

Mechanizm regulacji replikacji plazmidów ColE1 przez białko Hfq *Escherichia coli*

Krzysztof Kubiak

Replikacja DNA jest jednym z podstawowych procesów komórkowych, niezbędnych do namnażania się lub rozmnażania ogromnej większości organizmów (wyjątkami są wiroidy i wirusy o genomach RNA). W związku z tym, określenie mechanizmów regulujących kontrolę tego procesu jest kluczowe dla zrozumienia podstawowych reguł biologicznych zapewniających funkcjonowanie, przeżycie i rozmnażanie się komórek zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. W komórkach bakteryjnych replikacja nukleoidu jest niezbędna dla przeżycia, jako że jakiegokolwiek czynniki, które w sposób istotny zaburzają ten proces powodują ostatecznie ich śmierć.

Escherichia coli (pałeczka okrężnicy), Gram-ujemna bakteria, jest jednym z najlepiej poznanych organizmów wśród dotychczas badanych. Replikacja jej chromosomu jest kontrolowana przez złożoną sieć regulatorów dla zapewnienia prawidłowego dziedziczenia informacji genetycznej. Ponadto, szereg pozachromosomalnych elementów genetycznych, jak plazmidy i bakteriofagi, mające zdolność do autonomicznego powielania się w komórkach *E. coli*, służą jako modele w badaniu mechanizmów istotnych procesów komórkowych, takich jak replikacja DNA. W związku z tym, z jednej strony możliwe jest prowadzenie zaawansowanych badań na poziomie molekularnym z wykorzystaniem modeli prokariotycznych, a z drugiej strony uzyskiwane wyniki takich badań zwykle mogą być uznawane jako rezultaty o znaczeniu ogólnobiologicznym. Ponadto należy pamiętać, że wiele plazmidów niesie geny warunkujące oporność na antybiotyki, stąd mają one duże znaczenie w medycynie, a poznanie ich funkcjonowania może pomóc w poszukiwaniach nowych leków antibakteryjnych. Co więcej, plazmidy odgrywają ogromną rolę w biotechnologii, jako że są często wykorzystywane jako wektory ekspresyjne w konstrukcji szczepów wydajnie produkujące rekombinantowe białka.

Białko Hfq *E. coli* zostało odkryte jako czynnik niezbędny do rozwoju bakteriofaga Q β , którego genom zbudowany jest z RNA. Ortologi genu *hfq* są obecne w niemal połowie do tej pory zsekwencjonowanych genomów bakteryjnych i u niektórych gatunków archeonów, zaś homologi strukturalne i funkcjonalne obecne są u większości organizmów eukariotycznych.

Sugeruje to ważną i ewolucyjnie konserwowaną rolę produktu tego genu. W komórkach *E. coli* większość cząsteczek białka Hfq występuje we frakcji cytoplazmatycznej, głównie związanej z rybosomami, ale część cząsteczek oddziałuje z błoną komórkową. Frakcja nukleoidowa Hfq stanowi 10-20%, co stanowi około 5% wszystkich białek związanych z nukleoidem, podczas gdy jej frakcje cytoplazmatyczne i związane z błoną stanowią odpowiednio około 30 i 50%. Białko Hfq zostało opisane jako wielofunkcyjne. Między innymi reguluje ono metabolizm RNA i oddziałuje z białkami związanymi z degradacją RNA, np. poli(A) polimerazą I (PAP I), PNP-azą i RNazą E. Opisano również udział białka Hfq w procesach związanych z wirulencją patogennych bakterii. Interesująca jest zaobserwowana funkcja Hfq w organizacji nukleoidu oraz jego interakcje z DNA. Delecja genu *hfq* objawia się różnorodnymi zmianami w fizjologii komórki, co świadczy o efekcie plejotropowym tego białka.

Wyniki wstępnych badań zespołów kierowanych przez promotorów mojej rozprawy doktorskiej, prof. Grzegorz Węgrzyna i prof. Veronique Arluison, sugerowały intrygującą możliwość, że Hfq może być zaangażowane – bezpośrednio lub pośrednio – w regulację replikacji DNA. Wstępne doświadczenia wykonane zostały z użyciem różnych plazmidów, a najciekawsze efekty zostały zaobserwowane w przypadku replikonów należących do grupy ColE1. Stąd też głównym celem tej rozprawy było poznanie mechanizmów regulacji replikacji plazmidów ColE1 przez białko Hfq. Replikacja tych plazmidów rozpoczyna się w rejonie *origin*, a w regulację tego procesu zaangażowane są dwa transkrypty, zwane RNA I oraz RNA II. Pre-primerowy transkrypt RNA II tworzy hybryd RNA-DNA w rejonie *origin*, a po nacięciu jego nici RNA przez RNazę H powstaje primer, który może być wydłużany przez DNA polimerazę I, co jest początkiem procesu replikacji plazmidu ColE1. Negatywnym regulatorem replikacji w tym przypadku jest RNA I, cząsteczka RNA częściowo komplementarna do RNA II, tworząca z nią hybryd, co uniemożliwia hybrydyzację RNA II z DNA. Dodatkowo, oddziaływania RNA I z RNA II są wzmacniane przez kodowane przez plazmid białko Rom. W czasie rozpoczynania przeze mnie prac nad rozprawą doktorską, rola białka Hfq w tym procesie była nieznana, a jedyne doświadczenia wskazujące na możliwość udziału tego białka w kontroli replikacji ColE1 były oparte na analizie efektywności transformacji mutantów *hfq* przy użyciu takiego plazmidu.

Pierwszy artykuł składający się na cykl publikacji tworzących tę rozprawę doktorską (**Front. Mol. Biosci. 2016; 3: 36**) jest pracą przeglądową, opisującą dokładniej wspomniane wyżej właściwości białka Hfq. W szczególności zwrócona została uwaga na oddziaływania pomiędzy Hfq a cząsteczkami DNA jak również dyskutowane są możliwości udziału tego białka w różnych procesach związanych z funkcjami DNA, między innymi replikacją plazmidów. Praca ta stanowi zatem wstęp teoretyczny do całości zaprezentowanego cyklu artykułów.

Druga praca przeglądowa zawarta w cyklu publikacji (**Methods Mol. Biol. 2022; w druku**), jest artykułem metodycznym, opisującym techniki używane do badania bakteryjnych białek amyloidowych w aspekcie oporności na antybiotyki. Metody opisane w tej pracy przedstawione zostały na modelach białka Hfq, którego domena C-końcowa tworzy struktury amyloidowe, a także plazmidów niosących geny oporności na antybiotyki. W tym świetle, jest to wprowadzenie do badań *in vivo*, jakie są następnie zawarte w kolejnych publikacjach tworzących cykl przedstawiony jako moja rozprawa doktorska.

Moje badania rozpocząłem od określania możliwości oddziaływań białka Hfq z DNA oraz efektów jakie takie oddziaływania wywołują na strukturę tego kwasu nukleinowego. W artykule opisującym te badania (**Nucleic Acids Res. 2017; 45: 7299-7308**) do analiz oddziaływań C-końcowej i N-końcowej białka Hfq z DNA, zostały wykorzystane różne zaawansowane metody eksperymentalne, w tym obrazowanie pojedynczych cząsteczek DNA zamkniętych w kanałach nano-cieczowych przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego, mikroskopia sił atomowych, izotermiczne miareczkowanie mikrokalorymetryczne, a także testy ruchliwości elektroforetycznej. Uzyskane wyniki wskazały na rolę C-końcowej domeny białka Hfq w wiązaniu DNA, zmianie właściwości mechanicznych podwójnej helisy i zagęszczaniu DNA do postaci skondensowanej. Wydaje się, że skłonność do mostkowania i zagęszczania DNA przez domenę C-końcową Hfq może być związana z agregacją związanego białka i może mieć znaczenie dla regulacji ekspresji genów oraz replikacji DNA.

Kolejna praca eksperymentalna (**Int. J. Mol. Sci. 2021; 22: 8886**) dotyczyła roli białka Hfq i jego domeny C-końcowej w regulacji oporności bakterii na antybiotyki, związanej z obecnością odpowiednich genów na plazmidach, w tym na plazmidach typu ColE1. Okazało się, że obecność białka Hfq była wymagana do przeżycia komórek *E. coli* zawierających plazmid w warunkach wysokich stężeń chloramfenikolu, tetracykliny i ampicyliny, ponieważ

szczyty *hfq*⁺ wykazywały większą odporność na te antybiotyki niż mutant *hfq*-null. W przeciwieństwie do tego, wytwarzanie Hfq skutkowało niską opornością na wysokie stężenia kanamycyny, gdy marker oporności na antybiotyki był przenoszony przez chromosom, jako że delecja *hfq* skutkowało zwiększeniem przeżywalności bakterii. Wyniki te zaobserwowano zarówno na podłożu stałym, jak i płynnym, co sugeruje, że oporność na antybiotyki jest nieodłączną cechą tych szczepów, a nie konsekwencją adaptacji. Pomimo swojej głównej roli jako białka opiekuńczego RNA, które wpływa również na stabilność mRNA, nie stwierdzono, aby białko Hfq znacząco wpływało na degradację mRNA genów *kan* i *tet*. Niemniej, poziomy mRNA *kan* były wyższe w mutancie *hfq*-null w porównaniu ze szczepem *hfq*⁺, co sugeruje, że Hfq może działać jako represor ekspresji genu *kan*. Ta obserwacja koreluje ze zwiększoną opornością na wysokie poziomy kanamycyny obserwowaną w mutancie *hfq*-null. Ponadto stwierdzono, że wymagania obecności Hfq dla oporności na wysokie dawki tetracykliny zależy od liczby kopii plazmidu, gdyż zjawisko to obserwowano tylko wtedy, gdy gen oporności był ekspresjonowany z plazmidu o małej liczbie kopii (pSC101), ale nie z plazmidu o średniej liczbie kopii (pBR322 – plazmid typu ColE1). Sugeruje to, że Hfq może wpływać na przeżycie bakterii w przypadku wysokich dawek antybiotyków, ale mechanizmy tego procesu pozostają do zbadania. Potwierdziłem, że wydajność transformacji bakterii plazmidem z grupy ColE1 jest obniżona w przypadku mutantów *hfq* w stosunku do bakterii dzikiego typu. Badania z mutantem pBR322Δrom mogą również sugerować wzajemne oddziaływanie między Hfq i Rom w regulacji replikacji plazmidów typu ColE1. Wyniki eksperymentów z mutantem pozbawionym części genu *hfq* kodującej domenę C-końcową Hfq sugerują, że domena ta, podobnie jak domena N-końcowa, mogą niezależnie od siebie brać udział w regulacji ekspresji antybiotyko-oporności w komórkach *E. coli*.

W celu dokładnego zbadania oddziaływań C-terminalnej domeny białka Hfq z cząsteczkami RNA oraz fragmentem DNA, które są zaangażowane w regulację replikacji plazmidu typu ColE1, została wykorzystana metoda dichroizmu kołowego przy użyciu promieniowania synchrotronowego. Wyniki tych badań zostały opisane ostatniej pracy eksperymentalnej wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej (**Appl. Sci.** **2022**; **12**: **2639**). Ze względu na dużą masę cząsteczkową kompleksów utworzonych między kwasami nukleinowymi i postacią amyloidową białka, trudno jest analizować utworzone kompleksy wyłącznie za pomocą testu opóźnienia migracji w żelu elektroforetycznym, ponieważ

wszystkie one migrują z podobną szybkością. Ponadto dokładne pomiary kinetyki nie są możliwe przy użyciu testu opóźnienia migracji w żelu. Zastosowane zostało zatem podejście biofizyczne, oparte na użyciu synchrotronu, a w szczególności dichroizm kołowy promieniowania synchrotronowego, w celu zbadania interakcji regionu C-końcowego białka Hfq z kwasami nukleinowymi zaangażowanymi w kontrolę replikacji plazmidu typu ColE1. Uzyskane wyniki wskazały, że C-końcowa domena Hfq ma nieoczekiwany i znaczący wpływ na oddziaływanie kwasów nukleinowych zaangażowanych w ten proces i, co ważniejsze, na ich dopasowanie. Funkcjonalne konsekwencje tej nowo odkrytej właściwości regionu amyloidowego Hfq są ważne dla zrozumienia biologicznego znaczenia Hfq w procesie replikacji plazmidu typu ColE1 oraz oporności bakterii na antybiotyki. W szczególności uzyskane wyniki pozwalają na zaproponowanie hipotezy, że Hfq odgrywa negatywną rolę w regulacji replikacji plazmidu ColE1 poprzez stymulację oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA I i RNA II, hamując tworzenie hybrydu RNA II – DNA, co z kolei obniża efektywność inicjacji replikacji plazmidu. Obniżenie wydajności transformacji mutantów *hfq* plazmidami typu ColE1 może zatem wynikać nie z zahamowania replikacji cząsteczek plazmidowych pod nieobecność białka Hfq, ale raczej z nadmiernej intensywności ich replikacji (zjawiska zwanego niekontrolowaną replikacją plazmidów), prowadząc do obniżenia żywotności komórek bakteryjnych, które pobrały cząsteczki plazmidowego DNA.

W podsumowaniu, moje badania opisane w tej rozprawie, doprowadziły do następujących kluczowych wniosków dotyczących roli białka Hfq w regulacji replikacji plazmidów typu ColE1:

1. Białko Hfq, a w szczególności jego domena C-terminalna, zmienia właściwości mechaniczne i topologię podwójnej helisy DNA, co może mieć znaczenie w regulacji replikacji DNA.
2. Wydajność transformacji mutantów *hfq* plazmidami typu ColE1 jest obniżona, przy czym możliwe są wzajemne oddziaływania między Hfq i Rom w regulacji replikacji tych plazmidów.
3. Stymulując oddziaływania pomiędzy RNA I i RNA II, białko Hfq, a w szczególności jego domena C-końcowa, może działać jako negatywny regulator inicjacji replikacji plazmidów typu ColE1.

4. W warunkach braku aktywności białka Hfq może dochodzić do nadmiernej replikacji plazmidów ColE1 w komórkach *E. coli* (tak zwana niekontrolowana replikacja plazmidów), co prowadzi do obniżenia żywotności bakterii.