

Genetyczne podstawy współzależności pomiędzy regulacją replikacji DNA a centralnym metabolizmem węgla i alarmonami stresowymi w komórkach *Escherichia coli*

Monika Maciąg-Dorszyńska

Szereg złożonych globalnych systemów regulacyjnych, które rozwinęły bakterie, pozwalają na szybkie i precyzyjne przystosowanie się tych organizmów do zmieniających się warunków środowiska naturalnego. Jednym z procesów, którego precyzyjna regulacja jest kluczowa dla przeżycia organizmu jest replikacja DNA. Proces powielania materiału genetycznego bakterii rozpoczyna się w rejonie zwanym *origin* replikacji (w przypadku *Escherichia coli* - *oriC*) i przebiega dwukierunkowo aż do terminatorowego regionu zwanego *ter*. Prawidłowe zajście całego procesu wymaga obecności wielu białek stanowiących skomplikowaną strukturę biologiczną, na którą składają się przede wszystkim: inicjatorowe białko DnaA, helikaza DnaB oraz transportujące helikazę białko DnaC, holoenzym polimerazy DNA III (tworzony przez co najmniej 10 podjednostek), prymaza DnaG oraz gyraza. Ponadto prócz polimerazy DNA III *E. coli* posiada: polimerazę DNA I, o aktywności polimerazy 5'→3' oraz egzonukleazy zarówno 5'→3' jak i 3'→5', która bierze udział w usuwaniu starterów, łączeniu fragmentów Okazaki oraz naprawie DNA, polimerazę DNA II, której główną rolą jest sprawdzanie poprawności replikacji oraz naprawa błędów powstałych w wyniku działania polimerazy DNA III, polimerazę DNA IV, zaangażowaną w nieukierunkowaną mutagenezę, a także polimerazę DNA V, biorącą udział w odpowiedzi SOS i posiadającą zdolność syntezy na uszkodzonej matrycy DNA (z ang. *translesion DNA synthesis*).

Przebieg replikacji to jej trzy podstawowe etapy: inicjacja, elongacja oraz terminacja. W zakresie kontroli tych procesów najbardziej poznane zostały etapy inicjacji i terminacji. Mechanizmy regulacji elongacji nie są dobrze wyjaśnione, mimo iż etap ten stanowi kluczowy proces dla funkcjonowania komórki. Zaburzenie metabolizmu komórek w wyniku niedoboru składników odżywczych skutkuje nieprawidłowościami w procesie replikacji DNA, a tym samym zaburzeniami stabilności genetycznej. Replikacja DNA, podobnie jak cały cykl komórkowy, zależna jest od dostępności składników pokarmowych. Co ciekawe, cykl komórkowy *E. coli* i niektórych innych bakterii hodowanych w pożywce ubogiej w składniki odżywcze jest bardzo podobny do cyklu komórkowego komórki eukariotycznej. Rozpoczyna się on od fazy poprzedzającej proces syntezy DNA i przebiega poprzez sam

proces replikacji DNA oraz fazę po zakończeniu replikacji do momentu podziału komórki. Natomiast w pożywce bogatej w składniki odżywcze, dzięki rozpoczęciu nowej rundy replikacji DNA zanim poprzednia się zakończy, cały cykl komórkowy jest zdecydowanie krótszy. Występowanie różnic w przebiegu cyklu komórkowego w zależności od dostępności pokarmu świadczy o jego istotnym powiązaniu z metabolizmem komórkowym, a szczególnie z centralnym metabolizmem węglowym. Centralny metabolizm węgla (z ang. central carbon metabolism, CCM) jest szeregiem procesów, dzięki którym poprzez przemiany substratów i ich produktów pośrednich uzyskiwana jest energia niezbędna do rozwoju i rozmnażania komórki. Metabolity pośrednie powstające w wyniku tych przemian stanowią pulę substratów wyjściowych dla szlaków syntezy makrocząsteczek. Glikoliza, glukoneogeneza, szlak pentozofosforanowy i cykl kwasów trikarboksylowych tworzą rdzeń szlaków metabolizmu węgla, glukoza natomiast stanowi najczęstszy substrat wykorzystywany w reakcjach energetycznych, które stanowią podstawę funkcjonowania całej komórki. Niemniej jednak komórka może wykorzystywać różne związki organiczne wcielając je do szlaków przemian na odpowiednich etapach. Zaburzenie jakiegokolwiek ze szlaków centralnego metabolizmu węgla może skutkować zaburzeniem całego cyklu komórki, w tym replikacji DNA. W zależności od tego na jakim etapie to zakłócenie wystąpi, komórka w ogóle się nie podzieli, nie zreplikuje swojego materiału genetycznego bądź będąc w trakcie wydłużania nici potomnej DNA nie uruchomi wszystkich mechanizmów odpowiedzialnych za sprawdzenie wierności syntezy nici potomnej. Obecnie mechanizm łączący ze sobą tak ważne dla komórki procesy jakimi są replikacja DNA i centralny metabolizm węgla nie jest poznany.

Enzymy centralnego metabolizmu węglowego należą do bardzo istotnych dla funkcjonowania organizmów, a niektóre z nich są wielofunkcyjne. Powiązanie między metabolizmem węgla a replikacją DNA może dotyczyć nieznanych dotąd funkcji enzymatycznych, co jest w zgodzie z faktem, iż niektóre z białek metabolicznych mogą znajdować się w strukturach i funkcjonalnych kompleksach nie związanych z CCM. Dla przykładu, enzymy CCM mogą przejawiać aktywności katalityczne związane z funkcjami w naprawie DNA, takie jak glikozydaza uracylu czy kinaza białkowa. Wirulencja patogenów bakteryjnych może zależeć od enzymów glikolitycznych eksponowanych na powierzchni komórek. W przypadku wielu procesów chorobotwórczych, enzymy CCM oddziałują wówczas z protezami w celu degradowania śluzu na błonach śluzowych, sprzyjając inwazji. Powiązanie ze sobą replikacji DNA i CCM może odbywać się na drodze nieznanego dotąd mechanizmu. Mechanizm ten może mieć wpływ na zmiany w cyklu komórkowym, a tym samym na podział komórki, replikację i segregację chromosomu.

Pierwszym celem mojej pracy było zbadanie czy istnieją specyficzne reakcje metaboliczne (szlaków glikolizy, glukoneogenezy, szlaku pentozofosforanowego, cyklu Krebsa i szlaku metabolizmu pirogronianu) powiązane z procesem replikacji DNA u bakterii *Escherichia coli*. Badanie przeprowadzone w 2007 roku przez zespół dr Janniery pozwoliły na zidentyfikowanie genów kodujących enzymy CCM, które mogą modulować aktywność aparatu replikacyjnego. Zauważono wówczas, iż u bakterii *Bacillus subtilis* efekty niektórych mutacji w genach replikacyjnych były niwelowane przez mutacje w genach kodujących enzymy uczestniczące w końcowych etapach glikolizy. Taki system sugeruje istnienie zależnych od metabolizmu zmian w niektórych enzymach replikacyjnych, przez co możliwa jest koordynacja replikacji DNA w odpowiedzi na stan fizjologiczny komórki. W związku z tym zadaliśmy sobie pytanie czy zjawisko to charakterystyczne jest tylko dla jednego rodzaju bakterii, czy też jest raczej bardziej powszechne?

Aby odpowiedzieć na to pytanie skonstruowałam szczepy bakterii *Escherichia coli* niosące kombinację mutacji w genach replikacyjnych, nadających komórkom fenotyp temperaturo-wrażliwości oraz w genach centralnego metabolizmu węgla. Do badań wybrałam szczepy bakteryjne z mutacjami w genach *dnaA* (kodującym białko odpowiedzialne za inicjację replikacji), *dnaC* (białko transportujące helikazę DnaB do nici DNA), *dnaG* (prymaza), *dnaE* (podjednostka alfa DNA polimerazy III) i *dnaN* (podjednostka beta DNA polimerazy III) oraz dostępne z kolekcji Keio szczepy z delecjami w genach kodujących enzymy metaboliczne. Następnie analizowałam efekty supresji mutacji w genach odpowiedzialnych za replikację DNA, której efektem fenotypowym była temperaturo-wrażliwość, przez mutacje w genach metabolicznych (szlaków glikolizy, glukoneogenezy, pentozofosforanowego, metabolizmu pirogronianu oraz cyklu Krebsa). Zaobserwowałam, że fenotyp temperaturo-wrażliwości w przypadku obecności mutacji *dnaA46*, *dnaG(ts)* oraz *dnaN159* niwelowany jest przez mutacje w genach kodujących acetylotransferazę fosforanową (Pta) oraz kinazę octanową (AckA), biorące udział w szlaku metabolizmu pirogronianu. Przy obecności mutacji *dnaB8* supresja obserwowana jest również w przypadku mutacji w genach kodujących enzymy izomerazy glukozo-fosforanowej (Pgi) katalizującej reakcję szlaków glikolizy i glukoneogenezy oraz acetylotransferazy fosforanowej (Pta). Efekt mutacji w genie *dnaG* jest z kolei niwelowany przez mutację w genach fosfogliceromutazy I (GpmA) szlaku glikolizy/glukoneogenezy [1].

Proces replikacji DNA musi być bardzo dokładny, aby nie narażać komórki na pojawianie się mutacji wynikających z błędów jakie popełnia polimeraza DNA III podczas syntezy nici potomnej. Wytworzone zostały specjalne mechanizmy pozwalające sprawdzać

wierność tego procesu. Wysoka dokładność replikacji DNA zachowana jest przede wszystkim dzięki obecności podjednostek alfa (DnaE) i epsilon (DnaQ) polimerazy DNA III. Białko DnaE to katalityczna podjednostka polimerazy, która również odpowiedzialna jest za precyzyjne dołączanie nukleotydów do nowo syntetyzowanego łańcucha DNA. DnaQ z kolei posiada aktywność korektorską 5'→3'. Nieobecność któregoś z białek skutkuje pojawieniem się spontanicznych mutacji i chroniczną indukcją odpowiedzi SOS u bakterii. Oprócz genów *dnaE* i *dnaQ*, produkty genu *dnaX* również biorą udział w utrzymywaniu wierności i dokładności procesu replikacji. Ostatnio przeprowadzone badania wskazały, że dokładność procesu replikacji DNA dotyczy zarówno nici ciągłej jak i opóźnionej.

Efektom mutacji *dnaQ49* i *dnaX36* jest pojawienie się bardzo dużej liczby spontanicznych mutacji, dlatego też wykorzystując tę zależność, w kolejnym etapie moich badań, sprawdziłam czy połączenie centralnego metabolizmu węgla z replikacją DNA związane jest tylko z wydajną syntezą nici potomnej, czy ma również wpływ na dokładność tego procesu. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wzrost efektu mutatorowego w szczepach z mutacją w genach *dnaQ49* i *dnaX36* niwelowany jest w obecności mutacji w genach kodujących enzymy: hydratazę akonitynianową B (AcnB), dehydrogenazę izocytrynianową specyficzną dla NADP⁺ (Icd), kinazę octanową (AckA) i acetylotransferazę fosforanową (Pta). Jedynie w przypadku mutacji w genie *dnaX*, również dysfunkcja dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (Zwf) powoduje obniżenie poziomu spontanicznych mutacji [2]. Efekty supresji we wszystkich otrzymanych supresorach dla każdej z mutacji *dna* mogą zostać zniesione poprzez kontrolowaną ekspresję dzikiego typu genu, znajdującego się pod kontrolą promotora obecnego na plazmidzie.

Aby zbadać inne efekty fenotypowe mutacji *dna* wykorzystałam charakterystyczny efekt tworzenia filamentów przez temperaturo-wrażliwe szczepy hodowane w podwyższonej temperaturze. Hodowanie bakterii w temperaturze restrykcyjnej prowadzi do rozregulowania procesu replikacji, wskutek czego komórka nie może się podzielić i tworzy wydłużone struktury filamentów. Aby zbadać kształt komórki oraz położenie nukleoidu w pojedynczych mutantach replikacyjnych oraz podwójnych mutantach supresorowych, zidentyfikowanych w poprzednim etapie mojej pracy, wykonałam analizę przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego [3].

Długość komórki w szczepach *dnaA46*, *dnaB8*, *dnaG(ts)*, *dnaE486* oraz *dnaN159* waha się w granicach od 10 do ok. 30 μm. Obecność dodatkowej mutacji w genach *pta*, *ackA*, *pgi*, *tktB* i *gpmA*, podobnie jak w przypadku supresji temperaturo-wrażliwości, suprymuje efekt filamentacji. Kontrolowana produkcja białka metabolicznego, którego gen jest obecny

na plazmidzie, powoduje ponowne zaburzenie podziału komórki, tworzenie filamentów i wydłużenie oraz rozproszenie nukleoidu.

Niekorzystne energetycznie procesy, które zmniejszają zdolność przeżywania bakterii regulowane są poprzez tzw. odpowiedź ścisłą. Odpowiedź ścisła to przede wszystkim zespół odpowiedzi fizjologicznej bakterii na stres związany z brakiem odpowiednich składników pokarmowych (głód aminokwasowy). Jej alarmonami są czterofosforan guanozyny i pięciofosforan guanozyny (ppGpp i pppGpp, określane wspólnie jako (p)ppGpp). Funkcje (p)ppGpp przejawiają się poprzez bezpośrednie oddziaływanie z polimerazą RNA, powodując zmiany w globalnych procesach metabolicznych, takich jak ekspresja wielu genów czy replikacja DNA. Nukleotydy te biorą udział również w regulacji procesu inicjacji replikacji DNA poprzez zahamowanie replikacji z *oriC*, u bakterii *Escherichia coli*, czy negatywną regulację replikacji niektórych plazmidów. Ostatnie doniesienia wykazały, że u bakterii *Bacillus subtilis*, (p)ppGpp może regulować replikację DNA również na poziomie elongacji, powodując zatrzymanie widełek replikacyjnych podczas odpowiedzi ścisłej wskutek zahamowania aktywności prymazy DnaG. Prymaza DnaG to białko, które podczas replikacji DNA syntetyzuje krótkie fragmenty RNA tzw. startery na nici opóźnionej. Enzym ten jest niezwykle istotny, gdyż jakiegokolwiek zaburzenie jego działania skutkuje zahamowaniem całego procesu replikacji DNA. Bardzo ważnym czynnikiem transkrypcyjnym powiązanim z (p)ppGpp i mogącym brać udział w połączeniu replikacja DNA-metabolizm jest białko DksA, które wzmacnia efekt działania czterofosforanu guanozyny na promotory rybosomalne, a także pozytywnie reguluje syntezę aminokwasów przez ppGpp. Sugeruje się także, iż białko to może brać również udział wraz z ppGpp w naprawie DNA. Brak danych literaturowych wskazujących na jakiegokolwiek wpływ odpowiedzi ścisłej i jej alarmonów na proces elongacji replikacji u bakterii *Escherichia coli*, skłonił mnie do sprawdzenia, jaki wpływ alarmony odpowiedzi ścisłej oraz białko DksA mają na etap elongacji replikacji DNA.

Pomiar kinetyki syntezy starterów replikacji w układzie *in vitro* wykazał, iż czterofosforan guanozyny (ppGpp) znacznie obniża wydajność syntezy starterów RNA. Mniejsze zahamowanie zaobserwowałam w przypadku obecności pięciofosforanu guanozyny (pppGpp). Działanie (p)ppGpp było widoczne zarówno w układzie doświadczalnym w obecności helikazy DnaB (oddziałującej z DnaG), jak i przy braku DnaB [4]. Sugeruje to bezpośrednie oddziaływanie ppGpp z prymazą DnaG u *Escherichia coli*. Ponadto zbadane zostało również, w jaki sposób nukleotyd ten działa bezpośrednio na proces replikacji DNA *in vitro*. Jednocześnie wiedząc, iż białko DksA podobnie jak ppGpp stanowi główny regulator transkrypcji w odpowiedzi na warunki głodowe sprawdziłam również, czy nie ma ono

wpływu na proces replikacji *in vitro*. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, że czterofosforan guanozyny podobnie jak w przypadku zaburzenia działania prymazy podczas syntezy starterów *in vitro*, hamuje proces replikacji. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej innego regulatora transkrypcyjnego (DksA), który również mógłby wpłynąć na proces replikacji, nie wykazało istotnych zmian. Analiza kinetyki replikacji DNA *in vivo* z zastosowaniem szczepów bakteryjnych *Escherichia coli* ppGpp-*null*, w warunkach głodu aminokwasowego, nie wykazała istotnych różnic w przebiegu replikacji DNA, w odniesieniu do szczepu bakteryjnego typu dzikiego [5]. Sprzeczne wyniki mogą być spowodowane obecnością hipotetycznego, nieznanego czynnika, który maskuje działanie bezpośrednie ppGpp na prymazę DnaG *in vivo*. Ponadto prymaza DnaG może nie być skutecznie hamowana przez ppGpp w komórkach *E. coli*, ze względu na konkurencję, w jaką wchodzi z polimerazą RNA.

Zaobserwowane i przedstawione przeze mnie zależności ukazują możliwość skorelowania dwóch bardzo ważnych procesów, jakimi są replikacja DNA oraz centralny metabolizm węgla. Przeprowadzane do tej pory badania ograniczały się głównie do niezależnego poznawania tych procesów. Wyniki moich badań stanowią podstawę do dalszych badań mechanizmu tego powiązania i wskazują na poznanie dotąd nie odkrytych zjawisk oraz regulacji ich połączeń.

Literatura

- [1] Maciąg M., Nowicki D., Janniere L., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G. 2011. Genetic response to metabolic fluctuations: correlation between central carbon metabolism and DNA replication in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 10: 19.
- [2] Maciąg M., Nowicki D., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G. 2012. Central carbon metabolism influences fidelity of DNA replication in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 731: 99-106.
- [3] Maciąg-Dorszyńska M., Ignatowska M., Jannière L., Węgrzyn G., Szalewska-Pałasz A. 2012. Mutations in central carbon metabolism genes suppress defects in nucleoid position and cell division of replication mutants in *Escherichia coli*. *Gene* 503: 31-35.
- [4] Maciąg M., Kochanowska M., Łyżeń R., Węgrzyn G., Szalewska-Pałasz A. 2010. ppGpp inhibits the activity of *Escherichia coli* DnaG primase. *Plasmid* 63: 61-77.
- [5] Maciąg-Dorszyńska M., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G. 2013. Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Open Bio* 3: 161-164.