

Charakterystyka hipotetycznego operonu *saoABC* potencjalnie kodującego nieznaną system regulacji transkrypcji genów u *Staphylococcus aureus*

Mechanizmy regulacji ekspresji genów w komórkach bakteryjnych, warunkując adaptacyjną odpowiedź na ciągle zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego, odgrywają istotną rolę nie tylko w regulacji podstawowego metabolizmu ale także w procesie patogenezy. Dotychczas systemy takie jak *agr* (ang. *accessory gene regulator*), *sar* (ang. *staphylococcal gene regulator*) czy *sigB* (alternatywna podjednostka sigma polimerazy RNA) zostały opisane dla gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) i powiązane z regulacją ekspresji czynników wirulencji.

W trakcie badań nad gronkowcowym systemem toksyna-antytoksyna *pemIK_{sa}*, w którym toksyna PemK_{sa} posiada aktywność endorybonukleazową, na liście genów wytypowanych jako te, których transkrypty są statystycznie niedoreprezentowane w sekwencji rozpoznawane przez tę endorybonukleazę znalazł się gen hipotetycznego białka. Analizy bioinformatyczne pozwoliły znaleźć w obrębie jego sekwencji dwa potencjalne miejsca wiążące DNA, co sugerowało, że może on być dotychczas nieopisanym czynnikiem transkrypcyjnym. Dalsze analizy i eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji wskazały, że gen ten (nazwany *saoC*) przynależy do jednego operonu wraz z dwoma innymi genami (operonu nazwanego *saoABC*). Ponadto jest to operon, którego homologi występują w sekwencjach wszystkich znanych genomów przedstawicieli rodzaju *Staphylococcus* i tylko w obrębie tego rodzaju.

Dokonując ekspresji i częściowego oczyszczenia białka SaoC pod kontrolą promotora T7 w szczepie *Escherichia coli* BL21(DE3) wykazano jego zdolność wiązania DNA. Przejawiało się to nie tylko dużą ilością DNA oczyszczaną wraz z białkiem ale ochroną przed aktywnością DNazy I przez białko SaoC krótkiego odcinka DNA (około 20 par zasad), której nie obserwowano dla termicznie zdenaturowanego preparatu białka. Warto tutaj wspomnieć, że dwa hipotetyczne miejsca wiązania DNA w obrębie białka odpowiadają charakterystyce alternatywnych podjednostek sigma polimerazy RNA, które wiążą się do tak zwanych kaset -10 i -35 promotora.

Wiele znanych systemów kontroli ekspresji genów, w tym alternatywne podjednostki sigma czy systemy dwukomponentowe, są strukturalnie związane z błoną komórkową. W momencie aktywacji

takiego systemu czynnik wiążący DNA zostaje uwalniany z przybliżonego kompleksu. Z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej wykazano peryferyjną lokalizację białka fuzyjnego SaoC-GFP w komórkach gronkowca złocistego, co stanowi kolejną przesłankę o regulatorowym charakterze systemu kodowanego przez operon *saoABC*.

Badania ekspresji genów operonu *saoABC* ujawniły bardzo złożoną zależność transkrypcji poszczególnych jego komponent w różnych warunkach stresowych. Zaobserwowano silny wzrost ekspresji genu *saoA* w warunkach zakwaszenia (pH 5,0) a także braku preferencyjnego źródła węgla lub braku źródła aminokwasów. W tym ostatnim przypadku znacznemu wzrostowi ekspresji podlega również gen *saoB*. Natomiast nie zaobserwowano powtarzalnej indukcji ekspresji dla któregośkolwiek z genów operonu *saoABC* w warunkach stresu osmotycznego, solnego, działania antybiotyku czy stresu cieplnego. Otrzymany wynik staje się interesujący w świetle faktu występowania warunków braku źródeł składników odżywczych jak i niskiego pH w endosomach komórek eukariotycznych a wiele szczepów gronkowca złocistego posiada zdolność internalizacji do komórek gospodarza z wykorzystaniem białek wiążących fibronektynę.

W toku badań nad charakterystyką funkcjonalną hipotetycznego operonu *saoABC* udało się również otrzymać dwa szczepy typu *knockout* dla genów *saoA* i *saoC*. Badanie wirulencji szczepów gronkowca złocistego w modelu zarodków kurzych nie dało niestety jednoznacznej odpowiedzi czy istnieje różnica w wirulencji otrzymanych szczepów *S. aureus* RN4220 Δ *saoA* i RN4220 Δ *saoC*. Warto tutaj zwrócić uwagę, że w standardowej hodowli w pożywkach płynnych nie obserwowano statystycznie istotnych różnic we wzroście szczepów typu *knockout* w porównaniu ze szczepem wyjściowym *S. aureus* RN4220.

Wyżej przytoczone wyniki stanowią podstawową ale spójną charakterystykę hipotetycznego operonu *saoABC*. Niewątpliwie jest on funkcjonalnie związany z odpowiedzią na warunki stresowe, które powszechnie oddziałują na komórki gronkowca złocistego w trakcie interakcji komórek bakteryjnych z komórkami gospodarza. Zdolność wiązania DNA przez białko SaoC ukazuje możliwość modulacji ekspresji innych genów poprzez bezpośrednie oddziaływanie z ich nośnikiem a jego lokalizacja komórkowa jak i posiadanie dwóch potencjalnych miejsc wiązania DNA pozostaje w zgodzie z charakterystykami dotychczas opisanych bakteryjnych czynników transkrypcyjnych. Z kolei brak różnic we wzroście szczepów *S. aureus* RN4220, RN4220 Δ *saoA* i RN4220 Δ *saoC* w optymalnych warunkach laboratoryjnych oraz możliwe różnice w wirulencji tych szczepów sugerują, że operon *saoABC* nie zawiaduje zachowaniem się komórki bakteryjnej w kontekście metabolizmu podstawowego a jego aktywność jest bardziej specyficznie związana z warunkami stresowymi.