

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos fakultetas



Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Albinas Čepauskas

Bakalaurinis darbas

***Acinetobacter baumannii* toksino-antitoksino sistemos
CheTA antitoksino veikimo mechanizmo paieška**

Darbo vadovė:

Dr. Julija Armalytė

Vilnius 2016

Santrauka

Acinetobacter baumannii yra gram neigiamas oportunistinis patogenas, sukeliantis įvairias hospitalines infekcijas. Dėl gebėjimo išgyventi nepalankiomis klinikinėmis sąlygomis, ir sparčiai įgyti atsparumą įvairiems antibiotikams, ši bakterija laikoma vienu svarbiausių žmogaus patogenų sutinkamų ligoninėse. Nepaisant vis didėjančio mokslininkų susidomėjimo, molekuliniai mechanizmai, kurie lemia šio patogeno sėkmę klinikinėje aplinkoje lieka neaiškūs.

Pastaruosius du dešimtmečius vis didesnę susidomėjimą kelia bakterijų toksino-antitoksino sistemos. Tai maži mažakopijinės plazmidės bei chromosomose paplitę genetiniai lokusai, kuriems priskiriamos įvairios funkcijos. Manoma, kad TA sistemos svarbios plazmidžių išlaikymui, bendrajam atsakui į stresą, ląstelių išlikėlių formavimui bei apsaugai nuo bakteriofaginių infekcijų. Standartinę TA sistemą sudaro stabilus toksinas ir labilus antitoksinas, kuris neutralizuoja toksino poveikį. Aplinkoje esant maisto medžiagų stygiui arba antibiotikams antitoksinas yra greitai degraduojamas, ko pasekoje gali pasireikšti ląstelėms toksiškas toksino poveikis. Toksinai slopina ląstelėms gyvybiškai svarbius procesus, tokius kaip DNR replikacija, baltymų transliacija ar peptidoglikano sintezė, ko pasekoje stabdomas bakterijų augimas.

Šiame darbe tiriama analogiškų TA sistemų neturinti *A. baumannii* TA sistema CheTA. Ši sistema pasižymi unikalios organizacija, kadangi toksinas turi HTH domeną, kuris labiau būdingas antitoksiniams, o antitoksinui būdingas GNAT domenas. Pasitelkiant žudymo - gelbėjimo eksperimentus nustatyta, kad sistema yra funkcionali *E.coli* ir *A. baylyi* bakterijose. Remiantis antitoksino CheA tretinės struktūros modeliu, bei homologija kitiems GNAT baltymams, pasirinktos trys aminorūgščių pozicijos, esančios acil-KoA surišimo kišenėje, kurios galėtų būti svarbios šio baltymo aciltransferaziniui aktyvumui. Pasirinktose pozicijose įvedus priešingų savybių aminorūgštis paaiškėjo, kad jos nėra kritiškai svarbios antitoksino gebėjimui neutralizuoti toksino poveikį. Tai gali rodyti skirtumus tarp GNAT superšeimos narių aktyviųjų centrų, arba tai, kad šios sistemos toksinas neutralizuojamas kitais būdais.

Summary

Investigation of activity of *Acinetobacter baumannii* toxin-antitoxin system antitoxin

Acinetobacter baumannii is a gram negative opportunistic pathogen which causes variety of nosocomial infections. Due to the ability to persist in clinical environment and rapidly acquire antibiotic resistant phenotype it has emerged as one of the most important human pathogens in hospital settings. Despite the increasing effort of researchers, molecular mechanisms which contribute to this successful emergence remain elusive. In the last two decades bacterial toxin-antitoxin (TA) systems, genetic loci abundant in low copy number plasmids and chromosomes, sparked a great interest from scientists. They have been proposed to fulfill a myriad of roles in bacterial physiology, including plasmid stabilization, stress response, persistence and protection from phage infections. A standard TA system is composed of a stable toxin and a labile antitoxin that neutralizes the toxic effect of its cognate toxin. Under stressful conditions such as nutrient starvation or exposure to antibiotics, antitoxin is rapidly degraded allowing toxin to obstruct essential cellular processes such as DNA replication, translation or peptidoglycan synthesis which subsequently cause growth arrest. In this work we examined a novel *A. baumannii* TA system CheTA, which exhibits unique organization, due to toxin possessing an HTH domain, more common for antitoxins of TA systems, and antitoxin possessing GNAT fold. By using kill-rescue assay we determined that the system is functional in both *E. coli* host and *Acinetobacter baylyi* strain. CheA protein structure prediction indicated several conservative amino acid positions, possibly important for acetyltransferase activity. When mutations were introduced in the proposed positions in GNAT acetyl-CoA binding pocket, they were not critical for neutralization of the toxin. This might indicate differences among GNAT protein active sites as well as toxin inactivation of this TA system being achieved by other means.