

Patrycja Skut

Wpływ poziomu topoizomerazy I na cykl komórkowy *Mycobacterium smegmatis*.

Chromosom bakteryjny stanowi wysoce zorganizowaną strukturę podlegającą precyzyjnej kontroli na różnych etapach cyklu komórkowego. Negatywne superskręcenie umożliwia upakowanie chromosomalnego DNA i jednocześnie jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu podstawowych procesów komórkowych, przede wszystkim replikacji DNA i transkrypcji. Z tego względu zmiany gęstości superhelikalnej DNA prowadzą do zaburzeń funkcjonowania komórki. W kontrolę topologii DNA zaangażowane są białka o funkcji enzymatycznej - topoizomerazy. Topoizomeraza I (TopA) należąca do enzymów typu I, wprowadza zmiany poprzez przejściowe cięcia zwykle tylko jednej nici DNA i odpowiada za usuwanie negatywnych superskrętów. Topoizomerazy jako enzymy niezbędne dla wydajnego zachodzenia replikacji i transkrypcji stanowią potencjalny cel dla antybiotyków.

Prątki gruźlicy należą do patogenów, z którymi walka jest szczególnie trudna, ze względu na ich zdolność do unikania systemu obronnego gospodarza i przetrwania w stanie uśpionym przez długi czas oraz grubą i nieprzepuszczalną ścianę komórkową. Białko TopA *Mycobacterium* wyróżnia wysoką procesywnością i obecnością długiej, domeny C-końcowej o strukturze odmiennej od swoich homologów pochodzących z innych bakterii. Pomimo, że coraz więcej doniesień literaturowych poświęconych jest aktywności TopA u *Mykobakterii*, wewnątrzkomórkowej organizacji chromosomu prątków, a także przestrzennej dynamice replikacji i segregacji DNA, nadal niewiele wiadomo na temat biologicznych konsekwencji zahamowania aktywności TopA oraz zaburzeń topologii DNA u tych bakterii.

Stosunkowo szybko rosnące *M. smegmatis* wydają się być użytecznym organizmem modelowym w badaniu niektórych aspektów biologii prątków, także podczas poszukiwania nowych celów dla antybiotyków przeciwgruźliczych. W ramach projektu doktorskiego zbadano jak zmiany poziomu TopA wpływają na wzrost oraz dynamikę chromosomów u *M. smegmatis*. Wykazano, że u *M. smegmatis* delecja *topA* jest niemożliwa, a znaczne obniżenie poziomu TopA prowadzi do spowolnienia wzrostu, podczas gdy przy częściowym obniżeniu poziomu białka nie zaobserwowano wyraźnych zaburzeń namnażania bakterii. Nadprodukcja topoizomerazy I, z kolei nie powodowała zmian w tempie wzrostu bakterii. Ponadto, dzięki wykorzystaniu techniki filmów poklatkowych zaobserwowano, że obniżenie poziomu białka TopA prowadzi do zaburzeń cyklu komórkowego, przede wszystkim procesu replikacji DNA. W szczepie *M. smegmatis* z deplecją TopA zwiększyła się częstość reinicjacji

replikacji, co prowadziło do nieprawidłowego przebiegu podziałów komórkowych. Dodatkowo wykazano, że domena C-końcowa TopA jest konieczna dla funkcji TopA *in vivo*. Nadprodukcja domeny C-końcowej podobnie jak obniżenie poziomu TopA, choć w mniejszym stopniu, powodowała zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego. Biologiczne konsekwencje nadprodukcji domeny C-końcowej białka TopA mogą wynikać z jej zaangażowania w oddziaływania międzycząsteczkowe. Przeprowadzone w ramach pracy badania zasugerowały, że pomimo, że topoizomeraza I może stanowić dogodny cel dla antybiotyków, jedynie całkowite zahamowanie jej aktywności powoduje zatrzymanie proliferacji *M. smegmatis*, co sugeruje udział innych topoizomeraz w utrzymaniu homeostazy topologicznej. Ponadto wskazano na istotną rolę domeny C-końcowej enzymu dla prawidłowego funkcjonowania białka w komórce, co sugeruje, że ten fragment białka może być celem molekularnym swoistych antybiotyków przeciwpłątkowych.