

## **Rola białka HupB w organizacji chromosomu *Mycobacterium smegmatis***

Chromosom bakteryjny podlega ciągłym rearanżacjom przestrzennym i modyfikacjom topologicznym w trakcie cyklu komórkowego. Pośród wielu białek odpowiedzialnych za organizację chromosomu, najliczniej występuje białko HU (*Heat-Unstable protein*). Jego homolog z *Mycobacterium* składa się z dwóch domen: N-końcowa domena wykazuje podobieństwo do białka HU z *E. coli*, natomiast C-końcowa domena występuje wyłącznie u promieniowców. O wyjątkowości białka HupB stanowią charakterystyczne dla eukariotycznych histonów linkerowych motywy PAKK, które są zlokalizowane w C-końcowej domenie białka. Dotychczas niewiele wiadomo było o tym, w jaki sposób HupB wpływa na organizację chromosomu *Mycobacterium* podczas cyklu komórkowego oraz nie była znana biologiczna funkcja jego unikatowej, C-końcowej domeny. W celu wyjaśnienia powyższych zagadnień zostały skonstruowane fluorescencyjne szczepy reporterowe *M. smegmatis*, w których białko HupB lub jego skrócona wersja, pozbawiona C-końcowej domeny, były produkowane w fuzji z białkami fluorescencyjnymi (zamiast natywnej wersji HupB). Analizy mikroskopowe wykazały, że białko HupB wiąże się wzdłuż całego chromosomu *M. smegmatis*, natomiast skrócona wersja białka nie wiąże się do DNA efektywnie. Obserwacje te zostały potwierdzone metodą wysokorozdzielczej mikroskopii PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*). Zastosowanie metody ChIP-Seq (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*) pozwoliło stwierdzić, że największe zagęszczenie miejsc wiązania białka HupB na chromosomie występuje w okolicy regionu *oriC* (*origin of chromosomal replication*) i zmniejsza się w kierunku *ter* (*chromosome terminus*), co sugeruje, że HupB bierze udział w organizacji nowo zreplikowanych regionów *oriC*. W celu wyjaśnienia wpływu HupB na dynamikę replikacji przygotowano szczepy pozbawione genu *hupB* i produkujące białko DnaN w fuzji z EGFP (umożliwiającym śledzenie postępu replikacji). Zaobserwowano, że brak HupB powoduje opóźnienie w inicjacji nowej rundy replikacji, co może być wynikiem wiązania się białka HupB w okolicy *oriC* i organizowaniem tego regionu. W dalszych badaniach, białko HupB w fuzji z białkiem fluorescencyjnym zostało wykorzystane jako marker chromosomalny do analizy lokalizacji chromosomu *M. smegmatis* w czasie rzeczywistym na poziomie pojedynczej komórki. Wyniki prezentowanych badań przyczyniły się do lepszego zrozumienia roli białka HupB w organizacji chromosomu oraz poszerzyły wiedzę na temat struktury chromosomu bakteryjnego.