

Narzędzie genetyczne do identyfikacji regulatorów topologicznie wrażliwego promotora genu kodującego topoizomerazę I u *Streptomyces coelicolor*.

Chromosom bakterii najczęściej stanowi pojedyncza cząsteczka DNA. Jej długość jest stosunkowo duża: w przypadku pałeczki okrężnicy wynosi ponad jeden centymetr, a musi się ona zmieścić w małej objętości komórki o wielkości nie przekraczającej dwóch mikrometrów (czyli około tysiąc razy mniejszej). Długa, dwuniciowa cząsteczka DNA jest dlatego dodatkowo zwijana i kompaktowana. Ważną rolę w jej upakowaniu spełnia superskręcenie, czyli dodatkowe okręcanie podwójnej helisy DNA. Bakterie posiadają enzymy, zwane topoizomerazami, których zadaniem jest kontrola upakowania DNA w komórce. Wśród topoizomeraz są takie, których zadaniem jest relaksacja DNA (zmniejszanie upakowania) oraz te, które działając odwrotnie kondensują DNA. Superskręcenie chromosomu ulega zmianie w odpowiedzi na zmiany różnych czynników środowiskowych, jak na przykład temperatury, pH, dostępu składników odżywczych. Jednocześnie superskręcenie DNA reguluje ekspresję genów.

Naszym obiektem badawczym są bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Produkują szeroką gamę substancji wykorzystywanych przez człowieka, w tym bardzo wiele używanych obecnie antybiotyków. Produkcja wielu z tych substancji jest regulowana przez topologię chromosomu. Dlatego tak ważne jest poznanie jak zmiany superskręcenia DNA regulacją ekspresji genów.

Proponowany projekt dotyczy TopA- topoizomerazy ze *Streptomyces coelicolor*, modelowego gatunku do badań nad rodzajem *Streptomyces*. TopA jest enzymem odpowiadającym za relaksację DNA i przez to ma wpływ na poziom produkowanych przez komórkę białek. Celem proponowanych badań jest poznanie mechanizmów, które u *Streptomyces* regulują komórkowy poziom topoizomerazy TopA. Przypuszczamy, że istnieje szereg białek- regulatorów transkrypcyjnych, które kontrolują aktywność genu kodującego TopA. Za pomocą mutagenyzy transpozonowej utworzymy bibliotekę zmutowanych szczepów *Streptomyces* zawierających losowo inaktywowane geny. Dzięki wykorzystaniu genów reporterowych (których produkty mogą być wykrywane dzięki przeprowadzaniu reakcji, w której emitowane jest światło) będziemy mogli wykryć geny, których usunięcie zahamuje produkcję TopA. Pozwoli nam to znaleźć sekwencje kodujące białka zaangażowane w regulację poziomu TopA, a więc w sposób pośredni w kontrolę stopnia upakowania chromosomu i ekspresji innych genów.