

Nowe spojrzenie na strukturę i funkcje systemów segregacji DNA plazmidów i chromosomów drugorzędowych typu *repABC Alphaproteobacteria*

Informacja genetyczna zawarta w genomach bakterii jest często podzielona między różne replikony – cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej replikacji. Oprócz chromosomów, w skład genomów mogą wchodzić również chromidy i plazmidy. Plazmidy, w odróżnieniu od chromidów, nie determinują funkcji niezbędnych do przeprowadzenia podstawowych procesów życiowych bakterii, zatem ich usunięcie z komórki nie jest dla niej letalne. Replikony te często niosą jednak geny o charakterze adaptacyjnym, których obecność zapewnia bakteriom lepsze przystosowanie do warunków panujących w danej niszy ekologicznej, a niekiedy także przeżycie w środowisku zawierającym czynniki letalne dla innych bakterii, np. antybiotyki, ksenobiotyki i jony metali ciężkich.

Plazmidy i chromidy są bardzo stabilnie utrzymywane w komórkach bakterii. Za stabilność replikonów o małej liczbie kopii odpowiadają głównie systemy partycyjne (PAR), które zapewniają aktywną segregację kopii replikonu do komórek potomnych podczas podziału komórki bakteryjnej. W skład tych systemów wchodzi zazwyczaj dwa geny kodujące białka partycyjne oraz sekwencja centromeropodobna *parS*, która pełni funkcje analogiczne do eukariotycznych centromerów.

Systemy partycyjne dość często są położone w bliskim sąsiedztwie systemów replikacyjnych (REP). Ciekawym przykładem są replikony *repABC* powszechnie występujące w bakteriach z klasy *Alphaproteobacteria* [bakterie te stanowią bardzo zróżnicowaną pod względem metabolicznym grupę, do której są zaliczane są m.in. patogeny człowieka, zwierząt i roślin (np. *Brucella* spp., *Agrobacterium* spp.), symbionty roślin wiążące azot atmosferyczny (np. *Rhizobium* spp.), a także liczne bakterie saprofityczne dominujące w wielu środowiskach morskich (np. *Roseobacter*) i glebowych (np. *Paracoccus* spp.)]. W replikonach *repABC* geny zaangażowane w segregację DNA (*repA* i *repB*) oraz w replikację (*repC*) tworzą jeden operon, w którym znajduje się także sekwencja centromeropodobna *parS*. Proces segregacji replikonów inicjuje białko partycyjne RepB, które wiąże się z rozpoznawanymi przez nie sekwencjami *parS*, tworząc kompleks nukleoproteinowy, zwany kompleksem partycyjnym.

W trakcie badań wstępnych, w wielu replikonach zidentyfikowano dodatkowe sekwencje *parS*, które są usytuowane w znacznej odległości od operonów *repABC* – niekiedy w obrębie sekwencji kodujących genów – z ciekawym przykładem genów *cas* wchodzących w skład systemów obronnych bakterii CRISPR-Cas. Niniejszy projekt stawia za główny cel określenie biologicznej roli zidentyfikowanych *parS*. Badania te zostaną przeprowadzone z wykorzystaniem trzech modeli badawczych – trzech replikonów *repABC* reprezentujących: plazmidy (*pcai42C* z *Frigidibacter mobilis*), megaplazmidy (*pAMI4* z *Paracoccus aminophilus*) i chromidy (chromosom 2 z *Allorhizobium vitis* o niekanonicznej budowie modułu *repABC*).

W plazmidzie *pcai42C* *parS* znajdują się w obrębie genu *cas3* – zamierzamy zbadać, czy w tym przypadku wiązanie białka RepB z *parS* może regulować ekspresję genów operonu *cas*. W *pAMI4* i chromosomie 2 powtórzenia *parS* występują w długim regionie międzygenowym. Chcemy zbadać, czy dystrybucja dodatkowych *parS* jest przypadkowa, czy też jest ona determinowana kierunkiem replikacji DNA (model *pAMI4*), a także określić rolę dodatkowych *parS* w stabilizacji niezbędnego replikonu (chromosom 2), którego replikacja (i partycja) może być zsynchronizowana z replikacją (i segregacją) głównych chromosomów.

Mechanizmy odpowiedzialne za stabilne utrzymywanie replikonów *repABC* w komórkach bakterii analizowano dotąd wyłącznie przez pryzmat funkcjonowania samych operonów partycyjno-replikacyjnych. Realizacja przedstawionego projektu pozwoli po raz pierwszy na holistyczny wgląd w strukturę i funkcjonowanie replikonów *repABC*. Uzyskane wyniki mogą przynieść unikatowe dane na temat dualistycznej roli sekwencji *parS* oraz jej zaangażowania zarówno w stabilizację replikonów, jak i w regulację ekspresji sąsiadujących z nią genów. Analiza niekanonicznego operonu *repABC* pozwoli na zdefiniowanie nowych, wyróżnionych *in silico* komponentów tego operonu, co może również przynieść informacje na temat synchronizacji replikacji chromosomu głównego i chromosomu 2 w cyklu komórkowym *A. vitis*.