

„Fosforylacja inicjatorowego białka DnaA u *Streptomyces coelicolor* - molekularny mechanizm i biologiczna funkcja” - streszczenie

Streptomyces są Gram-dodatnimi bakteriami tlenowymi, które należą do rzędu promieniowców. Bakterie te stanowią interesujący obiekt badań podstawowych ze względu na ich złożony cykl życiowy, który przypomina cykl rozwojowy eukariotycznych grzybów nitkowatych. *Streptomyces* wyróżnia wśród innych mikroorganizmów kilka unikalnych cech. Bakterie te rosną w postaci grzybni, natomiast synteza peptydoglikanu zachodzi na wierzchołkach rosnących strzępek. Grzybnia *Streptomyces* zbudowana jest z wydłużonych komórek (kompartamentów). W obrębie jednego kompartamentu znajdować się może nawet do kilkudziesięciu kopii chromosomów. Chromosom *Streptomyces* jest liniową, bogatą w pary GC cząsteczką DNA. W fazie wzrostu grzybni wegetatywnej replikacja materiału genetycznego zachodzi w sposób asynchroniczny - nie wszystkie chromosomy w danym kompartamencie replikowane są jednocześnie.

We wszystkich trzech domenach życia replikacja chromosomu regulowana jest głównie na etapie inicjacji tego procesu. Wiedza dotycząca mechanizmów regulacyjnych procesu inicjacji replikacji u bakterii pochodzi głównie z badań prowadzonych nad *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, czy *Caulobacter crescentus*; niewiele wiadomo o regulacji tego procesu u *Streptomyces*. Analiza globalnego fosfoproteomu *Streptomyces coelicolor* A(3)2 wskazała na możliwość występowania u tych bakterii zjawiska fosforylacji białka DnaA, które jest bakteryjnym inicjatorem procesu replikacji chromosomu. Dotychczas fosforylację białek biorących udział w inicjowaniu replikacji wykazano jedynie u eukariontów. W przedstawianej pracy podjęto próbę wyjaśnienia roli jaką pełni fosforylacja białka inicjatorowego DnaA u *S. coelicolor*.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły potwierdzić doniesienie literaturowe dotyczące występowania zjawiska fosforylacji białka DnaA u *S. coelicolor*. Wykazano również, że badane białko jest modyfikowane potranslacyjnie w fazach wzrostu *S. coelicolor*, w których dochodzi do powielenia materiału genetycznego.

Analiza wyników modelowania molekularnego sugeruje, że pod wpływem fosforylacji dochodzi w białku DnaA do zmian konformacyjnych, które z kolei mogą wpływać na aktywność badanego białka. Przypuszczenia te potwierdzono eksperymentami *in vitro*, w których pokazano, że obecność ujemnego ładunku w pozycji fosforylowanego aminokwasu zwiększa aktywność ATP-azową oraz obniża powinowactwo badanego białka do chromosomalnego regionu inicjacji replikacji. Obydwie obserwowane zmiany prowadzić mogą do utworzenia puli białka, które jest nieaktywne w procesie inicjacji replikacji.

W dalszych badaniach wykazano, że za fosforylację białka DnaA u *S. coelicolor* odpowiedzialna jest kinaza AfsK. Jak pokazały wcześniejsze badania, białko to charakteryzuje się swoistą lokalizacją subkomórkową (identyfikowano je głównie na wierzchołkach strzępek *S. coelicolor*) i bierze udział w rozmontowaniu białkowych kompleksów odpowiedzialnych za wierzchołkowy wzrost bakterii. Proces ten zachodzi w odpowiedzi na obecne w podłożu inhibitory syntezy ściany komórkowej. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doświadczenia pokazały, że pod wpływem nadprodukcji kinazy AfsK dochodzi również do oddalenia maszyneryi replikacyjnej od wierzchołków grzybni.

Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy wskazują prawdopodobną, biologiczną rolę fosforylacji białka DnaA u *S. coelicolor*. Katalizowana przez AfsK modyfikacja białka inicjatorowego ma za zadanie nie dopuścić do inicjacji replikacji chromosomu. Modyfikacja ta ma charakter lokalny; dotyczy apikalnych kompartmentów grzybni *S. coelicolor*, których wzrost został zatrzymany.