

Rola topoizomerazy I w organizacji chromosomów *Streptomyces coelicolor* oraz wpływ domeny C-końcowej na aktywność enzymu

Streszczenie

Utrzymanie właściwego stopnia superskręcenia chromosomu bakteryjnego zależy głównie od działania enzymów z grupy topoizomeraz. Za usuwanie negatywnych superskrętów odpowiedzialne są topoizomerazy typu I. Składają się one z dwóch domen: konserwatywnej domeny N-końcowej odpowiedzialnej za przeprowadzenie reakcji relaksacji DNA i zmiennej gatunkowo domeny C-końcowej, która w topoizomerazach typu I wielu bakterii zawiera motywy palców cynkowych, zaangażowane w wiązanie białka do DNA. Bakterie należące do promieniowców (np. *Streptomyces*, *Mycobacterium*) posiadają często tylko jedną topoizomerazę typu I (TopA), różniącą się od pozostałych bakteryjnych homologów sekwencją aminokwasową w obrębie domeny C-końcowej. Nie zawiera ona palców cynkowych, ale obejmuje powtarzalne sekwencje o wysokiej zawartości lizyn, które przypuszczalnie są istotne dla funkcji białka i mogą uczestniczyć w wiązaniu DNA. TopA *S. coelicolor* charakteryzują się wyjątkowo wysoką procesywnością działania, co prawdopodobnie jest związane ze strukturą domeny C-końcowej.

Streptomyces to bakterie glebowe, istotne przemysłowo jako producenci licznych metabolitów wtórnych, w tym wielu antybiotyków. Cykl życiowy *Streptomyces* jest powiązany ze zmianami topologii chromosomu i obejmuje tworzenie wielogenomowej grzybni wegetatywnej oraz sporulację, w czasie której dochodzi do jednoczesnej kondensacji i segregacji kilkudziesięciu chromosomów do zarodników. Delecja genu kodującego TopA *S. coelicolor* jest letalna, natomiast obniżenie poziomu jego ekspresji opóźnia wzrost i hamuje sporulację.

W ramach projektu doktorskiego zbadano wpływ obniżenia poziomu TopA na dynamikę chromosomów *S. coelicolor* podczas kiełkowania i wzrostu wegetatywnego. Wykazano, że deplecja TopA zaburza rozdzielanie chromosomów po replikacji, co skutkuje ich nieprawidłowym rozmieszczeniem w strzępce oraz znacznym oddaleniem apikalnego chromosomu od wierzchołka strzępki. Zaobserwowano także, że deplecja TopA hamuje kiełkowanie spor i powoduje zaburzenia wzrostu nowych odgałęzień grzybni, co może być związane ze zmienioną dystrybucją chromosomów.

Drugim celem wykonanych badań było wyjaśnienie roli C-końcowej domeny TopA *S. coelicolor*. Wykazano, że charakterystyczną cechą promieniowców jest występowanie w obrębie domeny C-końcowej topoizomerazy sekwencji o zmiennej długości złożonych z powtarzalnych motywów lizynowych. Przeprowadzone badania *in vitro* udowodniły, że są one odpowiedzialne za niespecyficzne wiązanie DNA i gwarantują TopA *S. coelicolor* wysoką procesywność działania. Ponadto wykazano, że chociaż C-końcowa domena TopA *E. coli* jest odpowiedzialna za wiązanie ssDNA, nie jest ona w stanie zastąpić funkcji C-końcowej domeny topoizomerazy I *S. coelicolor*. Analiza fenotypowa szczepów produkujących zmodyfikowane białka TopA pokazała, że procesywna relaksacja ujemnych superskrętów przez TopA jest najbardziej istotna na etapie sporulacji, kiedy dochodzi do replikacji i segregacji kilkudziesięciu chromosomów.

Uzyskane wyniki pokazują, że obniżenie poziomu białka TopA i tym samym zwiększenie negatywnego superskręcenia DNA prowadzi do zaburzeń rozdziału chromosomów po replikacji, co wpływa na dystrybucję chromosomów w strzępkach wegetatywnych. Natomiast powtarzalne motywy lizynowe, znajdujące się w domenie C-końcowej TopA zapewniają białku wysoką procesywność działania, która jest konieczna do zajęcia sporulacji.