

# Mechanizm inicjacji replikacji chromosomu *Streptomyces*

## Streszczenie

Replikacja chromosomalnego DNA jest kluczowym procesem w cyklu życiowym każdej komórki, który zachodzi zwykle jeden raz w trakcie cyklu komórkowego i podlega ścisłej regulacji, głównie na etapie jego inicjacji. U bakterii etap ten obejmuje rozplecenie DNA w pojedynczym miejscu regionu *oriC* (origin of chromosomal replication) przy udziale białka inicjatorowego DnaA, które swoiście wiąże się z sekwencjami nazywanymi bokсами DnaA. Mechanizmy regulujące inicjację replikację chromosomu bakteryjnego zostały dobrze opisane dla gatunków modelowych (*E. coli*, *B. subtilis*).

Mechanizmy regulacji inicjacji replikacji są słabo poznane u *Streptomyces* - bakterii wyjątkowych ze względu na to, że w pojedynczej komórce złożonej morfologicznie grzybni może występować nawet do kilkudziesięciu chromosomów, które podlegają asynchronicznej replikacji.

W niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że *oriC* *Streptomyces* zawiera 14 boksov wiążących białko inicjatorowe DnaA, o sekwencji konsensusowej 5'-TT[G/C]TCCACA-3', która różni się od tej znanej dla białka DnaA z *E.coli*. Przeprowadzona analiza *in silico* regionów *oriC* kilku gatunków *Streptomyces* wykryła dwa konserwatywnie zlokalizowane potencjalne miejsca rozplatania regionu *oriC* w czasie inicjacji replikacji, oznaczone jako DUE1 i DUE2. Z wykorzystaniem metody mapowania RIP *in vivo* dla *S. venezuelae* potwierdzono, że miejscem inicjacji replikacji jest DUE2.

Poprzednie badania wykazały, że plejotropowy regulator transkrypcji AdpA, ma hamujący wpływ na inicjację replikacji chromosomu u *S. coelicolor*. Ze względu na niepoznaną dotychczas rolę AdpA u nowego gatunku modelowego z rodzaju *Streptomyces*, *S. venezuelae*, zastosowano metodę ChIP-qPCR w celu zidentyfikowania miejsc wiązania AdpA na chromosomie *S. venezuelae*. Nie stwierdzono oddziaływania AdpA z regionem *oriC*, a więc rola AdpA jako regulatora replikacji nie jest uniwersalna wśród wszystkich *Streptomyces*; wykazano natomiast, wiązanie AdpA do promotora własnego genu, czego wynikiem jest dodatnia autoregulacja transkrypcji. Ponadto mutant delecyjny  $\Delta adpA$  wykazuje fenotyp „*bald*”, nie wykształcający grzybni powietrznej oraz wytwarzający spory w ograniczonych ilościach, jednocześnie zachowując tempo wzrostu typu dzikiego. Najwyższe poziomy transkryptu i białka AdpA zaobserwowano we wczesnej fazie wzrostu, przed wytworzeniem grzybni powietrznej. Wyniki te wskazują na udział AdpA w różnicowaniu morfologicznym *S. venezuelae*.

Ze względu na znaną rolę AdpA w produkcji metabolitów wtórnych u innych *Streptomyces* oraz występowanie boksów AdpA w obrębie klastra genów odpowiedzialnych za biosyntezę chloramfenikolu, zbadano antybiotyczne właściwości ekstraktu pochodzącego mutantu  $\Delta adpA$  *S. venezuelae* i potwierdzono, że mutant delecyjny nie produkuje chloramfenikolu.