

Warianty receptora GerA w przetrwalnikach różnych szczepów laboratoryjnych *Bacillus subtilis*.

Anna Grela

Bacillus subtilis to Gram-dodatnia laseczka tlenowa, zdolna do tworzenia metabolicznie nieaktywnych form przetrwalnych – spor. Szczepy laboratoryjne tego gatunku od lat wykorzystywane są jako modele w badaniach podstawowych skupiających się m.in. na procesie sporulacji i kiełkowania przetrwalników bakteryjnych.

Przetrwalniki *B. subtilis* odporne są na działanie wielu niekorzystnych warunków fizycznych i chemicznych, dzięki czemu mogą przetrwać w środowisku wiele lat bez utraty zdolności do kiełkowania. Kiełkowanie spor jest inicjowane po pojawieniu się w ich otoczeniu specyficznych induktorów. Sygnał z zewnątrz odbierany jest m.in. przez receptory kiełkowania (GerA, GerB i GerK). Podczas gdy receptor GerA zapoczątkowuje proces powrotu spor do ich formy wegetatywnej w obecności L-alaniny lub L-waliny, receptory GerB i GerK razem niezbędne są do inicjacji kiełkowania w obecności mieszaniny AGFK.

W niniejszej pracy skupiono się na analizie funkcjonowania receptora GerA *B. subtilis*. Mimo tego, że funkcja tego receptora jest konserwowana wśród różnych szczepów laboratoryjnych, jak i środowiskowych tego gatunku, w kolekcji szczepów Zakładu Bakteriologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed znalazły się dwa warianty *B. subtilis* 168, o różnym pochodzeniu, których przetrwalniki charakteryzowały się odmiennym fenotypem kiełkowania w obecności L-alaniny. Podczas gdy przetrwalniki 168G były zdolne do kiełkowania w roztworze tego induktora, receptor GerA spor 168F w tych samych warunkach nie inicjował wspomnianego procesu.

Porównawcza analiza genomów wybranych szczepów laboratoryjnych *B. subtilis* (168G, 168F, PY79 i PS832) wskazała na obecność dwóch polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) w genie *gerAA* kodującym podjednostkę A receptora GerA. Wspomniane SNPs odpowiadają za obecność trzech alleli genu *gerAA* w analizowanych szczepach. Kodują one następujące warianty białka GerAA, różniące się między sobą w pozycji 299 i 302 ich łańcuchów aminokwasowych: 299Thr/302Ser (168G), 299Ala/302Pro (168F) i 299Ala/302Ser GerAA (PY79, PS832).

Analiza kiełkowania spor różnych szczepów *B. subtilis*, skonstruowanych w trakcie realizacji niniejszej pracy, wskazała, że różne warianty białka GerAA odpowiedzialne są za różnice w fenotypie kiełkowania spor 168G i 168F w obecności L-alaniny. Za wspomniane różnice odpowiada zmiana reszty Ser na Pro w pozycji 302 białka GerAA. Zmiana reszty aminokwasowej w pozycji 299 wpływa z kolei na tempo kiełkowania spor i w pewnym stopniu – na wydajność tego procesu.

Głównym celem niniejszej pracy było znalezienie przyczyny różnic w funkcjonalności poszczególnych wariantów białka GerAA. Analiza kiełkowania spor szczepów powstałych w efekcie różnorodnych manipulacji genetycznych, łącznie z analizą *in silico* struktury białka GerAA sugerują, że i) zmiana Ser302Pro może wpływać na strukturę drugorzędową białka GerAA; ii) funkcjonowanie receptora GerA nie jest regulowane poprzez fosforylację reszty 302 białka GerAA; iii) poszczególne warianty białka GerAA charakteryzują się odmiennym powinowactwem do pozostałych podjednostek receptora GerA.

Analiza *in silico* białka GerAA wskazała również resztę 347Arg jako potencjalnego kandydata, do którego wiązać się może cząsteczka L-alaniny na początku procesu kiełkowania. Ze względu na silnie zasadowy charakter reszty we wskazanej pozycji, przeprowadzono analizę kiełkowania spor z różnymi wariantami GerAA z resztą 347 o stopniowo malejącej zasadowości. Uzyskane wyniki sugerują, że zasadowy charakter reszty 347 pełni istotną rolę w funkcjonowaniu receptora GerA.