, E. (1988). Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *Journal of bacteriology* 170, 1461-1466.
- Van Melderen, L., Bernard, P., i Couturier, M. (1994). Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Molecular microbiology* 11, 1151-1157.
- Van Melderen, L., Thi, M. H. D., Lecchi, P., Gottesman, S., Couturier, M., & Maurizi, M. R. (1996). Atp-dependent degradation of CcdA by Lon protease effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27730-27738.
- Vandervelde, A., Drobnak, I., Hadži, S., Sterckx, Y. G. J., Welte, T., De Greve, H., ... & Lah, J. (2017). Molecular mechanism governing ratio-dependent transcription regulation in the *ccdAB* operon. *Nucleic acids research*, 45(6), 2937-2950.
- Veening, J.-W., Smits, W.K., i Kuipers, O.P. (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 62, 193-210.
- Verstraeten, N., Knapen, W.J., Kint, C.I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J.E., Fu, Q., David, C.C., i Fierro, A.C. (2015). Obg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Molecular cell* 59, 9-21.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S.H., Ma, Q., Brown, B.L., Pu, M., Tarone, A.M., Benedik, M.J., Peti, W., Page, R., i *wsp*. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat Chem Biol* 7, 359-366.
- Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., i Peti, W. (2012). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature chemical biology* 8, 855.
- Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D., i Horwich, A.L. (1999). Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401, 90.

- Wen, J., i Fozo, E. (2014). sRNA antitoxins: more than one way to repress a toxin. *Toxins* 6, 2310-2335.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., i Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* 17, 3469-3478.
- Wozniak, R.A., i Waldor, M.K. (2009). A toxin–antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS genetics* 5, e1000439.
- Wu, W. F., Zhou, Y., & Gottesman, S. (1999). Redundant In Vivo Proteolytic Activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) Protease. *Journal of bacteriology*, 181(12), 3681-3687.
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., i Zhang, W. (2015). Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Frontiers in microbiology* 6, 1003.
- Yuan, J., Yamaichi, Y., i Waldor, M.K. (2011). The three *Vibrio cholerae* chromosome II-encoded ParE toxins degrade chromosome I following loss of chromosome II. *Journal of bacteriology* 193, 611-619.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., i Inouye, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular cell* 12, 913-923.