

**„Powiązania między replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi *Escherichia coli*  
oraz ich rola w koordynacji bakteryjnego cyklu komórkowego”  
mgr Joanna Morcinek-Orłowska**

Cykl komórkowy bakterii to uporządkowany ciąg zdarzeń prowadzący do powstania dwóch komórek potomnych. Obejmuje on wzrost, replikację DNA oraz podział komórki. Replikacja DNA ma kluczowe znaczenie w cyklu komórkowym, gdyż zapewnia wierność i integralność materiału genetycznego przekazywanego komórkom potomnym. Proces ten zachodzi dzięki skoordynowanej aktywności wyspecjalizowanej maszynerii białkowej zwanej replisomem.

Podczas inicjacji replikacji białko inicjatorowe DnaA doprowadza do rozplecenia dupleksu DNA w rejonie *oriC*, co umożliwia przyłączenie helikazy, prymazy oraz wielopodjednostkowej polimerazy DNA III. Precyzyjna regulacja aktywności DnaA w cyklu komórkowym zachodzi przy udziale białek regulatorowych – pozytywnego regulatora DiaA promującego inicjację oraz negatywnych białek regulatorowych Hda i SeqA, które zapobiegają przedwczesnej reinicjacji. W etapie elongacji katalityczna podjednostka polimerazy III wydłuża nić DNA w kierunku 5'-3', używając substratów (deoksyrybonukleotydów) dostarczanych przez reduktazę nukleotydów. Procesywność polimerazy zapewnia podjednostka  $\beta$ , tak zwana klamra, przyłączana do DNA dzięki aktywności podjednostek tworzących kompleks ładujący klamrę. Replikacja chromosomu postępuje w obydwu kierunkach aż do osiągnięcia miejsca *ter*, gdzie następuje jej terminacja.

Kluczowe procesy w cyklu komórkowym bakterii – replikacja DNA i podział komórki – muszą być nie tylko ściśle kontrolowane, ale i skoordynowane ze wzrostem, którego tempo w różnorodnym środowisku naturalnym mikroorganizmów może ulegać bardzo szybkim zmianom. Mechanizm tej koordynacji nadal nie jest w pełni poznany. Coraz więcej przesłanek sugeruje jednak, że zależna od wzrostu regulacja replikacji jest sprzęgana z różnorodnymi procesami metabolicznymi.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest scharakteryzowanie powiązań pomiędzy replikacją DNA a innymi procesami komórkowymi w modelowej Gram-ujemnej bakterii *Escherichia coli*. Główna postawiona hipoteza badawcza zakłada, że białka zaangażowane w przebieg i regulację replikacji mogą bezpośrednio oddziaływać z białkami metabolicznymi

i/lub drobnocząsteczkowymi metabolitami. Te interakcje, występujące w komórce w danym momencie cyklu komórkowego i w określonych warunkach wzrostu, mogą regulować aktywność białek replikacyjnych i stanowić mechanizm koordynujący replikację DNA ze wzrostem komórki bakteryjnej.

Badania obejmowały osiem kluczowych białek zaangażowanych w przebieg oraz regulację replikacji DNA *E. coli* – DnaA (białko inicjatorowe), DiaA, Hda, SeqA (białka regulatorowe inicjacji), DnaB (helikazę), DnaG (prymazę), HolD (podjednostkę  $\psi$  polimerazy DNA III, część kompleksu ładującego klamrę) oraz NrdB (podjednostkę  $\beta$  reduktazy nukleotydów). Przeprowadziłam analizę sieci interakcji, które tworzą wspomniane białka w warunkach szybkiego oraz wolnego wzrostu komórek. Izolacja kompleksów białkowych powstających bezpośrednio w komórce bakteryjnej jest możliwa dzięki dołączeniu do sekwencji kodującej sekwencji znacznika SPA. Umożliwia on oczyszczanie białka oraz oddziałujących z nim molekuł z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, a następnie identyfikację składu kompleksów metodą spektrometrii mas poprzedzonej chromatografią cieczową. W eksperymencie uwzględniłam próby kontrolne oraz zaproponowałam dwie strategie analizy specyficzności uzyskanych interakcji – jakościową i ilościową.

Profile interakcji białek replikacyjnych wykazują dużą zależność wobec warunków wzrostu komórek. Ponadto każde z nich tworzy odrębne sieci interakcji, a pula białek oddziałujących z więcej niż jednym białkiem-przynętą jest stosunkowo niewielka. Białka oddziałujące z aparatem replikacyjnym reprezentują różne procesy funkcjonalne, spośród których można wyróżnić biogenezę rybosomu, obróbkę i degradację RNA oraz metabolizm nukleotydów. Szczególnie istotna jest identyfikacja białek zaangażowanych w syntezę powłok komórkowych – fosfolipidów błonowych, peptydoglikanu oraz lipopolisacharydu (LPS). Różni przedstawiciele tej grupy funkcjonalnej pojawiają się konsekwentnie w interaktomach prawie wszystkich analizowanych białek.

Spośród zidentyfikowanych partnerów interakcyjnych wybrałam kilka białek do dalszych analiz, po czym określiłam wpływ delecji ich genów na zawartość DNA w komórkach metodą cytometrii przepływowej po zatrzymaniu replikacji. Wykazałam, że pozbawienie komórki białka RfaD, zaangażowanego w jeden z etapów syntezy rdzenia LPS,

przyczynia się do asynchronicznej inicjacji replikacji w komórce oraz zaburzeń czasu inicjacji replikacji w cyklu komórkowym, widocznych zwłaszcza w warunkach wolnego wzrostu komórek. Delecja genu *rlmE*, kodującego metylotransferazę rRNA, opóźnia inicjację replikacji w cyklu komórkowym i zaburza jej synchroniczność, jednak efekt ten manifestuje się w warunkach szybkiego wzrostu komórek. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że mechanizmy kontroli replikacji, w które zaangażowane są białka oddziałujące z aparatem replikacyjnym, są istotnie zależne od warunków wzrostu.

W ramach współpracy naukowej uczestniczyłam również w badaniach nad funkcją lipoprotein wspomagających kompleksu Bam, odpowiedzialnego za fałdowanie białek zewnętrznej błony komórkowej. Ze względu na obserwowane interakcje genetyczne genu *bamB* z podjednostkami polimerazy DNA III oraz regulatorami replikacji, określiłam wpływ jego delecji na regulację replikacji w cyklu komórkowym metodą cytometrii przepływowej po zatrzymaniu replikacji. Wykazałam, że delecja genu *bamB* w komórce może prowadzić do wcześniejszej i częściowo asynchronicznej replikacji w cyklu komórkowym. Wyniki te stanowią dodatkowe potwierdzenie funkcjonalnych zależności między homeostazą powłok komórkowych a regulacją replikacji u *E. coli*.

W strukturze białka DiaA – pozytywnego regulatora inicjacji replikacji – wyróżnić można domenę wiążącą fosfocukry, typową dla izomeraz cukrowych, co skłoniło nas do zadania pytania nie tylko o jej możliwą rolę, ale też o potencjalne interakcje białek replikacyjnych z metabolitami. Pokazaliśmy, że DiaA może oddziaływać z sedoheptulozo-7-fosforanem (S7P) *in vitro*, a interakcja ta hamuje pozytywny efekt DiaA na wiązanie białka inicjatorowego w rejonie *oriC*. Ponadto zaobserwowałam, że obniżenie poziomu S7P *in vivo* powoduje deregulację czasu inicjacji replikacji w cyklu komórkowym. S7P jest zaangażowany w syntezę bakteryjnego LPS, jak również w cykl pentozofosforanowy uczestniczący w produkcji nukleotydów. Odkryte powiązania wskazują na istnienie zależności między syntezą zewnętrznych powłok komórki, syntezą nukleotydów i inicjacją replikacji, które mogłyby odpowiadać za koordynację cyklu komórkowego w sposób zależny od stężenia metabolitów i aktywności enzymów metabolicznych.

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy są punktem wyjścia do dalszych badań prowadzących do ustalenia funkcjonalnego znaczenia odkrytych oddziaływań, a w konsekwencji do lepszego zrozumienia mechanizmów sprzęgających replikację i inne

procesy w komórce. Koordynacja cyklu komórkowego bakterii ma kluczowe znaczenie dla przeżycia mikroorganizmów w zmiennym środowisku, a także dla wirulencji bakterii patogennych. Co za tym idzie, odkryte mechanizmy mogą stanowić cele molekularne dla nowych leków przeciwbakteryjnych, a z drugiej strony pozwolą na wspieranie wzrostu bakterii tam, gdzie jest to pożądane, na przykład w bioreaktorach.