

Wpływ zmian poziomu metabolitów na replikację DNA w komórkach *Escherichia coli*

Anna Wosinski

Replikacja DNA jest podstawowym procesem biologicznym, niezbędnym dla każdego organizmu. Centralny metabolizm węgla (CCM) ma zasadnicze znaczenie jako główne źródło energii wszystkich funkcji życiowych organizmów, zapewniając uzyskanie energii z substancji odżywczych i dostarczanie prekursorów do dalszej biosyntezy. We wcześniejszych badaniach zcharakteryzowano temperaturo-wrażliwe mutanty *Escherichia coli*, które posiadają mutacje w genach kodujących białka biorące udział w replikacji DNA. Ich swoistymi cechami jest filamentująca morfologia komórki i zahamowanie wzrostu w restrykcyjnej temperaturze. Zaobserwowano, że defekt ten może być tłumiony przez delecję niektórych genów kodujących enzymy z CCM jak np: *pta*, *ackA* ze szlaku przemiany octanu i *gpmA* z glikolizy/glukoneogenezy. Jedną z możliwości wytłumaczenia tego zjawiska jest hipoteza, zakładająca, że zwiększa się poziom metabolitów w wyniku zaburzeń pewnych enzymów CCM, co może być odpowiedzialne za wpływ na replikację DNA.

Celem badań przeprowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej było testowanie powyższej hipotezy poprzez zbadanie oddziaływania metabolitów: pirogronianu, octanu, bursztynianu i fumaranu na wzrost i morfologię komórek oraz replikację DNA w temperaturze restrykcyjnej szczepów: *dnaA46(ts)*, *dnaB8(ts)*, *dnaC(ts)*, *dnaE486(ts)*, *dnaG(ts)*, *dnaN159(ts)* i MG1655 (jako szczep kontrolny). Wzrost bakterii był badany w porównaniu do wzrostu bakterii szczepu typu dzikiego, w temperaturach permissywnej i restrykcyjnej, w obecności różnych stężeń w/w metabolitów. W celu zbadania wpływu metabolitów na syntezę DNA oceniałam kinetykę tego procesu przez pomiar wcielania radioaktywnie znakowanej thymidyny do DNA. Analiza mikroskopowa miała na celu zbadanie wpływu metabolitów na morfologię bakterii.

Zahamowanie wzrostu mutantów bakteryjnych było w różnym stopniu suprimowane przez badane metabolity. Efekt filamentacji mutantów został suprimowany w obecności wszystkich w/w metabolitów. Jednocześnie proces replikacji DNA, mierzony poprzez określenie kinetyki syntezy DNA w krótkim czasie po wprowadzeniu warunków restrykcyjnych (podwyższona temperatura) *in vivo* albo rozpoczęcia reakcji *in vitro*, nie był stymulowany przez żaden z badanych metabolitów.

Uzyskane wyniki sugerują, że defekty obserwowane w mutantach replikacyjnych mogą być znoszone przez specyficzne metabolity występujące w podwyższonych stężeniach w komórce. Efekty te są jednak prawdopodobnie pośrednie i nie wpływają na sam proces replikacji DNA. Niemniej jednak moje rezultaty stanowią kolejny dowód na powiązania procesu regulacji replikacji DNA z centralnym metabolizmem węgla.