

Analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* w trakcie głodu aminokwasowego

mgr Ewelina Boguszevska

Bakterie potrafią szybko adaptować się do zmiennych warunków środowiska dzięki precyzyjnej regulacji procesów komórkowych, w tym replikacji DNA. Molekularne podstawy inicjacji replikacji chromosomalnego DNA są dobrze poznane, jednak znacznie mniej wiadomo o tym, jak proces ten zostaje zahamowany podczas stresu. Jeszcze mniej informacji dotyczy regulacji replikacji plazmidów podczas stresu, które odgrywają kluczową rolę w rozprzestrzenianiu genów oporności na antybiotyki. Celem niniejszej pracy była analiza białek inicjatorowych DnaA i TrfA w komórkach *Escherichia coli* podczas stresu. Białko DnaA, odpowiada za rozpoczęcie replikacji chromosomu, natomiast TrfA, pełni rolę inicjatora replikacji plazmidu RK2. W warunkach optymalnych DnaA wiąże się z miejscem inicjacji replikacji chromosomu (*oriC*), co prowadzi do rozpoczęcia procesu replikacji DNA. Wykazałam, że podczas głodu aminokwasowego cząsteczki DnaA nie wiążą się do *oriC*, a zjawisko to koreluje ze wzrostem poziomu ich acetylacji. Ponadto w trakcie stresu wewnątrzkomórkowy poziom białka DnaA ulega stopniowemu obniżeniu, choć nigdy nie spada poniżej poziomu detekcji. Analiza ChIP-seq ujawniła, że cząsteczki DnaA obecne w komórce podczas stresu wykazują zmieniony profil interakcji z DNA. Podczas głodu aminokwasowego cząsteczki DnaA nie oddziałują z regionami DNA zajmowanymi w warunkach optymalnych, lecz wiążą się z innymi obszarami genomu. Zmianie ulega także wewnątrzkomórkowa lokalizacja DnaA, ponieważ w warunkach stresu białko nie tworzy wyraźnych skupisk charakterystycznych dla komórek rosnących w warunkach optymalnych. Uzyskane wyniki pokazują, że poziom, lokalizacja, profil oddziaływania z DNA oraz acetylacja DnaA ulegają zmianom podczas stresu, co w efekcie zapobiega inicjacji replikacji chromosomalnego DNA. W komórkach *E. coli*, białko DnaA współdziała z plazmidowym białkiem TrfA podczas inicjacji replikacji plazmidu RK2. Wykazałam, że podczas głodu aminokwasowego inicjacja replikacji plazmidu RK2 jest zahamowana w wyniku braku oddziaływania DnaA i TrfA z plazmidowym *origin* replikacji (*oriV*). Obniżenie poziomu wiązania inicjatorów do *oriV* jest powiązane ze spadkiem poziomu zarówno monomeru i dimeru TrfA, jak i DnaA. Co ciekawe, plazmid nie ulega replikacji również w komórkach kodujących hiperaktywny, monomeryczny wariant TrfA, co sugeruje, że zahamowanie replikacji DNA podczas stresu obejmuje mechanizmy inne niż tworzenie kompleksów typu handcuff.

Uzyskane wyniki wskazują, że pełne zahamowanie inicjacji replikacji DNA w warunkach stresu jest konsekwencją równoległego działania kilku mechanizmów. Zmiany zachodzące podczas stresu są odwracalne, co pozwala na wznowienie replikacji chromosomalnego oraz plazmidowego DNA po ustąpieniu stresu. Praca ta poszerza wiedzę na temat regulacji replikacji DNA podczas stresu i rzuca nowe światło na mechanizmy warunkujące przetrwanie bakterii w niekorzystnych warunkach, co może stanowić podstawę do opracowania nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych oraz strategii wspierających antybiotykoterapię i ograniczających występowanie oporności na antybiotyki warunkowanej przez plazmidy.