

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

mgr Monika Oliwa

**Analiza strukturalno-funkcjonalna
oddziaływania wybranych białek Rep z
rejonem DUE origin replikacji DNA**

Structural and functional analysis of the
interactions of selected Rep proteins with DUE
region of DNA replication origin

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. Igor Konieczny
Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Węgrzyn
Zakład Biologii Molekularnej

GDAŃSK 2024

OŚWIADCZENIE

Ja, niżej podpisana oświadczam, iż przedłożona praca dyplomowa została wykonana przeze mnie samodzielnie, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych innych osób.

.....
data

.....
własnoręczny podpis

Dziękuję Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie w realizacji projektu:

„Analiza strukturalno-funkcjonalna kompleksów nukleoproteinowych plazmidowych białek Rep i ssDNA rejonu DUE origin,,

w ramach grantu SONATA 13

2017/26/D/NZ1/00239



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Część badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej została opublikowana w:

Wegrzyn K., **Oliwa M.**, Nowacka M., Zabrocka E., Bury K., Purzycki P., Czaplewska P., Pipka J., Nowotny M., Giraldo R., Konieczny I., (2023). Rep molecule accommodates both up together dsDNA and ssDNA which contributes a loop-back mechanism for DNA replication initiation. *Nuclei Acids Res.*, 51(19) 10551-10567

Chciałabym serdecznie podziękować:

Profesorowi Igorowi Koniecznemu

Za przekazaną wiedzę, możliwość rozwoju naukowego, cenne merytoryczne dyskusje, opiekę nad przebiegiem mojej pracy doktorskiej oraz okazaną cierpliwość i wyrozumiałość.

Dr hab. Katarzynie Węgrzyn

Za obdarzenie mnie zaufaniem i możliwość realizacji projektu, za przekazaną wiedzę, umiejętności i danie przestrzeni do rozwoju. Dziękuję również za cierpliwość i wyrozumiałość oraz za pomoc w przygotowaniu pracy doktorskiej.

Koleżankom, kolegom i pracownikom

Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej

Za wszelką okazaną pomoc oraz za stworzenie przyjaznego miejsca pracy.

Szczególne podziękowania dla Marty Gross, Małgorzaty Ropelewskiej, Eweliny Wysockiej oraz Magdaleny Sroka za liczne dyskusje, zarówno te merytoryczne, jak i te motywacyjne i wspierające na duchu!

Mężowi i rodzeństwu

Za nieustającą wiarę we mnie, nawet gdy sama zaczynałam ją tracić, za ciągłą motywację i nieocenione wsparcie, szczególnie w tych najtrudniejszych chwilach.

Mamie i Tacie(†)

Dziękuję za przekazane wartości, za niezłomną wiarę we mnie, za wsparcie, dodawanie mi wiatru w skrzydła, oraz za bezwarunkową miłość i przyjaźń.

Drodzy rodzice to Wam dedykuję niniejszą pracę.

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE.....	10
2. WSTĘP	14
2.1. Inicjacja replikacji w komórkach eukariotycznych.....	15
2.2. Inicjacja replikacji DNA w komórkach archeonów	19
2.3. Replikacja DNA w komórkach bakteryjnych	21
2.4. Inicjacja replikacji plazmidowego DNA.....	29
2.4.1. Struktura plazmidowych białek inicjatorowych.....	30
2.4.2. Struktura plazmidowego <i>origin</i> replikacji.....	33
2.4.3. Mechanizm inicjacji replikacji w plazmidowym DNA.....	36
3. CEL PRACY	41
4. MATERIAŁY	42
4.1. Szczepy bakteryjne	42
4.2. Plazmidy.....	42
4.3. Oligonukleotydy.....	43
4.4. Podłoża hodowlane	46
4.5. Antybiotyki	46
4.6. Bufory	46
4.6.1. Bufory standardowe	46
4.6.2 Bufory do oczyszczania ekstraktu bakteryjnego z <i>E. coli</i> C600	47
4.6.3. Bufory do oczyszczania białek.....	47
4.7. Białka dostępne komercyjnie	49
4.8. Przeciwciała	50
4.9. Złoża chromatograficzne.....	50
4.10. Roztwory.....	50
4.11. Odczynniki	51
4.12. Skład żeli do rozdzielania elektroforetycznego	52
4.13. Inne materiały	53
4.14. Aparatura.....	53
5. METODY	55
5.1. Izolacja DNA	55
5.1.1. Izolacja chromosomalnego DNA bakterii	55
5.1.2. Izolacja superzwiniętej formy plazmidowego DNA	55
5.1.3. Izolacja DNA z żelu.....	56
5.2. Mutageneza miejscowo-specyficzna.....	57

5.3. Trawienie matrycowego DNA po reakcji PCR.....	57
5.4. Określenie stężenia i czystości DNA	58
5.5. Hybrydyzacja DNA.....	58
5.6. Uzyskanie komórek kompetentnych	58
5.7. Transformacja komórek kompetentnych.....	58
5.8. Oczyszczanie frakcji białek replikacyjnych z komórek <i>E. coli</i> C600.....	58
5.9. Oczyszczanie białek	59
5.9.1. Nadprodukcja białek	59
5.9.2. Oczyszczanie białek na złożach chromatograficznych	61
5.9.3. Oczyszczanie białek poprzez wysalanie: <i>DnaC</i>	63
5.10. Oznaczanie stężenia białek - densytometria.....	64
5.11. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	64
5.12. Barwienie żeli agarozowych	65
5.12.1. Barwienie przed rozdziałem elektroforetycznym.....	65
5.12.2. Barwienie po rozdziale elektroforetycznym	65
5.13. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).....	65
5.14. Elektroforeza DNA w warunkach denaturujących.....	65
5.15. Barwienie żeli poliakrylamidowych	66
5.15.1. Barwienie <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	66
5.15.2. Barwienie srebrem	66
5.16. Dichroizm kołowy (CD)	66
5.17. Sieciowanie kompleksów nukleoproteidowych i ich analiza w spektrometrii mas	67
5.18. Porównanie sekwencji białek Rep	68
5.19. Replikacja <i>in vitro</i> w ekstrakcie bakteryjnym.....	68
5.20. Opóźnienie migracji prążka w żelu (EMSA) – elektroforeza DNA w żelu poliakrylamidowym	68
5.20.1. Znakowanie dwuniciowych fragmentów DNA	69
5.20.2. Eksperyment EMSA wariantów białka <i>TrfA</i> z <i>ssDNA</i> i z <i>dsDNA</i>	70
5.20.3. Eksperyment EMSA wariantów białka <i>RepA</i> z <i>ssDNA</i> i z <i>dsDNA</i>	70
5.21. Plazmonowy rezonans powierzchniowy (SPR)	70
5.22. Footprinting z użyciem $KMnO_4$	71
5.22.1. Modyfikacja <i>ssDNA</i> z użyciem $KMnO_4$	71
5.22.2. Oczyszczanie plazmidowego DNA po reakcji modyfikacji.....	72
5.22.3. Reakcja wydłużenie startera.....	72
5.23. Test immunoenzymatyczny (ELISA)	73

5.24. Test aktywności helikazy w rejonie <i>oriV</i> plazmidu RK2 (FI*).....	74
5.25. Reakcja sekwencjonowania	75
5.25.1. Denaturacja <i>dsDNA</i> do <i>ssDNA</i> – przygotowanie matrycy <i>DNA</i> do sekwencjonowania	75
5.25.2. Reakcja sekwencjonowania.....	75
5.26. Mikroskopia sił atomowych (AFM).....	76
6. WYNIKI	77
6.1. Identyfikacja reszt aminokwasowych białek Rep odpowiedzialnych za wiązanie <i>ssDNA</i> DUE.	78
6.2. Oczyszczanie wariantów białka TrfA	85
6.3. Analiza struktury II-rzędowej oczyszczonych wariantów białek Rep	88
6.4. Analiza aktywności replikacyjnej wariantów białka TrfA.....	90
6.5. Test aktywności helikazy DnaB w rejonie <i>oriV</i>	91
6.6. Oddziaływanie wariantów białka TrfA z helikazą DnaB.....	93
6.7. Analiza otwierania origin replikacji <i>oriV</i> i <i>oriS</i> – footprinting KMnO_4	94
6.8. Oddziaływanie wariantów białka TrfA z <i>dsDNA</i> i <i>ssDNA</i>	98
6.8.1. Weryfikacja oddziaływania wariantów białek Rep z rejonem origin replikacji przy użyciu metody EMSA	98
6.8.2. Analiza oddziaływania wariantów białka TrfA z rejonem <i>oriV</i> przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM)	101
6.8.3. Analiza wiązania wariantów białka TrfA z <i>ssDNA</i> i <i>dsDNA</i> przy użyciu techniki SPR.	103
7. DYSKUSJA	106
8. BIBLIOGRAFIA.....	114
9. WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE	129

INDEKS SKRÓTÓW

a.u. - (*ang.* arbitrary units) jednostki umowne

5-Br-dU – (*ang.* 5-Bromo-2'-Deoxyuridine) 5-bromodeoksyurydyna

AAA+ - (*ang.* ATPase associated with various cellular activities) ATPazy związane z różnymi aktywnościami komórkowymi

Abf1 - (*ang.* ARS binding factor 1) czynnik transkrypcyjny wiążący ARS

ACS - (*ang.*, ARS Consensus Sequence) sekwencje najwyższej zgodności replikujące autonomicznie

ADP – (*ang.* Adenosine-5'-Diphosphate) adenozy-5'-difosforan

AFM – (*ang.* Atomic Force Microscopy) mikroskopia sił atomowych

APS – (*ang.* Ammonium Persulfate) nadsiarczan amonu

ARS - (*ang.* Autonomously Replicating Sequences) autonomicznie replikujące się sekwencje

ATP – (*ang.* Adenosine-5'-Triphosphate) adenozy-5'-trifosforan

BSA - (*ang.* Bovine Serum Albumin) albumina surowicy bydlęcej

BUS - (*ang.* Basal Unwinding System) podstawowy system rozwijania DNA

cryo-EM - (*ang.* cryo-Electron Microscopy) mikroskopia krioelektronowa

CK – (*ang.* Creatine Kinase) kinaza kreatynowa

CP – (*ang.* Creatine Phosphate) fosforan kreatyny

DBD - (*ang.* DNA Binding Domain) domena wiążąca DNA

DNA – (*ang.* Deoxyribonucleic Acid) kwas deoksyrybonukleinowy

DOR - (*ang.* DnaA-Oligomerization Region) region oligomeryzacji białka DnaA

dsDNA – (*ang.* double-stranded Deoxyribonucleic Acid) dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy

DTT – (*ang.* Dithiothreitol) ditiotreitól

DUE - (*ang.* DNA Unwinding Element, DUE) rejon bogaty w pary AT, miejsce otwierania DNA

EDTA - (*ang.* Ethylenediaminetetraacetic Acid) kwas etylenodiaminotetraoctowy

ELISA – (*ang.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test immunoenzymatyczny

EMSA – (*ang.* Electrophoretic Mobility Shift Assay) test opóźnienia migracji prążka w żelu

EtBr - (*ang.* Ethidium Bromide) bromek etydydny

HEPES – (*ang.* 4-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-1-Ethanesulfonic Acid) kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy

HTH - (*ang.* Helix-Turn-Helix) motyw helisa-skręt-helisa

HU - (*ang.* Histone-like protein) białko histonopodobne

IHF - (*ang.* Integration Host Factor) czynnik integracji gospodarza

IBR - (*ang.* IHF-Binding Region) region wiązania IHF

IPTG – (*ang.* Isopropyl β -D-Thiogalactoside) izopropyl β -D-tiogalaktozyd

IR - (*ang.* Inverted Repeats) sekwencje odwróconych powtórzeń

ISM - (*ang.* Initiator-Specific Motif) motyw specyficzny dla białka inicjatorowego

kDa – (*ang.* kilo Dalton)

LA – (*ang.* Luria Agar) podłoże bakteryjne stałe

LB – (*ang.* Luria Broth) podłoże bakteryjne płynne

MCM - (*ang.* Minichromosome Maintenance Protein) kompleks białek utrzymujących minichromosom

MS – (*ang.* Mass Spectrometry) spektrometria mas

NAP - (*ang.* Nucleoid-Associated Protein) białko związane z nukleoidem

OD – (*ang.* Optical Density) gęstość optyczna

OD₆₀₀ – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 600 nm

ORB - (*ang.* Origin Recognition Boxes) miejsca w *origin* rozpoznawane i wiązane przez białka inicjatorowe

ORC – (*ang.* Origin Recognition Complex) kompleks białek rozpoznających *origin* replikacji

ORI – (*ang.* Origin of Replication) origin replikacji

PAGE – (*ang.* Polyacrylamide Gel Electrophoresis) elektroforeza z wykorzystaniem żelu poliakrylamidowego

PCR – (*ang.* Polymerase Chain Reaction) reakcja łańcucha polimerazy

PDB – (*ang.* Protein Data Bank) wirtualny bank danych o białkach

Pol III – (*ang.* DNA Polymerase III) polimeraza III DNA

poly (dI-dC) – (*ang.* Poly (2'-deoxyinosinic-2'-deoxycytidylic acid)) kwas poli (2'-deoksyinozyno-2'-deoksytydylowy)

Pre-RC - (*ang.* pre-Replication Complex) kompleks przedreplikacyjny

RU - (*ang.* Respond Units) jednostki odpowiedzi w analizie SPR, gdzie 1 RU odpowiada 1 pg/mm² substratu

SDS – (*ang.* Sodium Dodecyl Sulfate) dodecylosiarczan sodu

SPR – (*ang.* Surface Plasmon Resonance) rezonans plazmonów powierzchniowych

SSB – (*ang.* Single-Stranded DNA Binding Protein) białko wiążące jednoniciowe DNA

ssDNA – (*ang.* single-stranded Deoxyribonucleic Acid) jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy

TCA – (*ang.* Trichloric Acid) kwas trójchlorowy

TEMED – (*ang.* N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

WH - (*ang.* Wigned Helix) oskrzydłona helisa

1. STRESZCZENIE

Replikacja DNA zachodzi w każdej żywej komórce. Proces replikacji DNA pozwala na zwielokrotnienie materiału genetycznego i przekazanie go komórkom potomnym. Jednym z kluczowych etapów tego zjawiska jest inicjacja replikacji DNA. W *origin* replikacji komórek bakteryjnych, inicjacja replikacji DNA rozpoczyna się od związania specyficznych sekwencji dwuniciowego DNA (dsDNA) przez bakteryjne inicjatory replikacji. Oddziaływanie to, powoduje destabilizację dsDNA w rejonie bogatym w pary AT (DUE), w którym dochodzi do rozplecenia podwójnej helisy DNA. Powstałe fragmenty jednoniciowego DNA (ssDNA) są rusztowaniem dla pozostałych białek replikacyjnych, które przyłączając się, tworzą kompleks przedreplikacyjny i synteza nowej cząsteczki DNA może zostać rozpoczęta. Dotychczasowe dane literaturowe donoszą, że bakteryjne inicjatory replikacji, takie jak białko DnaA, czy RctB oprócz dsDNA, oddziałują także z ssDNA powstałym w rejonie destabilizacji. W czasie prowadzonych przeze mnie badań, strukturalny i funkcjonalny charakter tworzących się kompleksów nukleoproteinowych inicjatorów bakteryjnych z DNA nadal pozostawał niewyjaśniony. Różne modele opisujące te zależności zostały zaproponowane. Dwa modele: „two-state model” oraz „loop-back model” wydawały się być najbardziej prawdopodobne.

Plazmidy iteronowe to pozachromosomalne cząsteczki DNA występujące w bakteriach Gram-ujemnych, które przeprowadzają proces replikacji niezależnie od chromosomu bakterii. Plazmidy iteronowe posiadają własne inicjatory replikacji, białka Rep, które podczas inicjacji replikacji plazmidowego DNA wiążą zarówno powtórzone sekwencje w dsDNA, tzw. iterony, jak i ssDNA w rejonie DUE.

W przebiegu mojej pracy doktorskiej poddałam analizie strukturalno-funkcjonalnej znaczenie oddziaływań białek Rep (tj. TrfA, RepE oraz RepA) z ssDNA podczas inicjacji replikacji wybranych plazmidów iteronowych. Przeprowadzone analizy *in vitro* wykazały, że interakcje białek Rep z ssDNA, są kluczowe na etapie otwierania *origin* replikacji oraz są kluczowe dla stabilnego utrzymania kompleksu otwartego. Zaburzenie oddziaływania białek Rep z ssDNA hamuje proces otwierania *origin* oraz zajście kolejnych etapów inicjacji replikacji, tj. rekrutację i aktywację helikazy oraz rozpoczęcie syntezy nowej cząsteczki DNA. Ponadto w niniejszej pracy zostały zdefiniowane aminokwasy w białkach Rep, TrfA i RepE, niezbędne do tworzenia się kompleksów

nukleoproteinowych z ssDNA. Aminokwasy te zostały wytypowane na podstawie analizy struktury krystalograficznej białka RepE z ssDNA otrzymanej w naszym zespole, analizy sieciowania białek Rep z DNA połączonego ze spektrometrią mas, porównania struktur II-rzędowych badanych białek Rep, oraz analiz biochemicznych. Ważnym aspektem projektu jest uzyskanie w naszym zespole struktury krystalograficznej dla potrójnego kompleksu nukleoproteinowego ssDNA-RepE-dsDNA. Struktura ta udowadnia, że białka Rep mogą w tym samym czasie oddziaływać z ssDNA i dsDNA. Taki charakter strukturalny tworzących się kompleksów nukleoproteinowych w plazmidowym *origin* replikacji, jest silnym dowodem wspierającym słuszność modelu „loop-back” opisującego mechanizm inicjacji replikacji.

ABSTRACT

DNA replication occurs in every living cell. The process of DNA replication allows for the multiplication of genetic material and its transfer to daughter cells. One of the key stages of this phenomenon is the initiation of DNA replication. In the bacterial origin of replication, the replication initiation process begins with the binding of specific double-stranded DNA (dsDNA) sequences by bacterial replication initiators. This interaction causes destabilization of dsDNA in the AT-rich region, (DUE). This provides to dsDNA melting. In consequence appearing single-stranded DNA (ssDNA) fragments serves as a scaffold for the other replication proteins, which form a pre-replication complex and enable beginning of a new DNA molecule synthesis. Literature data indicated that bacterial replication initiators, such as DnaA or RctB proteins, not only bind dsDNA but also interact with ssDNA formed after melting of the DUE region. At the time of this project and my research, the structural and functional nature of the nucleoprotein complexes of bacterial initiators with DNA still remained elusive. Various models describing mechanism of replication initiation process have been proposed. Two models: the "two-state model" and the "loop-back model" had the strongest support by the experimental evidence.

Iteron plasmids are extrachromosomal DNA molecules found in Gram-negative bacteria. They can replicate independently of the bacterial chromosome. Iteron plasmids also have their own replication initiators, Rep proteins. During plasmid DNA replication initiation, Rep proteins bind both, repeated sequences on dsDNA, called iterons, and ssDNA within DUE region. In some cases, for the replication initiation process, iteron plasmids also engage bacterial initiator, DnaA protein.

In this work, I described the structural and functional significance of the interactions of Rep proteins (i.e. TrfA, RepE and RepA) with ssDNA during the DNA replication initiation of selected iteron plasmids. Performed *in vitro* analyses of Rep-ssDNA interaction showed that it is crucial at the *origin* opening step and for the open complex formation and maintenance. Disruption of Rep-ssDNA complex formation inhibits the process of plasmid DNA *origin* opening and inhibits further steps of replication initiation, such as: helicase protein recruitment and activation, prereplication complex formation and synthesis of a new DNA molecule. Moreover, in this work, we defined the amino acid residues of Rep proteins, TrfA and RepE, responsible for such a nucleoprotein

complexes formation. These amino acids were selected based on the: analysis of the crystallographic structure of RepE-ssDNA complex, analysis of Rep protein cross-linked with ssDNA fragments, combined with mass spectrometry (MS), comparison of the secondary structures of the Rep proteins, and biochemical analyses. An important aspect of this project was solution of crystallographic structure tripartite nucleoprotein complex of ssDNA-RepE-dsDNA. Structure analysis proves that Rep proteins can interact both up together with ssDNA and dsDNA. Obtained structural data strongly supports the validity of the "back-loop" model proposed as a mechanism of replication initiation process of bacterial DNA.

2. WSTĘP

W przyrodzie rozmnażanie jest podstawowym procesem zapewniającym przetrwanie i ewolucję każdego gatunku. Każda klasa organizmów wykształciła swoisty mechanizm rozmnażania, przekazujący materiał genetyczny od organizmów rodzicielskich do organizmów potomnych. W każdym z tych przypadków, aby materiał genetyczny mógł zostać przekazany, musi ulec zwielokrotnieniu. Odbywa się to poprzez proces replikacji DNA, którego efektem jest powstanie wiernych replik materiału genetycznego (O'Donnell i wsp., 2013).

Pojęcie replikacji DNA jest powszechnie znane, zaś sam proces intensywnie badany od wielu lat. Pomimo obszernej wiedzy, proces ten nadal skrywa wiele niewiadomych. Replikacja DNA zachodzi w komórkach każdej z trzech domen życia, Archeonów, Bakterii i Eukariontów. Replikacja DNA jest podstawą proliferacji komórek, zaś jej brak może doprowadzić do ich śmierci (Diehl i wsp., 2022; O'Donnell i wsp., 2013).

Pomimo różnic pomiędzy organizmami, proces inicjacji replikacji DNA przebiega podobnie we wszystkich typach komórek. Niektóre komórki oprócz własnego genomowego DNA posiadają również pozachromosomalne cząsteczki DNA, nazwane plazmidowym DNA. Plazmidy nie są niezbędne do przeżycia komórki w optymalnych dla niej warunkach, jednak mogą przyczynić się do ich przetrwania w warunkach stresowych. Plazmidy zawierają geny kodujące, np. białka odpowiedzialne za oporność na antybiotyki, białka pozwalające gospodarzowi na metabolizm takich związków jak, np.: kwas salicylowy, oktan, kamfor, czy toluen (Włodarczyk, 2002). Kompleksy tworzone w plazmidowym miejscu inicjacji replikacji DNA, tak zwanym *origin* (*ang.* Origin of Replication, ORI), składają się z białek replikacyjnych gospodarza oraz białek kodowanych w plazmidowym DNA. Replikacja plazmidowego DNA zachodzi niezależnie od chromosomalnego DNA gospodarza (Smyth i wsp., 2022). Plazmidy iteronowe, które występują w komórkach bakterii Gram-ujemnych, posiadają charakterystyczne powtórzone sekwencje zlokalizowane w miejscu inicjacji replikacji *origin*, zwane iteronami. W plazmidowym DNA, iterony są miejscem wiązania białek inicjujących proces replikacji. Plazmidy iteronowe są modelowymi replikonami do prowadzenia badań nad molekularnymi mechanizmami inicjacji replikacji DNA oraz do analizy mechanizmów kontroli liczby kopii plazmidu w komórkach bakteryjnych.

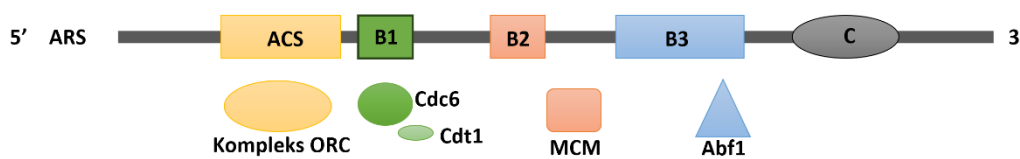
Dotychczasowe badania dostarczyły podstawową wiedzę na temat biologii plazmidów i związku pomiędzy plazmidowym DNA a komórkami gospodarza (Konieczny i wsp., 2014). Pomimo pewnych różnic, proces replikacji plazmidowego DNA opiera się na tych samych podstawowych paradygmatach replikacji, co pozostałe replikony bakteryjne (Robinson i Bell, 2005).

Proces replikacji DNA można podzielić na 3 główne etapy: inicjację, elongację i terminację. Kluczowym etapem jest inicjacja replikacji. Aby replikacja mogła być zainicjowana, oprócz cząsteczki DNA, wymagana jest obecność białek inicjatorowych zdolnych do strukturalnej modyfikacji DNA. Białka inicjujące replikację DNA powodują destabilizację dwuniciowej helisy DNA w obrębie *origin* replikacji w rejonie bogatym w pary AT. W skutek destabilizacji DNA, dwuniciowa helisa, przy asyście kolejnych białek uczestniczących w inicjacji replikacji, zostaje rozpleciona do dwóch pojedynczych nici, do których mogą przyłączać się kolejne białka uczestniczące w procesie inicjacji replikacji oraz w syntezie DNA (Robinson i Bell, 2005; O'Donnell i wsp., 2013; Hu i Stillmann B., 2023).

2.1. Inicjacja replikacji w komórkach eukariotycznych

Badania nad inicjacją replikacji w komórkach eukariotycznych są intensywnie prowadzone już od wielu lat. Pomimo tego, złożoność mechanizmu replikacji i stopień skomplikowania powstających kompleksów nukleoproteinowych w *origin* replikacji znacząco utrudnia ich analizę (Jacob i Brenner, 1963; Parker i wsp., 2017). W ostatnich latach, wraz z postępem technologii, pojawiło się kilka przełomowych odkryć, pozwalających odpowiedzieć na niektóre ze stawianych pytań. Dotychczas większość badań nad inicjacją replikacji eukariontów prowadzonych było na kilku organizmach modelowych, na przykład: *Saccharomyces cerevisiae* (Li i wsp., 2018; Li i wsp., 2022; James F. i Newlon C.S., 2001), *Schizosaccharomyces pombe* (Pichugina T. i wsp., 2016), *Drosophila melanogaster* (Schmidt i Bleichert, 2020, Ciesielski i wsp., 2018; Kriegstein i Hogness, 1974), czy *Xenopus laevis* (Haccard i wsp., 2023). Obecnie coraz więcej badań dotyczy również procesu inicjacji replikacji oraz białek w niej uczestniczących pochodzenia ludzkiego (Jaremko i wsp., 2020; Li i wsp., 2023; Nasheuer i Meaney, 2024). Synteza nowej nici DNA odbywa się w fazie S cyklu komórkowego, zaś sam mechanizm jest ściśle regulowany. Genom jest kopiowany dokładnie jeden raz na cykl komórkowy (Costa i Diffley, 2022). Dodatkowo, ortologi większości kluczowych białek biorących udział w inicjacji replikacji eukariotycznego DNA można znaleźć u archeonów

(Greco i wsp., 2020). Szczególnie istotne dla eukariotycznych inicjatorów jest archeonowe białko inicjujące Orc1/Cdc6, które jest analogiczne do eukariotycznej podjednostki Orc1 kompleksu białek rozpoznającego *origin* replikacji (*ang.* Origin Recognition Complex, ORC) i białka Cdc6, które są ze sobą spokrewnione pod względem sekwencji aminokwasowej (Dueber i wsp., 2007; Gaudier i in. wsp., 2007; Liang i wsp., 1995; Liu i wsp., 2000; Singleton i wsp., 2004). Komórki eukariotyczne rozpoczynają replikację w wielu miejscach *origin* rozmieszczonych punktowo na długości całego genomu.

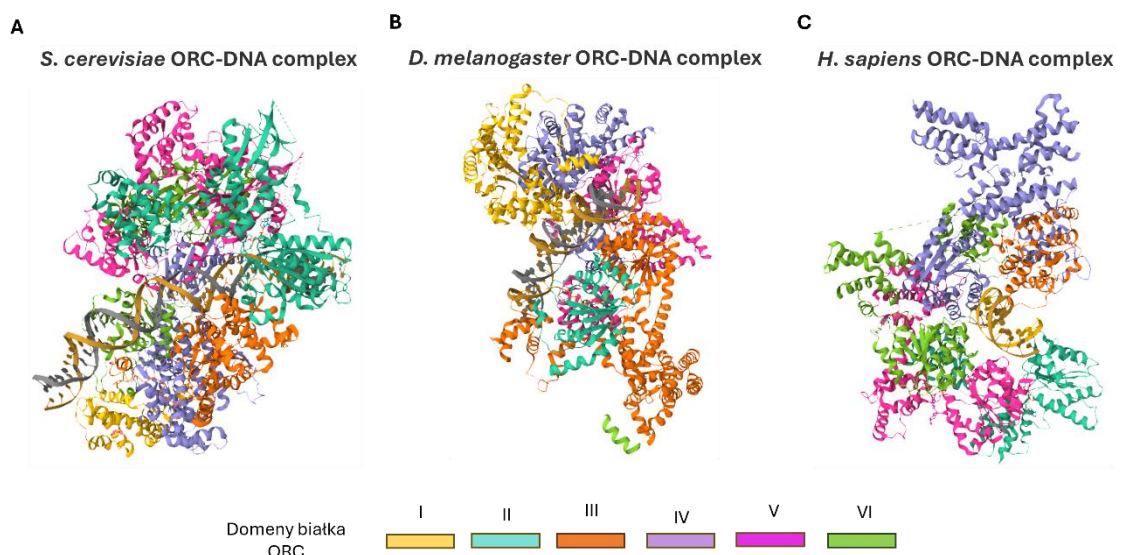


Rycina 1. Schemat miejsca ARS u *S. cerevisiae*, jako przedstawiciela komórek eukariotycznych. Motyw ARS składa się z trzech regionów: A, B, C. Region A zawiera sekwencję ACS, będącą miejscem wiązania ORC. Region B jest podzielony na trzy sekwencje: B1, B2 i B3, które odpowiadają za powinowactwo wiązania ORC, białek MCM oraz czynników transkrypcyjnych, tj. białko Abf1. Region C zawiera miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych (Rycina wykonana na podstawie Dao i wsp., 2019).

Genomy grzybów zwykle posiadają wiele miejsc ORI na każdym liniowym chromosomie (Mechali, 2010). Drożdżowe *origin* replikacji jest złożone ze 100-200 par zasad i nie posiada struktury nukleosomu (Eaton i wsp., 2010). W *origin* replikacji komórek *S. cerevisiae* znajdują się sekwencje autonomicznie replikujące się (*ang.* Autonomously Replicating Sequences, ARS), które składają się z trzech regionów: A, B i C (Foureau i wsp., 2013) (Rycina 1). Region A zawiera bogatą w reszty tyminy (T) niepalindromową konserwowaną sekwencję (*ang.*, ARS Consensus Sequence, ACS) [5-(T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A)-3] (Chang i wsp., 2008), która jest niezbędna do wiązania kompleksu białek ORC (Rao i Stillman, 1995; Lee i Bell, 1997) (Rycina 1). Region B składa się z trzech sekwencji, B1, B2 i B3. Element *origin* B1 odpowiada za powinowactwo wiązania się ORC w miejscu ACS (Rao i Stillman, 1995). Sekwencja *origin* B2, jak donoszą dane literaturowe, jest to odwrócona sekwencja miejsca ACS, która prawdopodobnie jest drugim miejscem wiązania ORC i składania kompleksu przedreplikacyjnego lub też jest miejscem wiązania helikalnego białka utrzymującego minichromosom (*ang.* Minichromosome Maintenance Protein, MCM) (Wilmes i Bell, 2002). Z kolei sekwencja B3 jest miejscem wiązania ogólnego czynnika transkrypcyjnego, Abf1 (*ang.* ARS binding factor 1). Abf1 jest białkiem wiążącym DNA.

Białko to odgrywa rolę w transkrypcji i może wpływać na strukturę chromatyny i składanie nukleosomów (Lipford i Bell, 2001, Ganapathi i wsp., 2011). Region C zawiera miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, które stymulują, lecz nie są niezbędne do aktywacji elementów ARS. Region C służy również jako platforma do wiązania kilku białek, np. Mcm1p (Chang i in., 2008), czy Abf1 (Yarragudi i in., 2007) (Rycina 1). Pomimo że regiony A i B są elementami niezbędnymi do składania maszyny replikacyjnej, to region C jest miejscem ulegającym destabilizacji i powstawania ssDNA, tym samym jest istotnym elementem biorącym udział w procesie inicjacji replikacji u drożdży (Celniker i wsp., 1984).

W komórkach eukariotycznych białka zaangażowane w proces inicjacji replikacji i w proces składania kompleksu przedreplikacyjnego (*ang.* pre-Replication Complex, pre-RC) to głównie ATPazy związane z różnymi aktywnościami komórkowymi (*ang.* ATPase associated with various cellular activities, AAA+), z których wiele archeonowych struktur homologicznych zostało określonych za pomocą krytalografii (Mott i Berger, 2007). U *S. cerevisiae* w procesie inicjacji replikacji biorą udział białka kompleksu rozpoznającego *origin*, ORC, który po raz pierwszy został zidentyfikowany w tym organizmie i oczyszczony przez Bell i Stillmann (Bell i Stillmann, 1992). ORC specyficznie wiąże się do miejsc w sekwencji ACS. Jednak aby rozpoznać i stabilnie związać się do ACS, ORC wymaga obecności ATP (Diffley and Cocker, 1992).

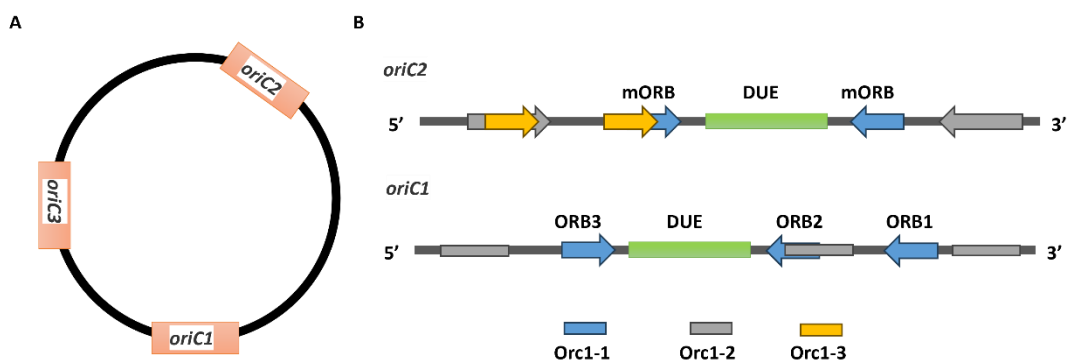


Rycina 2 Struktury nukleoproteinowe poszczególnych kompleksów ORC z dsDNA: (A) *S. cerevisiae* (PDB: 5ZR1) (Li i wsp., 2018), (B) *D. melanogaster* (PDB: 7JK5) (Schmidt i Bleichert, 2020), (C) *H. sapiens*. (PDB: 7JPS) (Jaremko i wsp., 2020). Kolorami oznaczono poszczególne domeny kompleksów białek ORC: żółty – domena I, morski – domena II, pomarańczowy – domena III, fioletowy – domena IV, różowy – domena V, zielony – domena VI.

ORC składa się z sześciu silnie konserwowanych pod względem sekwencji i struktury heterogennych podjednostek białkowych. Białka od Orc1 do Orc5 zawierają dwie domeny, N-terminalną domenę AAA+ i domenę C-terminalną odpowiedzialną za wiązanie Orc1-5 do DNA. W przypadku domen N-terminalnych, tylko domeny podjednostek Orc1, Orc4 i Orc5 zachowały zdolność do wiązania ATP (Costa i Diffley, 2022; Bowers i wsp., 2004). C-terminalny koniec Orc6 jest zadokowany w Orc3, natomiast samo Orc6 jest złożone z powtarzających się tandemowo struktur typu „cyclin-box folds” (Bleichert i wsp., 2015; Miller i wsp., 2019). Dane krystalograficzne oraz dane uzyskane z analiz kriomikroskopii elektronowej (*ang.* cryo-Electron Microscopy, cryo-EM) wykazały, że DNA jest wiązany w centralnej wnęce, tworzonej przez kompleks Orc1-5. Dzieje się tak zarówno u drożdży, u muszki owocówki oraz w komórkach ludzkich (Li i wsp., 2018; Jaremko i wsp., 2020; Schmidt i Bleichert, 2020). ORC oddziałuje z DNA za pośrednictwem takich elementów, jak motyw specyficzny dla inicjatora (*ang.* Initiator-Specific Motif, ISM), znajdujący się w domenie AAA+ białka i domena WH (*ang.* Wigned Helix). W komórkach *S. cerevisiae* domena WH zaangażowana jest w rozpoznawanie par zasad tymina-adenina w sekwencji ACS. U drożdży kompleks Orc1, 4, 5 i 3 tworzy spiralę wokół dwuniciowego DNA (dsDNA) w miejscach ACS i B1. Rozpoznawanie miejsca wiązania odbywa się poprzez reszty umiejscowione w N-terminalnej domenie AAA+ Orc1, w ISM Orc3 i domenie WH Orc4, która po związaniu DNA przybiera strukturę szpilki (*ang.* hearpin) (Hu i wsp., 2020). W przypadku takich organizmów jak *D. melanogaster* i *Schizosaccharomyces pombe* kompleks ORC rozpoznaje i wiąże dsDNA w miejscu *origin* poprzez kanał znajdujący się w strukturze półotwartego pierścienia. Jednocześnie wiążąc dsDNA, ORC wprowadza negatywne skręty w podwójnej helisie DNA, destabilizując ją (Remus i wsp., 2004; Houchens i wsp., 2008). Dane krystalograficzne sugerują, że kompleks ORC jest składany w formie nieaktywnej, po czym ulega zmianom konformacyjnym i umożliwia wiązanie się domeny AAA+ do DNA (Bleichert i wsp., 2015). Następnie rozpoczyna się proces rekrutacji helikazy, podczas którego białko inicjatorowe, Cdc6, zostaje przejściowo związane z ORC, wykorzystując kontrolowany mechanizm wiązania Cdc6 z ATP. Aby stworzyć przestrzeń wymaganą do rekrutacji Cdc6, domena WH podjednostki Orc2 odłącza się od DNA, prowadząc do odtworzenia nowego miejsca aktywnego Orc1>Cdc6 i utworzenia kompleksu heptamerycznego (Schmidt i Bleichert, 2020; Feng i wsp., 2021). Białko Cdc6 zamyka pierścień ORC, zatrzymując dwuniciową strukturę DNA, jednocześnie utrzymując zgiętą konformację DNA.

2.2. Inicjacja replikacji DNA w komórkach archeonów

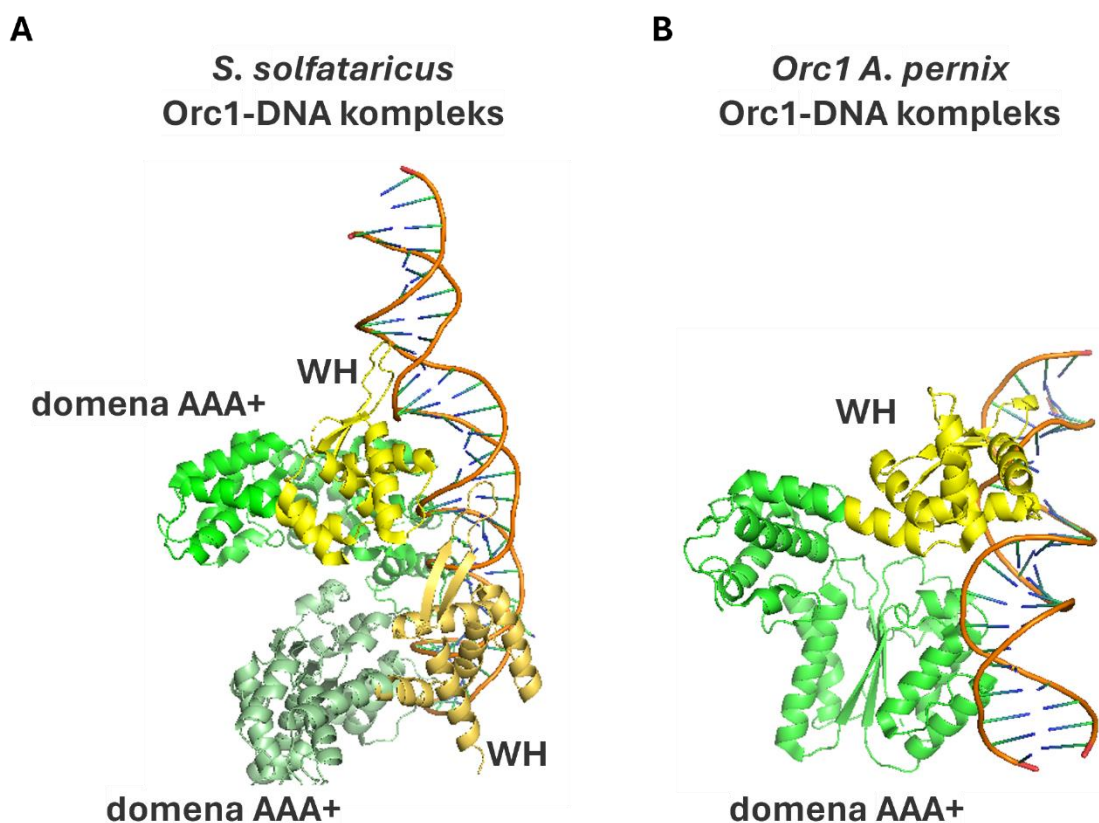
Jednym z podstawowych podobieństw łączącym inicjację replikacji komórek eukariotycznych i archeonowych jest fakt, że ortologi najbardziej kluczowych białek biorących udział w inicjacji replikacji w komórkach eukariotycznych można znaleźć w genomie archeonów. Do rozpoczęcia inicjacji replikacji, archeony używają jednego (tak jak ma to miejsce u bakterii) lub wielu (tak jak jest to w przypadku komórek eukariotycznych) miejsc *origin* (Robinson i Bell, 2005; Hyrien i wsp., 2013; Ausiannikava D. i Allers T., 2017). Inicjacja replikacji rozpoczyna się w regionie bogatym w pary reszt adenina-tymina (*ang.* DNA Unwinding Element, DUE), który jest oflankowany przez konserwowane powtarzające się sekwencje ORB (*ang.* Origin Recognition Boxes) lub miniORB (Rycina 3B) (Robinson i wsp., 2004). Elementy ORB wykazują znaczny stopień różnorodności pod względem liczby, rozmieszczenia i sekwencji, zarówno wśród różnych gatunków archeonów, jak i pomiędzy różnymi *origin* w obrębie jednego gatunku (Norais i wsp., 2007). Na przykład u *Sulfolobus solfataricus* zmapowano trzy chromosomalne miejsca *origin* replikacji: *oriC1*, *oriC2* i *oriC3* (Rycina 3A)(Lunndgren i wsp., 2004).



Rycina 3 Schemat origin replikacji u archeonów na przykładzie *Sulfolobus solfataricus*. (A) Schemat chromosomu zawierającego trzy miejsca *origin* replikacji: *oriC1*, *oriC2* i *oriC3*. (B) Schemat organizacji origin replikacji *oriC2* i *oriC1* z uwzględnieniem miejsc rejonów ORB lub miniORB (mORB) wiązanych przez paralogi białka inicjatorowego Orc1. Miejsca wiązania paralogu inicjatora Orc1-1 – kolor niebieski, miejsca wiązania paralogu inicjatora Orc1-2 – kolor szary, miejsca wiązania paralogu inicjatora Orc1-3 – kolor żółty. Rycina wykonana na podstawie Ekundayo i Bleichert, (2019).

Gen inicjatora replikacji koduje białko homologiczne do białek inicjatorowych Orc1 i Cdc6 występujących w komórkach eukariotycznych (znane również jako białko Orc1/Cdc6), które rozpoznaje sekwencję ORB i wiąże się do niej (Robinson i Bell, 2005). W przypadku gatunków posiadających jedno miejsce *origin*, tylko jedno białko Orc1 jest kodowane w tej sekwencji, np. tak jak u *Pyrococcus furiosus*. W organizmach takich jak *S. solfataricus*, gdzie występuje kilka miejsc *origin*, kodowanych jest wiele paralogów

białka Orc1 (Bell, 2017). Białko Orc1-1 łączy się z kilkoma ORB w *oriC1*. *oriC2* i *oriC3* są wiązane zarówno przez Orc1-1, jak i Orc1-3. Natomiast białko Orc1-2 oddziałuje we wszystkich trzech *origin* replikacji na chromosomie *S. solfataricus*, jednak przypisuje mu się właściwość negatywnego regulowania inicjacji replikacji (Rycina 3B) (Robinson i wsp., 2004; Samson i wsp., 2013; Robinson i wsp., 2007). U *Aeropyrum pernix* oddziaływanie Orc1 z dwuniciowym DNA powoduje destabilizację w rejonie AT, zlokalizowanym między drugim a trzecim miejscem ORB. Uzyskane dane sugerują, że w tym organizmie jest to miejsce „topienia” dsDNA (Grainge i wsp., 2006). Białko Orc1 wiąże dwuniciowy DNA poprzez dwie domeny, domenę WH oraz domenę AAA+. Jak wykazały analizy krystalograficzne, zarówno motyw helisa-skręt-helisa (*ang.* Helix-Turn-Helix, HTH), jak i β -kartki domeny WH wiążą się do bruzdy wielkiej helisy DNA (Rycina 4) (Dueber i wsp., 2007; Gaudier i wsp., 2007). Domena WH wiążąc się do DNA obejmuje pełny skręt helisy (Dueber i wsp., 2007). Domena AAA+ wiąże dsDNA poprzez motyw ISM. Motyw ISM posiada strukturę HTH, w którym za wiązanie szkieletu fosforanowego DNA odpowiada pętla o dodatnim ładunku (Iyer i wsp., 2004; Singleton i wsp., 2004). U Archea domeny AAA+ i WH białka Orc1 szczelnie otaczają fragment dwuniciowego DNA (Sun i wsp., 2012; Costa i wsp., 2013). Struktura białek inicjatorowych podobnych do Orc1/Cdc6 z *A. pernix* i z *S. solfataricus*, różni się konformacyjnie w zależności od tego, czy są związane z DNA, czy nie. W momencie wiązania się do helisy DNA, białko Orc1/Cdc6 formuje konformację w kształcie litery „C” (Sun i wsp., 2012). W trakcie inicjacji replikacji białko Orc1/Cdc6, tak jak szczypce homara, chwyta, zagina i deformuje DNA w miejscu *origin* replikacji (Dueber i wsp., 2007; Gaudier i wsp., 2007, Singleton i wsp., 2004). U archeonów białko Orc1 wiąże również jednoniciowy DNA w rejonie bogatym w pary AT, DUE. Zostało pokazane, że u *A. pernix* jedno z dwóch inicjatorowych białek, Orc1-1 wiąże ssDNA, szczególnie w sekwencjach bogatych w reszty tyminy (Węgrzyn i Konieczny, 2021).



Rycina 4 Struktura białka inicjatorowego Orc1 u (A) *S. solfataricus* (PDB:2QBY) i (B) *A. pernix* (PDB:2V1U). (A) Homodimer białka inicjatorowego Orc1 związanego z dsDNA w miejscu *origin* replikacji u *S. solfataricus*. (B) Monomer białka inicjatorowego Orc1 związanego z dsDNA w miejscu *origin* replikacji u *A. pernix*. Domeny WH oznaczono kolorem żółtym. Domeny AAA+ oznaczono kolorem zielonym. dsDNA oznaczono kolorem pomarańczowym.

2.3. Replikacja DNA w komórkach bakteryjnych

Kolejnymi organizmami wykorzystywanymi do badań nad procesem inicjacji replikacji są bakterie. Pierwszy model inicjacji replikacji bakteryjnego DNA został zaproponowany w 1963 r. Model ten zakładał, że czynnik działający w układzie *trans* wiąże miejsce działające w układzie *cis*, które rozpoczyna proces inicjacji replikacji (Jacob et al., 1963). Od tamtej pory trwają intensywne badania nad strukturą kompleksów nukleoproteinowych formowanych w procesie inicjacji replikacji, do których wykorzystywane są różne modele badawcze, począwszy od chromosomów bakteryjnych, poprzez plazmidy, kończąc na fagach. Badania te przyczyniły się do rozszerzenia wiedzy w zakresie inicjacji replikacji, m.in. o takie informacje jak: identyfikacja nowych miejsc wiązania dla białka inicjatorowego DnaA na *oriC* (Kawakami i wsp., 2005; Rozgaja i wsp., 2011), odkrycie nowych aktywności związanych z wiązaniem ssDNA w rejonie DUE przez bakteryjne białka inicjatorowe (DnaA, RctB) (Ozaki i wsp., 2008; Duderstadt i wsp., 2011; Chatterjee i wsp., 2020), czy powstanie kompleksów nukleoproteinowych

pomiędzy plazmidowymi inicjatorami replikacji a ssDNA DUE (Węgrzyn i wsp., 2014). Przełomowymi informacjami jest coraz większa baza dostępnych struktur białek inicjujących replikację (Orlova i wsp., 2017, Węgrzyn i wsp., 2017). Również w naszej pracy, która jest częścią niniejszej rozprawy doktorskiej została opublikowana struktura białka RepE z plazmidu F (Węgrzyn i wsp., 2023).

Białko DnaA składa się z czterech funkcjonalnych domen (Messer i wsp., 2001) (Rycina 5B). Domena I białka (N-terminalna) jest odpowiedzialna za oligomeryzację białka na DNA. Oligomeryzacja zachodzi poprzez motyw zamka leucynowego (Keyamura i wsp., 2007). Domena I również wiąże inne białka biorące udział w inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego, tj. helikazę DnaB, czy białko DiaA (Sutton i Kaguni, 1997; Weigel i wsp., 1999). Domena II DnaA prawdopodobnie pełni funkcję linkera pomiędzy pozostałymi domenami (Ozaki i Katayama, 2009). Domena III (AAA+) DnaA odpowiada za wiązanie ssDNA w rejonie DUE (Katayama, 2008). Co więcej, podobnie jak domena I, także wiąże helikazę DnaB (Marszałek i Kaguni, 1994) oraz bierze udział w oligomeryzacji białka DnaA na nici DNA (Majka i wsp., 2001). Domena IV, C-terminalna, to domena wiążąca DNA (*ang.* DNA Binding Domain, DBD), która posiada strukturę HTH. Rolą domeny IV jest rozpoznawanie oraz wiązanie sekwencji DnaA-box w *origin* replikacji chromosomu bakteryjnego *oriC* (Roth i Messer, 1995).

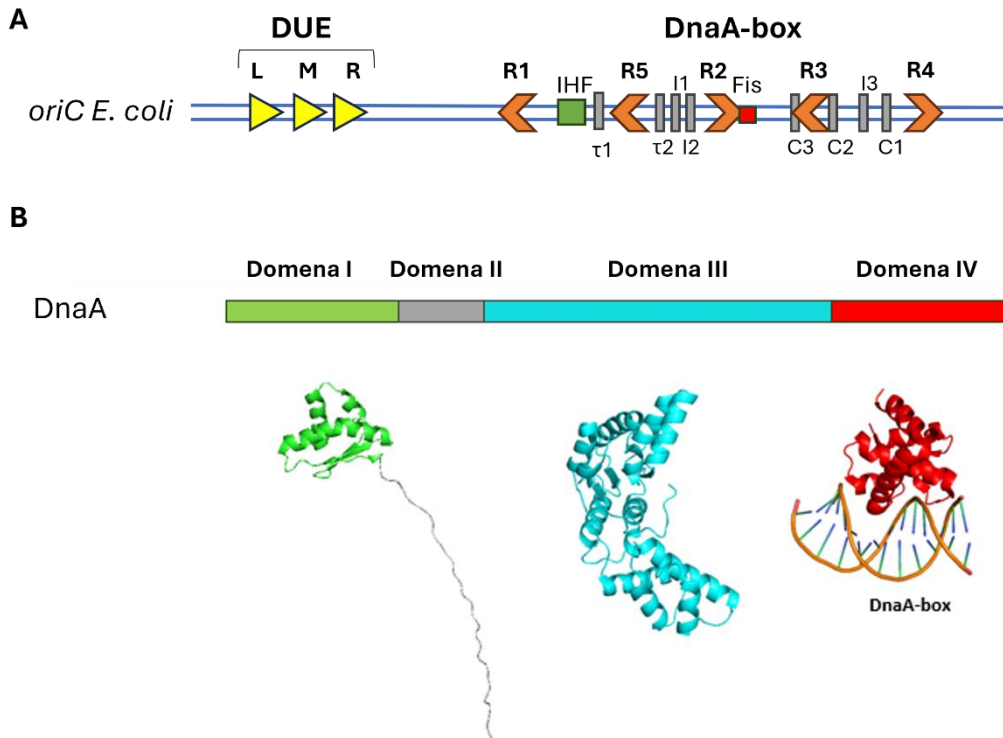
Chromosomalny DNA *E. coli* ma wielkość ok. 4.6 tys. par zasad (pz) i posiada jedno miejsce inicjacji replikacji, *oriC*. Na *oriC* zachodzi składanie dwóch replisomów, które umożliwiają dwukierunkową replikację całego chromosomu bakterii. Inicjacja replikacji w komórkach bakteryjnych występuje tylko raz na cały cykl komórkowy. (Skarstad i Katayama, 2013; Wolański i wsp., 2015; Rober i wsp., 2016).

Inicjacja replikacji bakteryjnego DNA rozpoczyna się od identyfikacji przez białko inicjatorowe, DnaA, specyficznie powtarzających się sekwencji w *origin* replikacji (*oriC*) (Rycina 5A) (Wolanski i wsp., 2014; Rajewska i wsp., 2014). Są to tzw. sekwencje DnaA-box, które stanowią miejsce oligomeryzacji białka na dsDNA, DOR (*ang.* DnaA-Oligomerization Region). Chromosomy bakteryjne posiadają różną liczbę miejsc DnaA-box w *origin* replikacji, które w większości pokrywają się z typem R sekwencji DnaA-box, jaki występuje u *E. coli* [5'TTATNCACA3']. Obecnie zdefiniowanych jest 12 miejsc DnaA-box w *oriC E. coli*, do których białko DnaA wiąże się z różnym powinowactwem (Rycina 5A) (Rozgaja i wsp., 2011). W sekwencji *oriC* wyróżnia się trzy miejsca DnaA-box, które wiążą białko DnaA z wysokim powinowactwem i należą

do nich sekwencje: R1, R2 i R4. Pozostałe DnaA-box słabiej oddziałują z białkiem DnaA (Ekundayo i Bleichard, 2019) (Rycina 5). Związanie pięciu sekwencji DnaA-box w rejonie DOR *oriC* (od lewej R1, R5, τ 2, I1 i I2) przez białko DnaA jest wystarczające do rozplecenia podwójnej helisy w rejonie DUE (Ozaki i Katayama, 2012). Pozostałe sekwencje DnaA-box (z wyjątkiem R3) posiadają przeciwną orientację do wyżej wymienionych sekwencji. Podobną orientację miejsc DnaA-box zidentyfikowano także na chromosomie I *Vibrio cholerae* (*oriC1*), u *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa* (Wolanski i wsp, 2015).

Jak wspomniałam, oligomeryzacja białka DnaA w *oriC* w rejonie DOR, powoduje destabilizację dsDNA DUE, prowadząc do powstania dwóch łańcuchów jednoniciowego DNA. DUE jest szczególnym fragmentem *oriC*, który poprzez dużą zawartość par AT ma obniżoną stabilność, dzięki czemu podwójna helisa DNA w tym rejonie łatwiej ulega rozpleceniu (Leonard i Grimwade, 2015; Katayama i wsp., 2017). Rejon AT *oriC E. coli* zawiera trzy 13-nukleotydowe sekwencje ssDNA: lewą (L), środkową (M) i prawą (P) (Rycina 5A) (Bramhill i Kornberg, 1988). Między innymi dane krystalograficzne wskazują, że białko DnaA specyficznie wiąże także ssDNA w rejonie DUE za pomocą III domeny białka. Te same dane wykazały, że DnaA tworzy helikalną strukturę na ssDNA znajdującym się przy najbliższym DnaA-box. Stabilne wiązanie jednoniciowego DUE (ssDUE) wymaga obecności regionu obejmującego co najmniej sekwencje M i R. Do wiązania białka DnaA w *oriC* wymagane są sekwencje 5'-TTGT-3' i 5'-TTATT-3' (Ozaki i wsp., 2008). Ponadto na chromosomie bakterii *B. subtilis* zidentyfikowano 6 dodatkowych sekwencji ssDNA, które są rozpoznawane i wiązane przez III domenę białka DnaA. Są to kilkakrotnie powtórzone trzy-nukleotydowe sekwencje [5'-TA^A/G-3'] nazwane DnaA-trio. DnaA-trio są zlokalizowane przy DnaA-box znajdującym się najbliżej rejonu DUE. Sekwencje te są odpowiedzialne za stabilizację wiązania się białka DnaA z ssDNA (Richardson i wsp., 2016). Sekwencje DnaA-trio zostały również zidentyfikowane w innych bakteriach (Jaworski i wsp., 2021; Pellicciari i wsp, 2021). W *E. coli* trzy sekwencje DnaA-trio częściowo pokrywają się z prawą (P) sekwencją rejonu DUE (Rycina 5A), 5'-TTATT-3', która jest wiązana przez białko DnaA, jednak ich rola w rozwijaniu DNA w rejonie DUE nie została jeszcze dobrze scharakteryzowana (Katayama i wsp., 2017). Również w *oriC Helicobacter pylori* zostały zidentyfikowane sekwencje DnaA-trio. Badania wykazały, że w przypadku *H. pylori*, DnaA-trio odgrywają kluczową rolę w rozwijaniu dsDNA w rejonie DUE i umożliwiają prawidłową

oligomeryzację białka DnaA na ssDNA. Co więcej, wykazano również, że tworzenie się oligomeru DnaA na ssDNA jest stabilizowane poprzez oddziaływanie białka z sekwencją DnaA-box ts1. Powyższe analizy sugerują, że białko DnaA oddziałuje zarówno z ssDNA, jak i dsDNA po rozwinięciu DNA rejonu DUE (Jaworski i wsp., 2021).



Rycina 5 Schemat *origin* replikacji bakteryjnego chromosomu *oriC* i struktury domen białka DnaA z bakterii *E. coli*. (A) W *oriC* bakterii *E. coli* wyróżnia się 12 miejsc wiązania inicjatorowego białka DnaA, DnaA-box. DnaA-box są wiązane przez białko DnaA z różnym powinowactwem. Wiązanie białka DnaA rozpoczyna się od wiązania DnaA-box o wysokim powinowactwie (R1, R5, τ2, I1 i I2), a następnie wiązane są DnaA-box o mniejszym powinowactwie. *oriC E. coli* posiada także rejon DUE składający się z powtórzonych 13-merowych sekwencji, bogatych w pary AT, w których dochodzi do rozplecenia dsDNA podczas inicjacji replikacji chromosomowego DNA. Innymi elementami *oriC* są sekwencje wiązania białka IHF (*ang.* Integration Host Factor) oraz miejsce wiązania białka Fis (Schemat wykonany na podstawie Wegrzyn i wsp., 2016). (B) Schemat oraz struktury domen białka DnaA. Krystalograficzną strukturę I i II domeny białka DnaA oznaczono kolorem zielono-szarym (PDB:2E0G); Krystalograficzną strukturę domeny III białka DnaA oznaczono kolorem błękitnym (PDB:2Z4S); Krystalograficzną strukturę domeny IV białka DnaA związanej do DnaA-box oznaczono kolorem czerwonym (PDB:1J1V) (Rycina zrobiona na podstawie Katayama, 2008)

Tak jak wspomniałam, wiązanie się białka DnaA do dsDNA powoduje otwieranie i rozdzielenie przeciwległych nici podwójnej helisy DNA w rejonie DUE. Powstałe fragmenty ssDNA są substratem do ładowania i aktywowania kolejnych białek biorących udział w inicjacji i też samej replikacji DNA (Wolanski i wsp., 2014; Rajewska i wsp., 2014). Do białek tych należą między innymi helikazy, które są umiejscawiane na dwóch przeciwległych jednoniciowych odcinkach DNA w rejonie DUE z przodu widełek replikacyjnych. W *E. coli* rekrutacja helikazy na ssDNA odbywa się przy asyście białka

DnaC. Prawidłowo umiejscowione na ssDNA helikazy odpowiadają za dwukierunkowe rozplatanie podwójnej helisy DNA, co umożliwia syntezę nowej cząsteczki DNA. Nowa cząsteczka DNA jest syntetyzowana na matrycy ssDNA przez holoenzym polimerazy DNA (Bleichert i wsp., 2017; Hayashi i wsp., 2020). Jednym z kluczowych pytań jest w jaki sposób dochodzi do ładowania i aktywowania helikazy na ssDNA DUE?

Bliskość wielu sekwencji DnaA-box umożliwia interakcję poszczególnych protomerów białka DnaA, prowadząc do tworzenia filamentów wzdłuż DNA. Wiadomym jest, że cząsteczki białka DnaA oligomeryzują na DNA za pomocą domeny III każdego protomeru. DnaA związane z ATP oddziałuje z motywem palca Arg285 flankującym poprzedni protomer białka (Dudertadt i wsp., 2010). Złożoność strukturalna kompleksu nukleoproteinowego w *origin* replikacji chromosomu bakteryjnego wynika również z interakcji białka DnaA z ssDNA DUE. Obecnie rozważania dotyczą zarówno wiązania DnaA z dsDNA, ssDNA rejonu DUE, jak i DnaA-trio lub też innymi motywami występującymi w *oriC*.

Aktualnie proponowane są dwa najbardziej prawdopodobne modele opisujące sposób wiązania cząsteczek białka DnaA w *oriC* oraz strukturalne ułożenie kompleksu nukleoproteinowego w trakcie procesu inicjacji replikacji. Jeden z mechanizmów, w którym białko DnaA tworzy kompleks z *origin* replikacji DNA, jest określany jako „Two-state model” (Erzberg i wsp., 2006). Model ten zakłada, że cząsteczki białka DnaA wiążą miejsca DnaA-box tworząc filament wzdłuż dsDNA, zwiększając destabilizację dupletu DNA w rejonie bogatym w pary AT. Następnie po destabilizacji dsDNA w rejonie DUE kolejne protomery białka DnaA poprzez domenę III białka oddziałują z powstałym ssDNA DUE *oriC*, wydłużając tworzący się filament (Duderstadt i wsp., 2010). Model ten został poniekąd potwierdzony danymi strukturalnymi uzyskanymi dla skróconego białka DnaA pochodzącego od *Aquifex aeolicus* (AaDnaA). Dane te wykazały tworzenie prawoskrętnej helisy w wyniku specyficznych interakcji białko-białko poprzez domeny III i IV białka DnaA (Erzberger i wsp., 2006). Dodatkowo na otrzymaną strukturę AaDnaA nałożono strukturę IV domeny białka DnaA z *E. coli* (EcDnaA) w kompleksie z dsDNA, pokazując teoretyczne ułożenie filamentu DnaA na dsDNA (Duderstadt i wsp., 2010). Należy jednak podkreślić, że w analizie nie uwzględniono pełnej długości białka AaDnaA, a jedynie wariant składający się z domeny III i IV. Znaczenie formowania się filamentów cząsteczek DnaA na dsDNA zostały również potwierdzone przez analizy biochemiczne (Duderstadt i in., 2010). Kolejna analiza struktury krystalograficznej dla

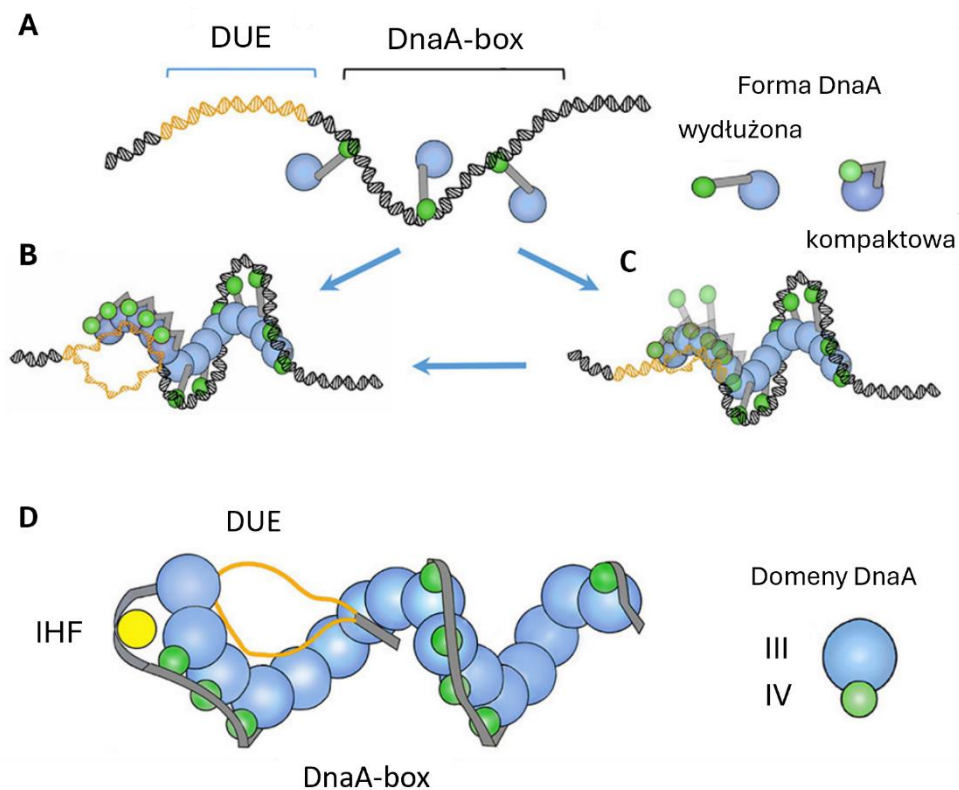
skróconego AaDnaA wykazała, że cztery protomery białka DnaA są ułożone spiralnie wzdłuż ssDNA (Ozaki i wsp., 2008; Duderstadt i wsp., 2011). Natomiast dane biochemiczne potwierdzają, że reszty znajdujące się w domenie III białka DnaA są ważne dla oddziaływania DnaA z ssDNA DUE (Ozaki i wsp., 2008; Duderstadt i wsp., 2010). W opisywanym modelu proponuje się, że struktura DnaA jest inna w oligomerze związanym z sekwencjami DnaA-box i inna w oligomerze formującym się na ssDNA DUE. Model ten zakłada, że cząsteczka białka DnaA związana z ATP (DnaA-ATP) za pośrednictwem IV domeny wiąże dsDNA w *oriC*. Na tym etapie domena IV białka DnaA przyjmuje konformację bardziej rozwiniętą. Taki układ skutkuje skutecznym wiązaniem przez inicjator sekwencji DnaA-box zarówno o wysokim, jak i niskim powinowactwie, poprzez domenę IV białka (Duderstadt i in., 2010). Jako pierwsze wiązaniu z białkiem DnaA ulegają miejsca o wysokim powinowactwie (Rycina 6A), a następnie sekwencje DnaA-box o niższym powinowactwie. Stopniowe otwieranie rejonu DUE powoduje przejście IV domeny białka DnaA z formy rozwiniętej do bardziej kompaktowej, co z kolei uniemożliwia wiązanie się kolejnych protomerów białka DnaA do dsDNA (Rycina 6C). W wyniku formowania bardziej kompaktowej struktury białka DnaA, domena III tego białka przybliży się do rejonu DUE, a następnie wiąże ssDNA. Przybranie bardziej kompaktowej formy białka DnaA umożliwia interakcję między sąsiadującymi protomerami białka, które tworzą filament wzdłuż ssDNA DUE i stabilizują otwartą strukturę rejonu DUE (Rycina 6B) (Duderstadt i wsp., 2010; Jha i wsp., 2016). Sugerowane zmiany konformacyjne w domenach białka DnaA pozwalają wyjaśnić wiązanie DnaA z dsDNA, ssDNA i interakcję z sąsiadującymi protomerami, jednak nadal brakuje danych strukturalnych potwierdzających te założenia.

W *origin* replikacji *B. subtilis* zidentyfikowano tzw. Podstawowy System Rozwijania (ang. Basal Unwinding System, BUS) DNA. W skład systemu BUS *B. subtilis* wchodzi 6 i 7 sekwencja DnaA-box, krótka sekwencja bogata w pary GC oraz powtarzające się trójnukleotydowe sekwencje ssDNA, DnaA-trio. Jak wykazano, system BUS jest obecny i konserwowany u bakterii (Richardson i wsp., 2016; Pellicciari i wsp., 2021). Pierwotnie analizy wykazały, że system BUS promuje tworzenie specyficznego oligomeru białka DnaA w *oriC*, który rozciąga się wzdłuż sekwencji DnaA-box oraz, że poprzez ten system cząsteczka białka DnaA może być bezpośrednio przeniesiona z DnaA-box na sekwencje DnaA-trio (Pellicciari i wsp., 2021). Po zakończeniu prowadzenia przeze mnie prac eksperymentalnych do niniejszej rozprawy doktorskiej, zostały również opublikowane

dane pochodzące z analiz biochemicznych oraz struktura uzyskana z użyciem kriomikroskopii elektronowej wykazujące, że cząsteczki białka DnaA tworzą ciągły oligomer, jednak angażując przy tym zarówno dsDNA sekwencji DnaA-box, jak i ssDNA sekwencji DnaA-trio (Pellicciari i wsp., 2023). Analizy te wykazały także, że sąsiadujące protomery białka DnaA tworzą przestrzeń, w której wychwytywane i wiązane są zasady nukleotydowe pochodzące od sekwencji DnaA-trio (Pellicciari i wsp., 2023). Związanie przez białko powtarzających się sekwencji DnaA-trio umożliwia otwieranie *origin* replikacji w rejonie DUE.

Mechanizm, w którym jeden protomer białka DnaA może wiązać w tym samym czasie zarówno dsDNA, jak i ssDNA został zaproponowany w modelu określanym jako „loop-back model”. Według założeń tego modelu cząsteczki białka DnaA początkowo wiążą się do miejsc DnaA-box, a następnie te same protomery białka, będąc związane z dsDNA, rekrutują i oddziałują z ssDNA rejonu DUE (Rycina 6D) (Ozaki i Katayama, 2012). Analizy biochemiczne wykazały kluczowy udział wiązania się DnaA do DnaA-box R1 i R5 w rekrutacji ssDNA (Ozaki i Katayama, 2012; Sakiyama i wsp., 2017). W modelu tym również sugeruje się oddziaływanie między protomerami białka DnaA poprzez domenę III białka. Jednak wyklucza się oddziaływanie poprzez domenę III DnaA związanych do DnaA-box R2 z DnaA związanych do DnaA-box I2 i C3 (Rozgaja i wsp., 2011; Shimizu i wsp., 2016), pomiędzy którymi wiązanie może nastąpić poprzez domenę I cząsteczek białka DnaA (Katayama i wsp., 2017). Dodatkowo model ten przedstawia zaangażowanie białek związanych z nukleoidem (*ang.* Nucleoid-Associated Protein, NAP), do których należą takie białka jak IHF, czy HU. W *oriC* bakterii *E. coli* białko IHF wiąże się do specyficznego dla IHF regionu (*ang.* IHF-Binding Region, IBR), który jest zlokalizowany pomiędzy DnaA-box R1 a R5. Wiązanie to może mieć wpływ na zbliżenie do siebie protomerów białka DnaA i ich domeny III do ssDNA DUE. Sekwencja IBR wiążąca IHF występuje tylko u niektórych gatunków bakterii, jednak inne białko NAP, białko HU (*ang.* Histone-like proteins) powszechnie występuje w bakteriach. Wykazano, że u *B. subtilis* homolog HU (białko HBSu) jest wymagany do inicjacji replikacji chromosomu (Karaboja i Wang, 2022), a w *E. coli*, pomimo niespecyficznego wiązania względem sekwencji, HU może zastąpić IHF podczas rozwijania *oriC in vitro* oraz *in vivo* (Hwang i Kornberg, 1992; Ryan i wsp., 2002; Chodavarapu i wsp., 2008). Podczas wiązania białek NAP, dochodzi do gwałtownego wygięcia fragmentu DNA znajdującego się pomiędzy sekwencjami DnaA-box a rejonem DUE, co w konsekwencji prowadzi do

jeszcze większej destabilizacji rejonu DUE, a to z kolei ma przełożenie na lepszą dostępność ssDNA rejonu DUE do wiązania przez DnaA i stabilne utrzymanie struktury kompleksu otwartego. Model „loop-back” zakłada, że oligomer białka DnaA związany z dsDNA między miejscami wiązania R1-I2, wiąże jednocześnie ssDNA DUE za pośrednictwem reszt aminokwasowych Val211 i Arg245 (Sugiyama i wsp., 2019). Ostatnie dane wykazały, że w przeciwieństwie do IHF, wiązanie HU i zaginanie *oriC* opiera się na wcześniejszym wiązaniu DnaA-box R1 i R5 przez DnaA ze względu na brak specyficzności sekwencji (Yoshida i wsp., 2023). Orientacja tych dwóch DnaA-box może ułatwiać początkowe zagięcie w *origin* replikacji poprzez utworzenie kompleksu R1/R5-DnaA. To z kolei może przekładać się na łatwiejsze wiązanie HU między tymi sekwencjami DnaA-box, ponieważ HU ma większe powinowactwo do zgiętej cząsteczki DNA (Kamashev i wsp., 2017; Yoshida i wsp., 2023). Inicjacja replikacji przedstawiona przez „loop-back model” obecnie ma poparcie również w badaniach dla innych inicjatorów replikacji, prócz białka DnaA. Dla inicjatora replikacji z bakterii *Vibrio cholerae*, białka RctB, wykazano, że oddziałuje z dwoma typami DNA w sposób specyficzny (Chatterjee i wsp., 2020). Również po zakończeniu prowadzenia przeze mnie prac eksperymentalnych ukazały się publikacje, wspierające model „loop-back”, np. praca Pellicciari i wsp. z 2023 r. oraz praca Węgrzyn i wsp. z 2023, która zawiera wyniki przedstawianego doktoratu.



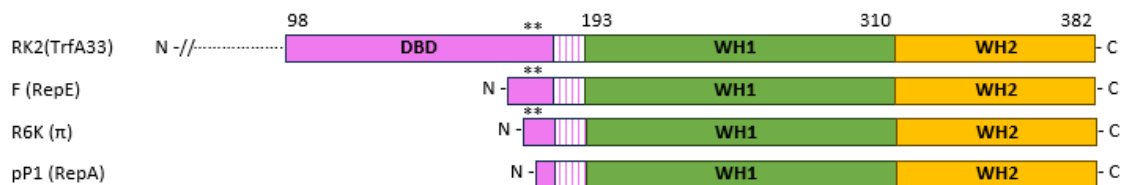
Rycina 6 Modele wiązania białka DnaA na *oriC*. (A-C) „Two-state” model inicjacji replikacji przez DnaA. (A) Domena IV białka DnaA w stanie otwartym wiąże dsDNA w miejscach z wysokim powinowactwem (górny panel). (C) DnaA wiąże miejsca o mniejszym powinowactwie, powodując częściowe otwarcie DUE i przejście domeny IV białka DnaA ze stanu otwartego do zamkniętego (prawy dolny panel). (B) Domena III białka DnaA, które obecnie jest w postaci kompaktowej, wiąże ssDNA DUE stabilizując jego otwarcie (lewy dolny panel) (D) Schemat otwierania origin replikacji oparty na modelu „loop-back”. DnaA oligomeryzuje przez III domenę każdego protomeru. IHF powoduje wygięcie DNA. Następuje otwarcie DUE. DnaA związane z DnaA-box jednocześnie oddziałuje z dsDNA w DnaA-box i ssDNA rejonu DUE. (Jha i wsp., 2016).

2.4. Inicjacja replikacji plazmidowego DNA

Plazmidy to najprostsze systemy modelowe, z wykorzystaniem których bada się między innymi proces inicjacji replikacji. Badania nad plazmidowymi inicjatorami replikacji, białkami Rep, pozwoliły lepiej zrozumieć mechanizmy kryjące się za inicjacją replikacji występującą w bakterjach Gram-ujemnych. Analiza procesu replikacji we wszystkich organizmach, pozwala na obserwację pewnych analogii pomiędzy różnymi modelami badawczymi, chociażby pomiędzy inicjacją replikacji chromosomowego DNA *Vibrio cholerae* i DNA plazmidów iteronowych. W przypadku plazmidów iteronowych zbieżności te są zauważalne szczególnie w strukturze białek inicjatorowych oraz miejsc wiązania się białek inicjatorowych w *origin* replikacji plazmidowego DNA (Konieczny i wsp., 2014).

2.4.1. Struktura plazmidowych białek inicjatorowych

Tak samo jak ma to miejsce w przypadku białka inicjującego replikację na chromosomie bakteryjnym, DnaA, tak i w przypadku plazmidowych białek Rep, wiązanie z DNA odbywa się za pośrednictwem określonych motywów strukturalnych (Luscombe i wsp., 2000). Przeważnie są to motywy typu helisa-skręt-helisa, HTH oraz ich warianty, uskrzydłone HTH, czyli motyw WH (Giraldo, 2003). Do tej pory poznano struktury kilku białek Rep, m.in.: białka π z plazmidu R6K, białka RepA z plazmidu PS10, białka RepE z plazmidu F. Przy użyciu analiz *in silico* wygenerowano również model strukturalny skróconego wariantu białka TrfA z plazmidu RK2 (TrfA-33) (Rycina 7 i Rycina 8) (Węgrzyn, Zabrocka i wsp., 2021; Nakamura i wsp., 2001; Giraldo, 2003; Swan i wsp., 2006). Wspólnym mianownikiem strukturalnym ww. białek jest obecność dwóch domen WH.



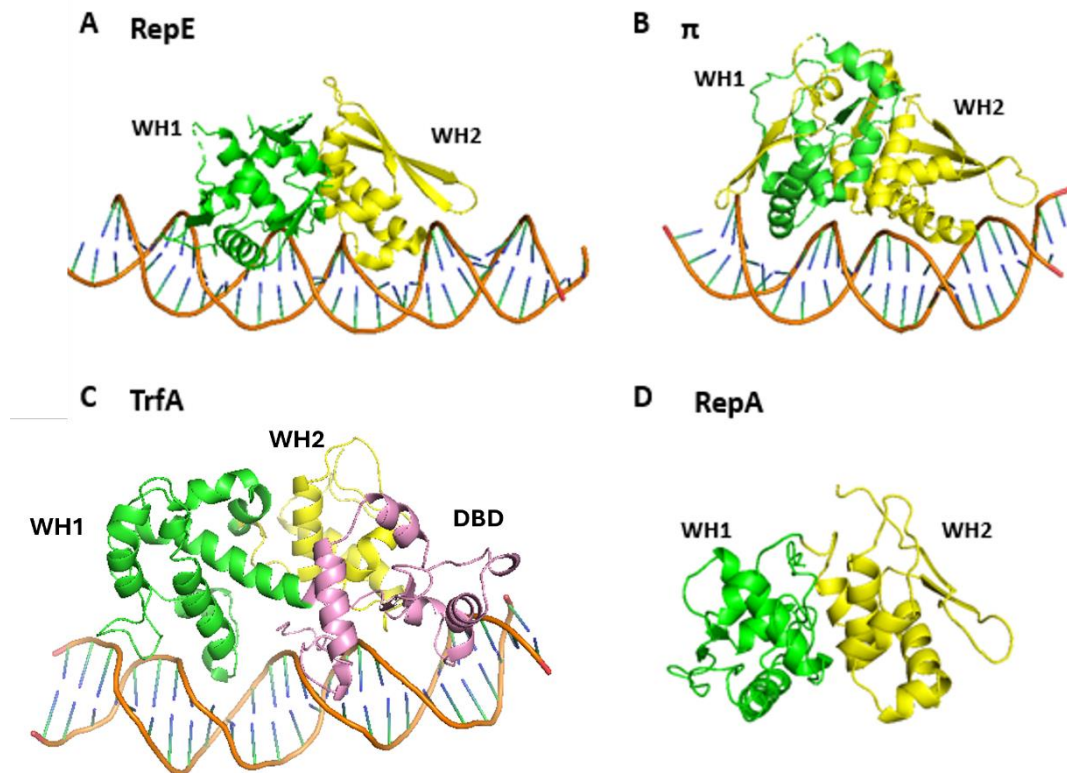
Rycina 7 Porównanie organizacji domen WH plazmidowych białek inicjatorowych. Kolorami wyodrębniono poszczególne konserwowane sekwencje. Domeny WH - domeny uskrzydłonej helisy zaznaczono następująco: WH1 na zielono, WH2 na żółto i domniemaną domenę DBD na różowo. Konserwowany blok hydrofobowy jest oznaczony paskami (w TrfA33 176–192 aa). Obecność dodatnio naładowanego fragmentu jest oznaczona gwiazdkami (**) (Rycina zrobiona w oparciu o Węgrzyn, Zabrocka i wsp., 2021).

Obie domeny WH białek Rep, N-terminalna domena WH1, i C-terminalna domena WH2, pełnią kluczową rolę w wiązaniu białek Rep do dsDNA. Ponadto domena WH1 pełni rolę w procesie oddziaływania pomiędzy monomerami białek Rep i ich dimeryzacji. Dimeryzacja jest możliwa dzięki obecności motywu przypominającego motyw zamka leucynowego utworzonego przez β -kardki pomiędzy monomerami białek Rep, na przykład jak ma to miejsce pomiędzy motywami białka RepA z plazmidu pPS10, czy białka RepE plazmidu F (Giraldo i wsp., 1998; Komoti i wsp., 1999). Za wiązanie białka RepE do dsDNA odpowiadają reszta 251 oraz trzy reszty aminokwasowe 205/206/207 (Kline, 1985). Dimery białek Rep stanowią stabilną jednakże nieaktywną replikacyjnie formę. Pomimo braku aktywności replikacyjnej, pełnią inną bardzo ważną regulacyjną rolę. Dimery białek Rep są odpowiedzialne za proces autorepresji transkrypcji genu *rep*. Pozwala to kontrolować ilość białka Rep w komórce i zapobiega nadmiernej częstotliwości replikacji plazmidów iteronowych. Jest to możliwe dzięki wiązaniu się

dimerycznej formy białka Rep (RepE, RepA, π) do odwróconych sekwencji iteronowych, IR (*ang.* Inverted Repeats) znajdujących się w pobliżu promotora transkrypcji genu *rep* (Ishiai i wsp., 1994; Garcia de Viedma i wsp., 1994; Ingmer i Cohen, 1993; York i Filutowicz, 1993). Dimery białka wiążąc sekwencję operatora powodują zgięcie cząsteczki DNA, przez co sekwencje IR nachodzą na promotor genu *rep*, tym samym hamując transkrypcję tego genu (Giraldo i wsp., 2003; Nakamura i wsp., 2007). Drugim mechanizmem kontrolującym proces replikacji plazmidowego DNA poprzez inhibicję inicjacji replikacji, jest zjawisko „handcuffing”. Polega na formowaniu struktury, w której dimer białka Rep łączy ze sobą dwa rejonu *origin* replikacji zlokalizowane na dwóch oddzielnych cząsteczkach plazmidowego DNA (Urh i wsp., 1998; Bury i wsp., 2017; Konieczny i wsp., 2014). Zachodzące zmiany sferyczne nie pozwalają na powstanie ssDNA w rejonach DUE na obu cząsteczkach DNA, tym samym hamując kolejny cykl replikacji (Park i wsp., 2001; Zzaman i Bastia, 2005). Z kolei aktywne replikacyjnie są monomeryczne formy białek Rep. Jedynie monomery białek Rep mogą wiązać sekwencje iteronowe i pełnić funkcję aktywatorów inicjacji replikacji (Ishiai i wsp., 1994; Kruger i wsp., 2001; Toukdarian i wsp., 1996; Wickner i wsp., 1991). Aby było to możliwe, musi dojść do przekształcenia dimerycznej cząsteczki białka Rep do dwóch cząsteczek monomerycznych. Proces ten może zachodzić w sposób spontaniczny, np. przy niskim stężeniu białka w komórce, jak ma to miejsce w przypadku białka RepA plazmidu pSC101 lub białka π plazmidu R6K (Ingmer i wsp., 1995; Chatteraj i wsp., 1996). Dimer białka Rep może także ulec przekształceniu do formy monomerów w obecności cząsteczki DNA, posiadającej wolne miejsca wiązania dla białka. Dzieje się tak np. dla białka RepA plazmidu pPS10 (Diaz-Lopez i wsp., 2003). Trzecią możliwością przekształcenia białek Rep z nieaktywnych dimerów w aktywne replikacyjnie monomery jest działanie tzw. białek opiekuńczych (Kawaski i wsp., 1990; Sozhamannan i Chatteraj, 1993; Konieczny i Liberek, 2002; Nakamura i wsp., 2007;).

Obecność motywu HTH w domenie WH2 monomerycznych form białek Rep, jest głównym determinantem wiązania białek Rep do powtarzających się sekwencji iteronowych, co zostało opisane, m.in. dla białka RepE plazmidu F oraz białka RepA plazmidu pPS10 (Garcia de Viedma i wsp., 1995; Matsunaga i wsp., 1995). Oddziaływanie domen WH monomerów białek Rep z sekwencjami iteronowymi powoduje wygięcie cząsteczki DNA (Giraldo i wsp., 1998; Diaz-Lopez i wsp., 2006).

Domena WH2 odpowiada za wiązanie końca 3' iteronu w bruzdzie większej, natomiast domena WH1 końca 5' iteronu w bruzdzie mniejszej (Giraldo i wsp., 1998).



Rycina 8 Struktury krystalograficzne i modele plazmidowych białek Rep. (A) Struktura krystalograficzna uzyskana dla białka RepE z plazmidu F związanego z dsDNA (PDB:7UXY). (B) Struktura krystalograficzna białka π z plazmidu R6K związanego z dsDNA (PDB:2NRA). (C) Model struktury białka TrfA z plazmidu RK2 (Wegrzyn, Zabrocka, 2021) i (D) białka RepA z plazmidu P1 (Diaz-Lopez i wsp., 2003). Kolorami zaznaczono domeny białek Rep: domena DBD - kolor różowy, domena WH1 - kolor zielony, domena WH2 - kolor żółty.

Jak dotąd nie uzyskano struktury krystalograficznej kompleksów nukleoproteinowych zarówno dla białka TrfA z plazmidu RK2, jak i dla białka RepA z bakteriofaga P1. Pomimo to, przeprowadzone analizy *in silico* przewidywania struktury sugerują, że białko RepA jest strukturalnie homologiczne do białka RepE plazmidu F (Rycina 8A i 8D), nawet biorąc pod uwagę różnice w sekwencjach obu białek. Białko RepA, tak jak białko RepE wiąże DNA za pośrednictwem dwóch domen WH, N-terminalnej (WH1) oraz C-terminalnej (WH2) (Sharma i wsp., 2004). Podobnie, helisy obu domen WH białka TrfA wiążą bruzdę większą szkieletu fosforanowego DNA (Pierchod i wsp., 2009). Co więcej w domenach WH1 i WH2 białka TrfA zidentyfikowano aminokwasy, których punktowe mutacje wpływają na zdolność wiązania białka do dsDNA (Lin i Helinski, 1994; Cereghino i wsp., 1994; Pierchod i wsp., 2009). Ostatnie doniesienia literaturowe wykazują, że białko TrfA posiada trzecią

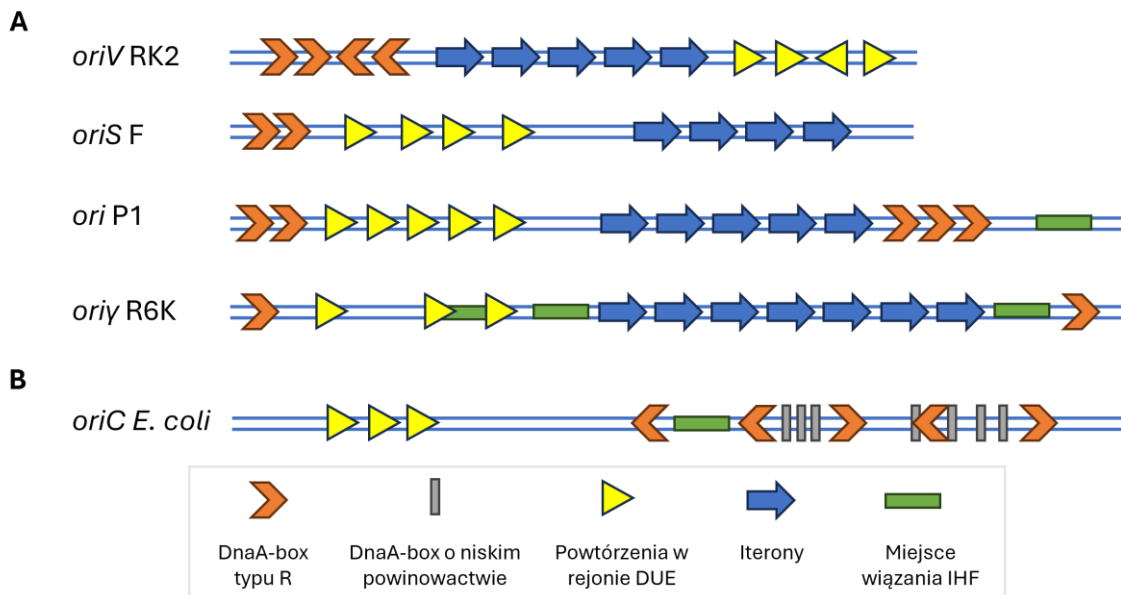
domenę, która również odgrywa kluczową rolę w wiązaniu DNA. Umiejscowiona jest pomiędzy 98 a 190 resztą aminokwasową. Na podstawie tych informacji zaproponowano nową klasę białek Rep, tzw. rodzinę białek TrfA-podobnych (*ang.* TrfA-like family). Wszystkie tego typu białka Rep, oprócz wspomnianych domen WH, posiadają jeszcze trzecią domenę wiążącą DNA, domenę DBD (Rycina 8C) (Węgrzyn, Zabrocka i wsp., 2021).

Obecność domen WH odpowiedzialnych za wiązanie DNA jest cechą wspólną dla plazmidowych białek inicjatorowych (Rycina 8). Domeny WH zostały również zidentyfikowane w białkach inicjujących replikację w komórkach archeonów i eukariontów. To co jednak odróżnia plazmidowe białka Rep, to brak domeny AAA+, która jest charakterystyczna dla bakteryjnego inicjatora DnaA (Giraldo, 2003). Pomimo, że białka Rep nie posiadają domeny AAA+, to na podstawie badań biochemicznych i spektroskopowych wykazano, że podobnie jak inicjatory replikacji komórek archeonowych, czy eukariotycznych, białko RepA plazmidu pPS10 pełni kluczową rolę w wiązaniu dsDNA i destabilizacji oraz topnieniu dsDNA w rejonie DUE plazmidowego DNA (Liu i wsp., 2000; Giraldo, 2003).

2.4.2. Struktura plazmidowego *origin* replikacji

Origin plazmidów iteronowych zawierają charakterystyczne elementy, w tym iterony, sekwencje DnaA-box i region bogaty w pary AT (DUE). Iterony, jak już wspomniałam, są to ukierunkowane powtórzone sekwencje rozpoznawane i wiązane przez białka Rep, które odgrywają kluczową rolę w procesie inicjacji replikacji plazmidowego DNA (Rycina 9A). Ponadto iterony biorą także udział w kontrolowaniu ilości kopii danego plazmidu w komórce. Iterony są krótkimi sekwencjami posiadającymi od 17 (w plazmidzie RK2), poprzez 19 (w plazmidzie F i P1) do 22 (w plazmidzie R6K) par zasad. Liczba iteronów w *origin* replikacji różni się w zależności od plazmidu. W plazmidzie RK2 i P1 zidentyfikowano pięć iteronów, w plazmidzie F cztery iterony, natomiast w plazmidzie R6K siedem (Stalker i wsp., 1981; Abeles i wsp., 1984; Murotsu i wsp., 1981; Filutowicz i wsp., 1987). Iterony są wiązane przez monomeryczne warianty białek Rep, co pozwala na rozpoczęcie procesu inicjacji replikacji (Wickner i wsp., 1991; Ishiai i wsp., 1994; Toukdarian i wsp., 1996; Kruger i wsp., 2001). Punktowe mutacje w sekwencjach iteronowych uniemożliwiają wiązanie się do nich białek Rep. Zostało to pokazane na przykładzie plazmidu R6K i P1 (McEachern i wsp., 1985; Brendler i wsp., 1997). Negatywne efekty na replikację plazmidowego DNA mają również zmiany

wprowadzane w sekwencjach znajdujących się pomiędzy iteronami, co zostało pokazane na przykładnie plazmidów P1 (Brendler i wsp., 1997), czy RK2 (Perri i Helinski, 1993). Podobnie, jeżeli pomiędzy blokami DnaA-box a sekwencją iteronową plazmidu RK2 zostanie wprowadzona dodatkowa sekwencja, spowoduje to inaktywację aktywności replikacyjnej tego miejsca (Doran i wsp., 1998).



Rycina 9 Schemat (A) origin replikacji plazmidowego DNA oraz (B) origin chromosomu *E. coli*. (A) Schemat origin replikacji plazmidów iteronowych z wyszczególnionymi sekwencjami iteronowymi i odwróconymi sekwencjami, IR (niebieskie strzałki), rejonem bogatym w parę AT, DUE (żółte strzałki), miejscem wiązania bakteryjnego inicjatora DnaA, DnaA-box (pomarańczowe strzałki) oraz rejonem bogatym w parę GC; (B) origin replikacji chromosomu bakterii *E. coli*, *oriC*. Dodatkowo zaznaczono miejsce wiązania białka IHF (zielony kwadrat), miejsce wiązania białka Fis (czerwony kwadrat) (Rycina stworzona w oparciu o Konieczny i wsp., 2014; Węgrzyn i wsp., 2016).

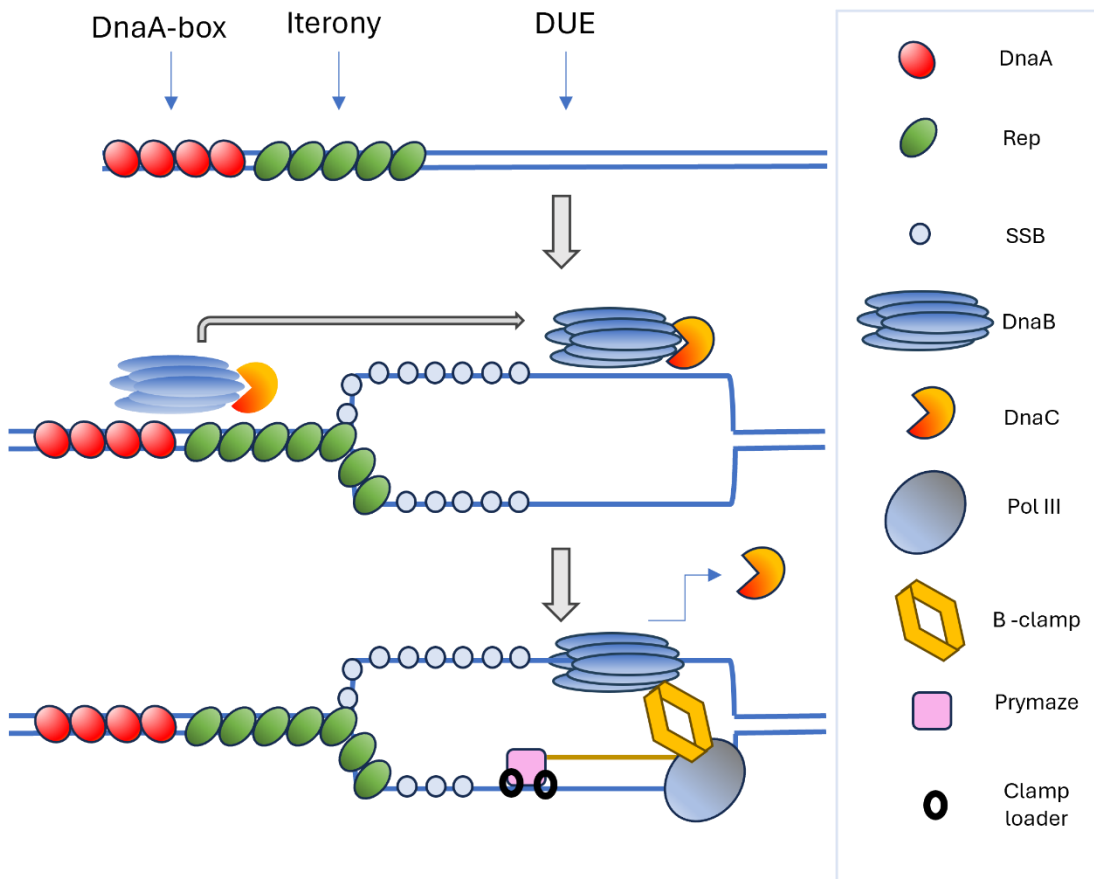
Wiązanie iteronów przez białka Rep powoduje destabilizację rejonu DUE, bogatego w parę AT, w konsekwencji czego dochodzi do miejscowego rozplecenia podwójnej helisy w tym rejonie. W niektórych przypadkach plazmidowe białka Rep współpracują z bakteryjnym inicjatorem, białkiem DnaA, wiążącym się do sekwencji DnaA-box, które również są obecne w sekwencji plazmidowego origin replikacji (Rycina 9A i B). Sekwencje DnaA-box są długości 9 par zasad i w zależności od replikonu mogą znajdować się za sekwencjami iteronowymi (plazmid RK2), przed rejonem bogatym w parę AT (plazmid F) lub w obu tych pozycjach (plazmid P1 i R6K) (Rycina 9A) (Messer, 2002; Rajewska i wsp., 2012). Podobnie jak w przypadku iteronów, liczba sekwencji DnaA-box w origin replikacji jest różna w zależności od plazmidu. W plazmidzie R6K i F można znaleźć trzy sekwencje DnaA-box, w plazmidzie RK2 jest ich cztery, zaś w plazmidzie P1 pięć (Doran i wsp., 1998).

Kolejnym charakterystycznym motywem wspólnym dla *origin* replikacji plazmidów iteronowych, są sekwencje bogate w pary AT, czyli rejon DUE (Rycina 9A). Przeważnie rejon ten jest zlokalizowany blisko sekwencji iteronowych. Ponieważ stabilność par AT jest niższa niż par GC, w momencie wiązania się białek inicjatorowych do iteronów lub/i DnaA-box, dochodzi do destabilizacji dsDNA w rejonie DUE i utworzenia ssDNA (Rajewska i wsp., 2012). Rejon DUE składa się z kilku powtórzonych sekwencji, których długość różni się w zależności od plazmidu. W plazmidzie RK2 sekwencje te są długości 13 nukleotydów (podobnie jak w rejonie DUE *oriC* w *E. coli*) (Stalker i wsp., 1981), w plazmidzie R6K długości 10 nukleotydów (Bramhill i Kornberg, 1988), w plazmidzie F 8 nukleotydów (Wei i Bernander, 1996), zaś w plazmidzie P1 7 nukleotydów (Chattoraj i wsp., 1985). Zazwyczaj posiadają one taką samą orientację, za wyjątkiem jednej sekwencji plazmidu RK2, której orientacja jest skierowana przeciwnie do pozostałych (Rycina 9) (Stalker i wsp., 1981; Konieczny i wsp., 1997). Rejony DUE plazmidów RK2 i F posiadają cztery powtórzone sekwencje, natomiast rejon DUE plazmidu P1 posiada ich pięć (Rajewska i wsp., 2012). Do pełnej aktywności replikacyjnej, ważnym jest zachowanie oryginalnej liczby, oryginalnej orientacji i oryginalnej sekwencji powtórzeń AT w rejonie DUE. Wprowadzenie nawet pojedynczych punktowych mutacji może doprowadzić do zatrzymania procesu inicjacji replikacji (Brendler i wsp., 1997; Kowalczyk i wsp., 2005; Rajewska i wsp., 2008), podobnie jak zamiana jednej plazmidowej powtórzonej sekwencji, na powtórzoną sekwencję rejonu DUE z *oriC* chromosomu *E. coli* (Kowalczyk i wsp., 2005).

W niektórych *origin* replikacji plazmidów iteronowych jest obecne także miejsce wiązania białka IHF. Przykładowo miejsce to zostało zidentyfikowane w *origin* plazmidu P1 i jest zlokalizowane przed klastrem DnaA-box (Rycina 9). Wiązanie białka IHF powoduje wygięcie cząsteczki DNA, co wspomaga inicjację replikacji DNA. (Fekete i wsp., 2006). W zależności od plazmidu, wyróżnia się także inne sekwencje w *origin* replikacji, które pełnią funkcje regulacyjne w procesie inicjacji replikacji. W przypadku plazmidu F, zidentyfikowano miejsce wiązania białka IciA, które podobnie jak w *oriC E. coli*, jest odpowiedzialne za inhibicję procesu rozplatania rejonu bogatego w pary AT (Hwang i Kornberg, 1990). Z kolei w *origin* plazmidu P1 rejon bogaty w pary GT znajduje się pomiędzy rejonem DUE a iteronami (Brendler i wsp., 1991). W miejscu startu replikacji plazmidu R6K można znaleźć także sekwencję wiązania się regulatorowego białka Fis (Wu i wsp., 1996).

2.4.3. Mechanizm inicjacji replikacji w plazmidowym DNA

Inicjacja replikacji plazmidowego DNA, podobnie jak w innych replikonach, składa się z kilku podstawowych etapów: wiązania inicjatora replikacji *origin*, rekrutacji helikazy na ssDNA oraz złożenia holoenzymu bakteryjnej polimerazy III, Pol III (Rycina 10).



Rycina 10 Schemat inicjacji replikacji plazmidowego DNA. Białka Rep rozpoznają i wiążą się do iteronów, zaś bakteryjny inicjator białko DnaA rozpoznaje i wiąże powtórzone sekwencje DnaA-box. Interakcje te powodują miejscową destabilizację rejonu DUE bogatego w pary AT. Białka Rep i DnaA rekrutują helikazę DnaB w kompleksie z białkiem DnaC. Po powstaniu ssDNA rejonie DUE, helikaza DnaB jest umiejscawiana na ssDNA rejonu DUE, natomiast białko DnaC oddysocjowuje od helikazy. Następnie przy pomocy pozostałych białek biorących udział w procesie inicjacji replikacji plazmidowego DNA, dochodzi do złożenia kompleksu replikacyjnego z holoenzymem bakteryjnej polimerazy Pol III. Tak przygotowany kompleks replikacyjny rozpoczyna syntezę nowej cząsteczki plazmidowego DNA. (Schemat przygotowany na podstawie Wegrzyn i wsp., 2016).

Do syntezy nowej cząsteczki plazmidowego DNA wymagane jest złożenie pełnego kompleksu replikacyjnego, w którego skład wchodzi takie białka jak: Rep, helikaza DnaB, DnaC, DnaG, DnaA, HU, SSB, gyraza DNA oraz holoenzym polimeraza Pol III (Konieczny i Helinski, 1997; Konieczny i wsp., 1997; Konieczny i wsp., 2014).

Praca Mukhopadhyay i współpracownicy z 1993 sugerowała, że białko DnaA jest głównym czynnikiem stymulującym destabilizację rejonu DUE plazmidowego DNA. Taki stan rzeczy został przedstawiony dla *origin* replikacji plazmidu P1, *oriR* (Mukhopadhyay i wsp., 1993). W kolejnych latach założenie to zostało jednak zdementowane i wykazano, że funkcja ta jest pełniona przez białka Rep. Opublikowane wyniki analiz przeprowadzonych przez Kawasaki i współpracownicy, udowodniły, że w przypadku plazmidu F, to białko RepE jest głównym czynnikiem generującym destabilizację rejonu DUE (Kawasaki i wsp., 1996). Podobnie dla plazmidu RK2 udowodniono, że za destabilizację rejonu bogatego w pary AT, odpowiedzialny jest plazmidowy inicjator replikacji, białko TrfA (Konieczny i wsp., 1997). Monomery białek Rep w sposób kooperatywny wiążą iterony w *origin* replikacji (Perri i Helinski, 1993; Bowers i wsp., 2007). Monomer białka TrfA oddziałuje z iteronami plazmidu RK2 (Toukdarian i wsp., 1996), białko RepA oddziałuje z iteronami plazmidu P1 (DasGupta i wsp., 1993), białko RepE z iteronami plazmidu F (Kawasaki i wsp., 1992), natomiast białko π z iteronami plazmidu R6K (Germino i Bastia, 1983). Oddziaływanie białek Rep z iteronami prowadzi do topnienia rejonu DUE i powstania kompleksu otwartego w *origin* replikacji. Prócz białek Rep, w proces powstania kompleksu otwartego zaangażowane są również: białko inicjatorowe gospodarza, DnaA i białka HU lub IHF (Nieto i wsp., 1992). Białko DnaA pozwala na stabilizację i utrzymanie kompleksu otwartego, natomiast białko HU podczas oddziaływania z DNA wzmacnia jego wygięcie, co przekłada się na silniejszą destabilizację rejonu DUE i również łatwiejsze utrzymanie kompleksu otwartego. Warty podkreślenia jest jednak fakt, że inicjacja replikacji plazmidu RK2 może być DnaA-zależna lub DnaA-niezależna, w zależności, od wariantu białka TrfA i gospodarza, w którym proces zachodzi. Plazmid RK2 koduje bowiem dwie formy białka TrfA, dłuższą o masie 44 kDa (TrfA44) oraz krótszą o masie 33 kDa (TrfA33). Białko TrfA33 jest pozbawione pierwszych 97 aminokwasów, które są obecne w białku TrfA44. Uzyskanie jednej lub drugiej formy białka jest możliwe, ponieważ ekspresja genu *trfA* może zachodzić na dwa sposoby, dzięki obecności alternatywnego miejsca początku translacji. Zarówno TrfA33, jak i TrfA44 pełnią funkcję inicjatorów replikacji w plazmidowym DNA (Konieczny, 2003; Kolatka i wsp., 2010). Inicjacja replikacji plazmidowego DNA w *E. coli* zachodzi zarówno przy udziale TrfA33, jak i TrfA44, jednak w obu przypadkach wymagana jest również obecność bakteryjnego białka DnaA (Konieczny i wsp., 1997) W *P. aeruginosa* inicjacja replikacji zachodzi przy udziale TrfA44, zaś obecność bakteryjnego białka DnaA nie jest niezbędna do

prawidłowego przebiegu procesu (Jiang i wsp., 2003). W *Caulobacter crescentus* obie opcje są możliwe. Jeśli w procesie inicjacji replikacji bierze udział TrfA33, to również wymagana jest obecność białka DnaA. Natomiast przy udziale dłuższej formy białka (TrfA44), DnaA nie musi być obecne (Durland i Helinski, 1987; Fang i Helinski, 1991; Wegrzyn i wsp., 2013).

Składanie kompleksu replikacyjnego rozpoczyna się od dostarczenia i umiejscowienia helikazy na ssDNA w *origin* replikacji. Plazmidy wykształciły różne mechanizmy rekrutacji i umieszczania helikazy na ssDNA rejonu DUE (Zhong i wsp., 2003; Jiang i wsp., 2003; Konieczny, 2003; Konieczny i wsp., 2014). Na chromosomie *E. coli* helikaza DnaB w kompleksie z białkiem DnaC, jest rekrutowana poprzez oddziaływanie z bakteryjnym białkiem inicjatorowym DnaA (Marszalek i Kaguni, 1994). W przypadku plazmidu RK2, białko DnaA związane w miejscach DnaA-box, również służy do rekrutacji bakteryjnej helikazy (Konieczny i Helinski, 1997). W wyniku rekrutacji, kompleks helikazy DnaB z białkiem DnaC jest przenoszony na ssDNA w rejonie DUE, ale tylko pod warunkiem obecności białka TrfA związanego w *origin* replikacji. Następnie helikaza po interakcji z TrfA, zostaje aktywowana i może rozpocząć rozwijanie dsDNA. Również dla innych białek inicjatorowych zauważono kluczowe znaczenie oddziaływania białek Rep z helikazą DnaB. Chociażby interakcja pomiędzy helikazą a białkiem π plazmidu R6K (Ratnakar i wsp., 1996), białkiem RepE plazmidu F (Zhong i wsp., 2005), czy białkiem RepA plazmidu P1. Podobnie jak dla plazmidu RK2, formowanie kompleksu z helikazą na *oriR* plazmidu P1 jest uzależnione od obecności dodatkowych białek gospodarza, takich jak DnaA, DnaC i HU (Wickner i Chattoraj, 1987).

Plazmidy nie kodują własnej polimerazy, w związku z tym do syntezy nowej nici plazmidowego DNA wykorzystują holoenzym Pol III gospodarza. Bakteryjna polimeraza jest rekrutowana do replikacji plazmidów iteronowych, np. RK2 (Konieczny i Helinski, 1997), R6K (Abhyankar i wsp., 2003), czy też plazmidu F (Zzman i wsp., 2004). Holoenzym Pol III składa się z dziesięciu białek uformowanych w trzy główne moduły: rdzeń Pol III, β -pierścień oraz tzw. „clamp-loader”. Jak zostało wykazane, podjednostka β pierścienia Pol III oddziałując z DNA jest czynnikiem rozpoczynającym składanie kompleksu polimerazy na chromosomowym *origin* replikacji bakterii (Simonetta i wsp., 2009). Co więcej, w białkach Rep zidentyfikowano specyficzny motyw (QLSLF) oddziałujący z podjednostką β pierścienia Pol III (Darlymple i wsp., 2007).

Udowodniono, że oddziaływanie białka TrfA z plazmidu RK2 z pierścieniem β Pol III jest niezbędne do złożenia aktywnego replisomu w *origin* replikacji plazmidowego DNA. Ponadto replisom jest zakotwiczony na dolnej nici *origin* replikacji RK2 tylko w przypadku, gdy cząsteczki białka TrfA oddziałują z 13-nukleotydowymi fragmentami dolnej nici rejonu DUE (Wawrzycka i wsp., 2015). Dane te udowadniają, że składanie replisomu jest zależne zarówno od oddziaływania białka TrfA z β pierścieniem Pol III, jak i oddziaływania TrfA z dolną nicią rejonu DUE.

Dotychczas wykazano, że plazmidowe białka Rep, takie jak TrfA i RepE, prócz wiązania sekwencji iteronowych na dsDNA, wiążą także jedną z nici ssDNA w rejonie DUE (Węgrzyn i wsp., 2014). Białka Rep oddziałują z dolną lub górną nicią rejonu DUE i jest to cecha specyficzna dla każdego z nich. Białko TrfA wiąże specyficznie dolną nić rejonu DUE *oriV*, w którym zidentyfikowano cztery 13-nukleotydowe powtarzające się sekwencje (Doran i wsp., 1998). Prawidłowe otwarcie *origin* replikacji oraz wiązanie białka TrfA z 13-merami rejonu DUE ma kluczowe znaczenie dla procesu rekrutacji i aktywacji helikazy, ale także, jak już wspomniałam, dla złożenia pełnego kompleksu replikacyjnego i rozpoczęcia syntezy nowej cząsteczki DNA (Kowalczyk i wsp., 2005; Rajewska i wsp., 2008; Węgrzyn i wsp., 2014). Analizy wykazały, że zamiana chociaż jednej z czterech 13-nukleotydowych sekwencji nici dolnej z fragmentem nici górnej rejonu DUE uniemożliwia powstanie kompleksu TrfA-ssDNA (Węgrzyn i wsp., 2014). Podobnie wprowadzenie punktowych mutacji do 13-merów hamuje aktywność helikazy w rozplataniu dsDNA i uniemożliwia zajście procesu replikacji DNA (Rajewska i wsp., 2008) W przeciwieństwie do białka TrfA, białko RepE oddziałuje jedynie z górną nicią rejonu DUE na *oriS* (Węgrzyn i wsp., 2014). Ponadto w przypadku obu białek Rep, analizy biochemiczne wykazały, że zarówno białko TrfA i białko RepE oddziałują z dsDNA i ssDNA jednocześnie. Jednakże charakter przeprowadzonych analiz nie pozwolił rozróżnić, czy w obrębie kompleksu inicjacyjnego jedna cząsteczka białka Rep wiąże tylko ssDNA, a inna cząsteczka białka Rep dsDNA, czy też pojedyncza cząsteczka Rep jest w stanie oddziaływać zarówno z ssDNA i dsDNA w tym samym czasie. W momencie podejmowania badań opisanych w tej pracy nie pojawiły się żadne dane dotyczące strukturalnej organizacji takiego potrójnego kompleksu nukleoproteinowego. Bez odpowiedzi pozostało również pytanie, dla którego etapu procesu inicjacji replikacji plazmidowego DNA, oddziaływanie białek Rep z ssDNA rejonu DUE jest kluczowe? Niewiadomą także było, które aminokwasy białek Rep są odpowiedzialne za

oddziaływanie z ssDNA rejonu DUE. W niniejszej pracy podjęłam próbę odpowiedzenia na postawione powyżej pytania.

3. CEL PRACY

Celem pracy była analiza strukturalno-funkcjonalna oddziaływania białek Rep z ssDNA podczas inicjacji replikacji DNA wybranych plazmidów iteronowych.

4. MATERIAŁY

4.1. Szczepy bakteryjne

***E. coli* B ArcticExpress (DE3)** *F*⁻, *ompT*, *hsdSB*(*rB*⁻, *mB*⁻), *dcm*⁺, *Tet*^r, *gal*, λ(DE3), *endA* Hte [*cpn10 cpn60* Gent^r] (Agilent Technologies, USA);

***E. coli* BL21 (DE3)** *F*⁻, *ompT*, *hsdSB*(*rB*⁻, *mB*⁻), *dcm*, *gal*, λ(DE3 (*lacI lacUV5-T7* gene 1 *ind1 sam7 nin5*)) (Studier i Moffatt, 1986);

***E. coli* C600** *F*⁻ *tonA21*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lavY1*, *glnY44*, *rfbC1*, *fhuA1*, λ⁻ (Appleyard, 1954)

***E. coli* DH5α** *F*⁻, *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *gyr96*, *deoR*, *nupG*, Φ80*dlacZΔM15*, Δ(*lavZYA-argF*)*UI169*, *hsdR17*(*eK- mK*⁺), λ⁻ (Woodcock i wsp., 1989)

4.2. Plazmidy

pAT30-*trfA33*-G253D/S269L plazmid wektora pTrcHis-A z kolowanym genem *trfA33* G253D/S269L służący do nadprodukcji monomerycznej formy białka TrfA33 (Katayama, 2017), w tej pracy określonego, jako typ dziki białka TrfA33 (TrfA WT) oraz jego wariantów (TrfA33 K127E, TrfA33 R156E, TrfA33 R194E, TrfA33, TrfA33 R259E, TrfA33 K303E, TrfA33 R327E, TrfA33 R347E);

pBAD24 wektor powszechnie używany do klonowania i ekspresji genów, posiada promotor arabinozowy, niesie oporność na Amp^r (Guzman i wsp., 1995);

pBAD24-*dnaA* wektor ekspresyjny z genem *k* służący do nadprodukcji w bakteriach *E. coli* białka DnaA z dołączonym na C-końcu ogonem histydynowym (6xHisTag), niesie oporność na Amp^r (Caspi i wsp., 2000);

pBAD24-*dnaB* wektor ekspresyjny z genem *dnaB* służący do nadprodukcji w bakteriach *E. coli* białka DnaB z dołączonym na C-końcu ogonem fistydynowym (6xHisTag), niesie gen oporności na Amp^R (Pacek i wsp., 2001);

pBS59 wektor ekspresyjny z genem kodującym podjednostki A i B gyrazy służący do nadprodukcji w bakteriach *E. coli* białkaww. białka z dołączonym na C-końcu ogonem fistydynowym (6xHisTag), niesie gen oporności na Amp^R;

pET15b-*repA*-V134E/K142E/N156E wektor ekspresyjny z genem *repA* V134E/K142E/N156E służący do nadprodukcji monomerycznej formy białka RepA, w

tej pracy określonego, jako typ dziki białka (RepA WT) oraz jego wariantów (RepA Y190E, RepA R191E, RepA R200E, RepA R245E, RepA K266E);

pGC1-*trfA44-G253D/S269L* wektor do nadprodukcji monomerycznej formy białka TrfA44, w tej pracy określanego, jako typ dziki białka TrfA44, oraz jego wariantów (TrfA44 R196E, TrfA44 R327E, TrfA44 347E);

pKD19L1 minireplikon plazmidu RK2, zawiera miejsce *origin* replikacji *oriV* i gen białka inicjacji replikacji TrfA oraz *origin* replikacji plazmidu R6K, *oriγ*, Tet^r (Doran i wsp., 1998);

pPS562 wektor ekspresyjny z genem *dnaC* służący do nadprodukcji w bakteriach *E. coli* białka DnaC z dołączonym na C-końcu ogonem fistydynowym (6xHisTag), niesie gen oporności na Amp^R (Carmen San Martin et al., 1995);

pRK2 plazmid o szerokim zakresie gospodarzy należący do grupy plazmidów niezgodności IncP, kodujący gen zarówno białka TrfA33, jak i TrfA44, zawierający między innymi *origin* replikacji *oriV*, niosący oporność na Amp^r, Tet^r, Kan^r (Mayer i wsp., 1975);

pZZ35 minireplikon plazmidu F, zawiera miejsce *origin* replikacji *oriS* i gen białka inicjacji replikacji RepE z plazmidu pRR61 (Roberts i wsp., 1990) klonowane do plazmidu pBR325 (Zhong i wsp., 2004), Amp^r (Messer, 2002);

pZZ36-*repE-R118P* wektor ekspresyjny z genem *repE* R118P, służący do nadprodukcji monomerycznej formy białka RepE, w tej pracy określonego, jako typ dziki białka (RepE WT) oraz jego wariantów (RepE R146E), Amp^R

4.3. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy użyte do analiz typu SPR

Biot-oriP1_Itop: 5'(biot)-CGATGTGTGCTGGAGGGAAAACGATGTGTGCTGGAG
GGATAAAAATGTGTGCTGACGGGTTGCTAATGTGTGCTGGCGGGATATAGG
ATGTGTGTTGACGGAAAG3-3'

oriP1_Itbot: 5'-CTTTCCCGTCAACACACATCCTATATCCCGCCAGCACACATTA
GCAACCCGTCAGCACACATTTTTATCCCTCCAGCACACATCGTTTTCCCTCC
AGCACACATCG-3'

Biot-oriP1_DUE_{top}: 5'(biot)-GGATAGATCCAATAATCAGGTCCATACAGATCCC
AATTAGATCCATATAGATCCCTGATCG-3'

Biot-oriP1_DUE_{bot}: 5'(biot)-CGATCAGGGATCTATATGGATCTAATTGGGATCTG
TATGGACCTGATTATTGGATCTATCC-3'

Biot-oriV_It_{top}: 5'(biot)- CCTGCGGTATTGACACTTGAGGGGCGCGACTACTGAC
AGATGAGGGGCGCGATCCTTGACACTTGAGGGGCAGAGTGATGACAGATGA
GGGGCGCACCTATTGACATTTGAGGGGCTGTCCACAGGCAG -3'

oriVP_It_{bot}: 5'-TGTGGACAGCCCCTCAAATGTCAATAGGTGCGCCCCTCATCTG
TCATCACTCTGCCCCTCAAGTGTCAAGGATCGCGCCCCTCATCTGTCAGTAG
TCGCGCCCCTCAAGTGTCAATACCG-3'

Biot-oriV_DUE_{bot}: 5'(biot)-GCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGTTTATAAATATTG
GTTTAAAAGCAGGTTAAAAGACAGGTTAGCGGTGG-3'

Oligonukleotydy użyte do analiz typu EMSA

Cy3-oriP1_DUE_{top}: 5'(Cy3)-CTAGACGATCAGGGATCTATATGGATCTAATTGGG
ATCTGTATGGACCTGATTATTGGATCTATCCA-3'

Cy3-oriP1_DUE_{bot}: 5'(Cy3)-CTAGAGGATAGATCCAATAATCAGGTCCATACAG
ATCCCAATTAGATCCATATAGATCCCTGATCGA-3'

Cy3-oriV_DUE_{bot}: 5'(Cy3)-GCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGTTTATAAATATTG
GTTTAAAAGCAGGTTAAAAGACAGGTTAGCGGTGG-3'

Cy3-oriV_It_{top}: 5'(Cy3)-AAGCCGTGTGCGAGACACCGC-3'

oriV_It_{bot}: 5'-AAAGACAGGTTAGCGGTGGCCG-3'

Oligonukleotydy użyte do reakcji wydłużenia startera

Cy3-oriS-Ft: 5'(Cy3)-CTTCTGAGGGCAATTTGTCACAGG-3'

Cy3-oriV-Ft: 5'(Cy3)- GCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC-3'

Oligonukleotydy użyte do mutagenyzy miejscowo-specyficznej RepA

RepA Y190E: 5'-CCAGCTTGATGAGCGCGTTCTGTTGC-3'

RepA Y190E: 5'-GCAACAGAACGCGCTCATCAAGCTGG-3'

RepA Q195E: 5'-GGCGTGGTGCTCCAACAGAACGCG-3'

RepA Q195E: 5'-CGCGTTCTGTTGGAGCACACGCC-3'

RepA R200E: 5'-CGGAAGGGCCTCCAAGGCGTGGTG-3'

RepA R200E: 5'-CACCACGCCTTGGAGGCCCTTCCG-3'

RepA R269E: 5'-AAAACCTTCCTCGCCTTCTTCTC-3'

RepA R269E: 5'-GAGAAGAAAGGCGAGGAAAGTTTT-3'

Oligonukleotydy użyte do mutagenyzy miejscowo-specyficznej TrfA33

TrfA K127E: 5'-CTTCGTGTGCTCCAGCAACGCGGC-3'

TrfA K127E: 5'-GCCGCGTTGCTGGAGCACACGAAG-3'

TrfA R194E: 5'-ATCGTCGGCCTCCAGCTCGACGCC-3'

TrfA R194E: 5'-GGCGTCGAGCTGGAGGCCGACGAT-3'

TrfA R259E: 5'-GTGCCCAACCTCGTCGGACGTGAA-3'

TrfA R259E: 5'-TTCACGTCCGACGAGGTTGGGCAC-3'

Oligonukleotydy użyte do sieciowania białek

DUE_{oriP1} T5:

5'-GGATAGATCCAATAATCAGG(5-Br-dU)CCATACAGATCCCAATTAGATCCA
TATAGATCCCTGATCG-3'

DUE_{oriP1} T10:

5'-GGATAGATCCAATAATCAGGTCCATACAGATCCCAATTAGA(5-Br-dU)CCA
TATAGATCCCTGATCG-3'

4.4. Podłoża hodowlane

Podłoże stałe **LA**: 1.5% agar, 0.5% ekstrakt drożdżowy, 1% trypton, 1% NaCl;

Podłoże płynne **LB**: 0.5% ekstrakt drożdżowy, 1% trypton, 170 mM NaCl;

Podłoże płynne **SOC**: 0.5% ekstrakt drożdżowy, 1% trypton, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza;

4.5. Antybiotyki

Ampicylina 50 µg/ml;

Ampicylina 100 µg/ml;

Tetracyklina 15 µg/ml;

Gentamycyna 20 µg/ml;

Kanamycyna 50 µg/ml;

4.6. Bufory

4.6.1. Bufory standardowe

EDBS (5x stężony): 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 80 µg/ml BSA, 4 mM DTT, 20% (w/v) sacharoza;

Bufor formamidowy: 90% formamid, 54 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.8 mM EDTA, 0.18% SDS;

Bufor H: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0;

Bufor Laemmli (4x stężony): 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glicerol, 0.002% błękit bromofenyłowy, 5% β-merkaptoetanol;

Bufor SDS (10x stężony): 1% SDS, 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 1,96 M glicyna;

TBE (10x stężony): 32 mM EDTA, 0.9 M kwas borowy, 0.9 M Tris;

ELISA bufor A: 0.2% BSA w buforze PBS;

ELISA bufor B: 25 mM HEPES-KOH pH 7.6, 150 mM KCl, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM Mg(OAc)₂, 0,1 mM EDTA pH 8.0, 0.2% BSA, 0.05% TritonX-100;

ELISA bufor PBS: 10 mM Na₂PO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl;

FI*-S: 20% SDS i 0,5 M EDTA pH 8.0;

SPR bufor HBS-EP: 10 mM Hepes-KOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 8.0, 0.005% surfaktant P20;

SPR bufor TNE: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA;

SPR bufor TNE_{hybrydyzacja}: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA;

SPR bufor WS: 1 M NaCl, 50 mM NaOH;

REP-P: 100 mM pirofosforan tetra-sodu, 1M HCl;

REP-S: 100 mM pirofosforan, 10% TCA (kwas trichlorooctowy)

4.6.2 Bufory do oczyszczania ekstraktu bakteryjnego z *E. coli* C600

C600-L: 25 mM Hepes-KOH pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0;

C600-D: 25 mM Hepes-KOH pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 2 mM DTT;

4.6.3. Bufory do oczyszczania białek

Oczyszczanie DnaA

DnaA-L: 50 mM KPi pH 8.0, 125 mM NaCl, 2 mM imidazol pH 8.0, 0.1% Triton X-100;

DnaA-W: 50 mM Kpi pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol pH 8.0, 0.1% Triton X-100;

DnaA-St: 45 mM Hepes-KOH pH 7.6, 0.5 M kwas L-glutaminowy, 10 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM EDTA pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 20% sacharoza;

DnaA-E: 45 mM Hepes-KOH pH 7.6, 0.5 M kwas L-glutaminowy, 10 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM EDTA pH 8.0, 250 mM imidazol, 20% sacharoza;

DnaA-D: 45 mM Hepes-KOH pH 7.6, 0.2 N kwas L-glutaminowy, 1 mM DTT, 20% sacharoza;

Oczyszczanie DnaB

DnaB-L: 50 mM KPi pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

DnaB-W: 50 mM KPi pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

DnaB-E: 50 mM KPi pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 250 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

DnaB-D: 50 mM KPi pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glicerol;

Oczyszczanie DnaC

DnaC-L: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 10 mM spermidyna, 10% sacharoza;

DnaC-D: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 25 mM NaCl, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol;

Oczyszczanie Gyrazy

Gyr-L: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 20 mM spermidyna, 0.1% Brij-58, 10% sacharoza;

Gyr-W: 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 25 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerol;

Gyr-E: 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glicerol;

Gyr-PA: 50 mM HEPES pH 7.2, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol;

Gyr-PB: 50 mM HEPES pH 7.2, 600 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol;

Oczyszczanie RepA

RepA-L: 50 mM KPi pH 8.0, 400 mM KCl, 10 mM imidazol pH 8.0, 0.05% Triton X-100;

RepA-W: 50 mM KPi pH 7.4, 400 mM KCl, 40 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

RepA-E: 50 mM KPi pH 7.4, 400 mM KCl, 500 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

RepA-D: 50 mM KPi pH 7.2, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10% glicerol;

Oczyszczanie RepE

RepE-L: 50 mM KPi pH 8.0, 400 mM KCl, 10 mM imidazol pH 8.0, 0.05% Triton X-100, 10% glicerol;

RepE-W: 50 mM KPi pH 7.2, 400 mM KCl, 40 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

RepE-E: 50 mM KPi pH 7.2, 400 mM KCl, 250 mM EDTA pH 8.0, 10% glicerol;

RepE-D: HEPES-KOH pH 7.2, 100 mM KCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 2 mM β -merkaptoetanol, 10% glicerol;

RepE-E₂: HEPES-KOH pH 7.2, 900 mM KCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 2 mM β -merkaptoetanol, 10% glicerol;

Oczyszczanie TrfA33

T33-L: KPi pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM imidazol pH 8.0, 0.05% Triton X-100, 10% glicerol;

T33-W: KPi pH 7.4, 400 mM KCl, 40 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol

T33-E: KPi pH 7.4, 400 mM KCl, 250 mM EDTA pH 8.0, 10% glicerol;

T33-D: KPi pH 7.4, 100 mM KCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 10% glicerol;

T33-E₂: KPi pH 7.4, 900 mM KCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 10% glicerol;

Oczyszczanie TrfA44

T44-L: 50 mM KPi pH 8.0, 600 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8.0, 0.05% Triton X-100, 10% glicerol;

T44-W: 50 mM KPi pH 8.0, 600 mM NaCl, 50 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

T44-E: 50 mM KPi pH 7.4, 600 mM NaCl, 250 mM imidazol pH 8.0, 10% glicerol;

T44-D: 50 mM KPi pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% glicerol;

T44-E₂: 50 mM KPi pH 7.4, 600 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% glicerol;

4.7. Białka dostępne komercyjnie

AmpliTaq Golsd DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA);

BSA (Sigma-Aldrich, USA)

DpnI (ThermoFisher Scientific, USA);

HU (Kolekcja własna Pracowni Biologii Molekularnej UG i GUMed);

Lizozym (Sigma-Aldrich, USA)

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, Chiny);

Polimeraza Pfu turbo DNA Polymerase (Agilent, USA);

Polimeraza Marathon DNA Polymerase (A&A Biotechnology, Polska);

Polimeraza WALK (A&A Biotechnology, Polska);

ssDNABP (Promega, USA);

4.8. Przeciwciała

I-rzędowe przeciwciała królicze anti-DnaB (kolekcja Zakładu Biologii Molekularnej)

II-rzędowe przeciwciała kozie anti-królicze IgG, sprzężone z HRP (kolekcja Zakładu Biologii Molekularnej)

4.9. Złoża chromatograficzne

DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia, USA);

Fractogel EMD TMAE-650(S) (Merk, Niemcy);

Hi-Trap Heparin HP (GE Healthcare, USA);

Protino Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Niemcy);

P11 (Whatman, USA);

4.10. Roztwory

70% acetonitryl (CAN), roztwór wodny;

80% acetonitryl (CAN), roztwór wodny;

100% acetonitryl (CAN), roztwór wodny;

100 mM ATP pH 7.2, roztwór wodny;

0.3 M amoniak, roztwór wodny;

20% arabinoza, roztwór wodny;

10 mg/ml bromku etydyny, stężony roztwór wodny;

Coomassie: 25% metanol, 10% kwas octowy, 0.14% Coomassie Brilliant Blue R-250;

6x DNA 0.25% cyjanol ksylowy, 0.25% błękit bromofenolowy, 50% glicerol (w/v);

DEN: 2M wodorotlenku sodu (NaOH), 1 mM EDTA pH 8.0;

0,5 M EDTA pH 8.0, roztwór wodny;

20% etanol; roztwór wodny;

70% etanol, roztwór wodny;

99% etanol, roztwór wodny;

25% ficoll, roztwór wodny;

1 M fosfataza keratynowa (CP);
1N roztwór H₂SO₄;
1 M imidazol pH 8.0, roztwór wodny;
1 M IPTG, roztwór wodny;
55 mM jodoacetamid (IAA), roztwór wodny;
2 µg/µl kinaza kreatynowa (CK);
0,1% kwas trifluorooctowy (TFA), roztwór wodny;
0.5% kwas trifluorooctowy (TFA), roztwór wodny;
75 mM nadmanganianu potasu (KMnO₄), roztwór wodny;
Roztwór odbarwiający O: 20% metanol, 10% kwas octowy, roztwór wodny;
2M/10N octanu amonu (CH₃CO₂NH₄), roztwór wodny;
30% roztwór poliakrylamidów: 29% akrylamid i 1% N,N-metylbisakrylamid w roztworze wodnym, pH 7,0;
40% poliakrylamidy: 38% akrylamid i 2% N,N-metylbisakrylamid w roztworze wodnym, pH 7,0;
250 ng/µl trypsyny w 10 mM HCl;

4.11. Odczynniki

- A&A Biotechnology, Polska: agar, ampicylina, bufor do polimerazy Marathon, DTT, ekstrakt drożdżowy, IPTG, ...;
- Avantor, Polska: KOH, etanol, kwas octowy, metanol;
- BD Bacto, USA: pepton;
- Bio-Rad, USA: APS, Zestaw substratów TMB Peroxidase EIA;
- BioShop, Kanada: L-(+)-arabioza, kwas borowy, bromophenol blue, glicyna, K₂HPO₄, KCL, KH₂PO₄, octan magnezu, Na₂HPO₄, NaCl, NaH₂PO₄;
- Hartman Analytic GmbH, Niemcy: metyl-H³-Tymidyna 185 MBq (5 mCi);
- ICN Biomedicals Inc., USA: cyjanol ksylenu;
- Lonza, USA: SeaKem® LE Agarose;

- Merck, Niemcy: Coomassie Brilliant Blue R-250;
- Mlekovita, Polska: mleko beztłuszczowe;
- Perkin-Elmer, USA: tymidyna znakowana trytem;
- Roche Diagnostics, USA: Poly[d(I-C)], Dideoxynucleoside Triphosphate Set Sequencing Grade;
- Serva, Germany: kwas cytrynowy;
- Sigma Aldrich, USA: AgNO₃, akrylamid/bis-akrylamid (30%) roztwór, ATP, β-merkaptioetanol, bromek etydyny, CaCl₂, cukroza, dNTPs, EDTA, fosforan;
- StanLab, Polska: HCl, H₂SO₄;
- ThermoFisher Scientific, USA: bufor Tango, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, PageRuler Pre-stained Protein Ladder, Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit;

4.12. Skład żeli do rozdzielania elektroforetycznego

SDS PAGE:

10% żel poliakrylamidowy: 0.37 M Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M), 10% poliakrylamidy (30%), 0.07% APS (10%), 0.37% TEMED (99%);

12.5% żel dolny: 0.37 M Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M), 12.5% poliakrylamidy (30%), 0.07% APS (10%), 0.37% TEMED (99%);

15% żel dolny: 0.37 M Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M), 15% poliakrylamidy (30%), 0.07% APS (10%), 0.37% TEMED (99%);

Żel górny: 0.12 M Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M), 4.37% poliakrylamidy (30%), 0.058 % APS (10%), 0.29% TEMED (99%);

Sekwencjonowanie: 10% poliakrylamid (40%), 8 M mocznik, 0.5x stężony TBE, 0.036% APS, 0.06% TEMED;

Agarozowy: 1% roztwór agarozy w 1x stężonym buforze TBE (Materiały 4.6.1) lub 0.75% roztwór agarozy w 1x stężonym buforze TBE;

EMSA: 5% poliakrylamid (30%), 1x stężony TBE, 0.47% APS, 0.13% TEMED;

4.13. Inne materiały

Filtry ze szklanej mikrofibry GF/C, 25 mm Whatman (GE Healthcare Life Science, UK);

GeanClean II Kit (MP Biomedicals, USA);

Kuwety do elektroporacji Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad, USA);

Membrana nitrocelulozowa Premium 0.45 μ m NC (Amersham Protran, Niemcy);

Mix&Go! *E. coli* Transfromation Buffer Set (Zymo Research, USA);

NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Merchery-Nagel, Niemcy);

Pipety automatyczne Pipetman (Gilson, USA);

Plasmid mini, Plasmid mini AX, Plasmid midi AX (A&A Biotechnology, Polska);

Płytki 96-dółkowa EIA/RIA costar 3591 (Corning Incorporation, USA);

Protino NI-NTA Agaroz (Marcherey-Nagel, Niemcy);

SilverQuest™ Silver Staining Kit (Invitrogen, USA);

Woreczki dializacyjne Spectra/Por Dialysis Kit (MWCO 12-14000) (Spectrum Laboratories, USA);

4.14. Aparatura

AKTA prime plus system (GE Healthcare, USA);

Biacore T200 SPR system (Cytiva, USA);

BioSpectrometr (Eppendorf, Polska);

ChemiDoc system (Bio-Rad, USA);

Czytnik płytek Spektrofotometr EPOCH 2 (BioTek, Polska);

Fermentor B. Braun International C15-3 (BIOSTAT, USA);

Horizontal Mini-Gel system MGU-202T (CBS Scientific, USA);

Lampy UV Tube for EL Series UV Lamps (UVP);

Licznik scyntylacyjny Liquid scintillator (Beckman Coulter, USA);

Mass Spectrometer Autoflec III (Bruker, USA);

Milli-Q ultrapure water solutions (Millipore, USA);

Mini-PROTEAN Tetra cell system (Bio-Rad, USA);

Nanodrop 2000 spektrofotometr (Thermo Scientific, USA);

Pipety automatyczne Pipetman (Gilson, USA);

pH-metr SevenCompact pH meter S220 (Mettler Toledo, Polska);

Poziomy zestaw mini-żelowy MGU-202T-G (C.B.S. Scientific, USA);

SA Sensor Chip (Cytiva, USA);

Sekwencery z podkładem aluminiowym (Thermo Scientific, USA);

Skaner fluorescencyjny Amersham Typhoon (Cytiva, USA);

Sonikator Q700 (Qsonica, USA);

Spektrometr dichroizmu kołowego Jasco J-1500 (Jasco, Japonia)

Spektrometr mas 5800 MALDITOF/TOF (AB Sciex, Framingham, MA, USA)

System do podwójnej pionowej elektroforezy żelowej OWL P10DS (Thermo Scientific, USA);

Termocykler C100 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA);

Thermomixer comfort (Eppendorf, Polska);

Typhoon Biomolecular Imager (Amersham, USA);

Wirówka Avanti J-30I (Beckman Coulter, USA);

Wirówka Centrifuge 5804-R (Eppendorf, Polska)

Wirówka Sigma 1-14 (Sigma, Niemcy);

Zasilacz PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA);

5. METODY

5.1. Izolacja DNA

5.1.1. Izolacja chromosomalnego DNA bakterii

Do izolacji genomowego DNA bakterii używano komercyjnego zestawu Genomic mini (A&A Biotechnology). Izolację przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta. Do 100 µl hodowli bakteryjnej dodawano 200 µl roztworu lizującego LT i 20 µl proteinazy K. Komórki inkubowano w temp. 37°C przez 20 min. Następnie komórki inkubowano w temp. 70 °C przez 5 min, po tym czasie worteksowano i wirowano przy prędkości 15 000 obrotów/minutę przez 3 min. Supernatant przenoszono na minikolumny i wirowano z tą samą prędkością przez 1 min. Dodawano 500 µl płuczającego buforu A1 i powtarzano wirowanie. Dodawano 400 µl buforu A1 i powtarzano wirowanie. Minikolumny przenoszono do nowych probówek i dodawano 200 µl roztworu Tris ogrzanego do 70 °C. Następnie inkubowano w temp. pokojowej przez 2 min., po czym wirowano przy prędkości 15 000 obrotów/min. Oczyszczony DNA przechowywano w temp. 4 °C.

5.1.2. Izolacja superzwiniętej formy plazmidowego DNA

W zależności od skali izolacji oraz kopijności plazmidu, do izolacji superzwiniętej formy plazmidowego DNA używano komercyjnych zestawów Plasmid Mini lub Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology).

Plasmid Mini

Zestawu Plasmid Mini używano do oczyszczania DNA plazmidowego o wysokiej kopijności zgodnie z protokołem producenta. Wirowano 3 ml hodowli nocnej komórek bakteryjnych, usuwano supernatant, a komórki zawieszano w 200 µl roztworu L1. Dodawano 200 µl roztworu lizującego L2, mieszano poprzez 3-krotne odwracanie i inkubowano w temp. pokojowej przez 3 min. Dodawano 400 µl buforu zobojętniającego G3 i mieszano do zaniknięcia malinowej barwy lizatu, po czym wirowano przy prędkości 12 500 obrotów/min. przez 10 minut. Lizat наносzono na minikolumny i wirowano z tą samą prędkością przez 1 min. Dodawano 500 µl buforu płuczającego W i powtarzano wirowanie. Dodawano 600 µl buforu płuczającego A1 i powtarzano wirowanie. Minikolumny przenoszono do nowej probówki, dodawano 50 µl jałowej wody ogrzanej

do temp. 50 °C i inkubowano w temp. pokojowej przez 3 min., po czym powtarzano wirowanie. Oczyszczony DNA przechowywano w temp. 4 °C.

Plasmid Midi AX

Zestawu Plasmid Midi AX używano do oczyszczania plazmidowego DNA o niskiej kopijności, lub wysokiej kopijności, jeżeli do analiz było wymagane użycie wysokich stężeń DNA. Zestawu używano zgodnie z protokołem producenta. Wirowano 100 ml hodowli nocnej komórek bakteryjnych, usuwano supernatant, a komórki zawieszano w 5 ml roztworu L1. Dodawano 5 ml roztworu lizującego L2, mieszano poprzez 3-krotne odwracanie i inkubowano w temp. pokojowej przez 5 min. Dodawano 5 ml buforu zobojętniającego L3 i mieszano do zaniknięcia malinowej barwy lizatu, po czym lizat przenoszono na kolumnę filtrującą i wirowano przy prędkości 1 500 obrotów/min. przez 5 minut. Lizat nanoszono na kolumnę Plasmid 200 i czekali aż cały lizat przesączy się przez kolumnę. Dodawano 20 ml buforu płuczającego K2P i ponownie czekali aż cały bufor przesączy się przez kolumnę. Kolumnę Plasmid 200 przenoszono do nowych probówek, dodawano 6 ml roztworu elucyjnego K3 i czekali aż cały bufor przesączy się przez kolumnę. Do eluatu dodawano 25 µl wzmacniacza do precypitacji oraz 5 ml izopropanolu, mieszano poprzez odwracanie, po czym wirowano przy prędkości 12 500 obrotów/min przez 10 min. Usuwano supernatant, zaś pellet płukano 70% roztworem etanolu i wirowano przy prędkości 12 500 obrotów/min. przez 3 min. Ponownie usuwano supernatant, zaś pellet suszono w temp. pokojowej przez 10 min. Następnie do pelletu dodawano 500 µl jałowej wody. Oczyszczony DNA przechowywano w temp 4 °C.

5.1.3. Izolacja DNA z żelu

Do izolacji DNA z żelu agarozowego używano komercyjnego zestawu Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Bionovo). Zestawu używano zgodnie z protokołem producenta z drobnymi zmianami opisanymi poniżej. Do 100 mg fragmentów żelu agarozowego zawierającego DNA dodawano 200 µl buforu NTI i inkubowano w temp. 50 °C przez 10 min. W międzyczasie próbki worteksomano co 2 minuty. Na kolumnę nanoszono 700 µl próbki i wirowano przy prędkości 12 500 obrotów/min. przez 30 s. Na kolumnę nanoszono 700 µl buforu NT3 i powtarzano wirowanie. Etap ten wykonywano dwukrotnie. Kolumnę przenoszono do nowej probówki, dodawano 30 µl jałowej wody, inkubowano przez 3 min, po czym wirowano przy prędkości 12 500 obrotów/ min. przez 1 min. Oczyszczony DNA przechowywano w temp 4 °C.

5.2. Mutageneza miejscowo-specyficzna

Do przeprowadzenia mutagenezy miejscowo-specyficznej w celu otrzymania punktowych mutantów białka TrfA33 i RepA jako matrycy używano odpowiednio plazmidów pAT30, kodującego białko TrfA33 i pET15b-repA kodującego białko RepA. W skład 50 μ l mieszaniny reakcyjnej wchodził 1X stężony bufor *Pfu*, dNTPsy każdy o końcowym stężeniu 200 μ M, 1.5 μ M startery odpowiednie dla konkretnej matrycy DNA (Materiały 4.3), 100 ng matrycowego plazmidowego DNA w formie superzwiniętej (pAT30 lub pET15b) oraz 1 U polimerazy *Pfu Turbo* (Materiały 4.7). Dla uproszczenia składy poszczególnych mieszanin przedstawiono w Tabeli 1. Reakcję PCR rozpoczęto od wstępnej denaturacji w 95°C przez 2 min. Następnie przeprowadzono 18 cykli, które obejmowały denaturację w temp. 95°C przez 30 s., przyłączanie starterów w temp. 63°C przez 1 min oraz wydłużanie łańcucha DNA w temp. 72°C przez okres 6 min. Reakcję zakończono dodatkową elongacją w temp. 72 °C przez okres 10 min.

Tabela 1 Składy mieszanin reakcyjnych do przeprowadzenia mutagenezy miejscowo-specyficznej w genie białka TrfA33 kodowanego na plazmidzie pAT30 i w genie białka RepA kodowanego na plazmidzie pET15b.

	pAT30	pET15b
10X stężony bufor	5 μ l	5 μ l
dNTPs	200 μ M (każdy)	200 μ M (każdy)
Starter 1*	1.5 μ M	1.5 μ M
Starter 2*	1.5 μ M	1.5 μ M
Matryca	100 ng	100 ng
Polimeraza	1 U	1 U
Końcowa objętość reakcji	50	50

* Pary starterów do mutagenezy miejscowo specyficznej przedstawiono w Materiały 4.3.

5.3. Trawienie matrycowego DNA po reakcji PCR

W celu usunięcia matrycowego DNA po reakcji PCR do mieszaniny poreakcyjnej dodawano 2 μ l enzymu restrykcyjnego DpnI, który rozpoznaje N⁶-metylowane reszty adeninowe. Trawienie prowadzono w temp. 37°C przez okres 1.5 h.

5.4. Określenie stężenia i czystości DNA

Stężenie oraz czystość wyizolowanego materiału genetycznego określano z użyciem spektrofotometru Nano-Drop (Materiały 4.14) nanosząc 1.5 μ l próbki badanej. Próbę referencyjną stanowiło 1.5 μ l wody. W celu określenia czystości uzyskanego preparatu mierzono stosunek absorbancji A_{260}/A_{230} oraz A_{260}/A_{280} . Do dalszych badań używano jedynie DNA o stosunkach absorbancji $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ i $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$.

5.5. Hybrydyzacja DNA

Hybrydyzację dwóch komplementarnych fragmentów jednoniciowego DNA przeprowadzano w buforze H (Materiały 4.6.1). Probówkę z mieszaniną reakcyjną zawierającą 2 μ M stężenie każdego z oligonukleotydów w buforze H inkubowano w temp. 95°C przez 5 minut, a następnie inkubację kontynuowano stopniowo zmniejszając temperaturę inkubacji do osiągnięcia temperatury pokojowej.

5.6. Uzyskanie komórek kompetentnych

W celu nadania komórkom *E. coli* kompetencji do pobierania plazmidowego DNA wykorzystano komercyjny zestaw *Mix&Go! E. coli* Transfromation Buffer Set (Materiały 4.13) zgodnie z protokołem producenta. Po nadaniu komórkom kompetencji, komórki przechowywano w -80 °C.

5.7. Transformacja komórek kompetentnych

Aby przeprowadzić transformację komórek kompetentnych *E. coli*, rozmrażano 100 μ l komórek i dodawano 5 μ l plazmidowego DNA, następnie komórki inkubowano na lodzie przez okres 30 min. W celu przeprowadzenia szoku temperaturowego, komórki przekładano z lodu do temp. 42°C i inkubowano przez 45 s, po czym ponownie umieszczano je w lodzie na 2 minuty. Po tym czasie do komórek dodawano 900 ml ciepłej pożywki SOC (Materiały 4.4) i inkubowano w temp. 37°C z wytrząsaniem przez 1 h. Następnie komórki wysiewano na stałe podłoże LB (Materiały 4.4) z odpowiednim antybiotykiem i inkubowano w 37°C przez noc.

5.8. Oczyszczanie frakcji białek replikacyjnych z komórek *E. coli* C600

Hodowlę nocną komórek *E. coli* C600 odmładzano w 3 l pożywki LB w stosunku 1:100 i inkubowano w temp. 37°C z wytrząsaniem 160 obrotów/min. do uzyskania $OD_{600} = 1$. Komórki osadzano przez wirowanie z prędkością 4000 obrotów/min. w temp. 4°C przez 10 min. Osad bakteryjny porcjowano po 2 g. Osad bakteryjny zawieszano w 12 ml buforu

C600-L (Materiały 4.6.2), zamrażano w ciekłym azocie i rozmrażano w łaźni lodowej przez 20 min, a następnie w temp. 15°C do całkowitego rozmrożenia. Dodawano 2 M KCl do końcowego stężenia 15 mM oraz lizozymu w proszku do końcowego stężenia 0.2 µg/ml i inkubowano na lodzie przez 30 min. Ponownie zamrażano w ciekłym azocie i rozmrażano. Lizat wirowano z prędkością 30 000 obrotów/min. w temp. 4°C przez 30 min. Następnie wysalano białka stopniowo dodając 0.28 g siarczanu amonu na 1 ml supernatantu otrzymanego po wirowaniu, mieszając w temp. 4°C przez okres 30 min. Całość wirowano przy prędkości 25 000 obrotów/ min. w temp. 4°C przez okres 20 min. Osad zawieszano w 0.4 ml buforu C600-D (Materiały 4.6.2) i dializowano do 1 l buforu C600-D w temp. 4°C przez okres 1 h. Ekstrakt bakteryjny porcjowano, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.9. Oczyszczanie białek

5.9.1. Nadprodukcja białek

Nadprodukcja wariantów białka TrfA33

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* Arctic Express (DE3)[pAT30-*trfA33*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w stosunku 1:50 do 4.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) zawierającej gentamycynę o stężeniu 20 µg/ml i ampicylinę o stężeniu 50 µg/ml, i hodowano w temp. 30°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę przez 3h. Po tym czasie zmierzono OD₆₀₀ hodowli. W celu obniżenia temperatury hodowli inkubację kontynuowano w temp. 12°C przez 1h. Ekspresję genu białka TrfA-33 posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie chemicznego analogu laktozy izopropyl-β-D-1-tiogalatopiranozdu (IPTG) do końcowego stężenia 1 mM. Indukcję prowadzono w temp. 12°C przez 24 h. Po tym czasie komórki bakteryjne osadzano poprzez wirowanie z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja wariantów białka TrfA44

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* Arctic Express (DE3)[pGCI-*trfA44*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w stosunku 1:50 do 4.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) zawierającej gentamycynę o stężeniu 20 µg/ml i ampicylinę o stężeniu 50 µg/ml i hodowano w temp. 30°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę przez 3 h. W celu obniżenia temperatury hodowli inkubację kontynuowano w temp. 12°C przez 1h. Ekspresję genu białka TrfA44 posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie 20%

arabinozy do końcowego stężenia 0.2%. Indukcję prowadzono w temp. 12°C przez 24 h. Po tym czasie komórki bakteryjne osadzano poprzez wirowanie z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja wariantów białka RepA

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* BL21 (DE3)[pET15b-*repA*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w stosunku 1:30 do 1.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) z 100 mM ampicyliną i hodowano w temp. 32°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę do uzyskania OD₆₀₀ = 0.6. Ekspresję genu białka RepA posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Indukcję prowadzono w temp. 32°C przez 2 h. Po tym czasie komórki bakteryjne osadzano poprzez wirowanie z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja wariantów białka RepE

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* BL21 (DE3)[pBAD24-*repE*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w stosunku 1:30 do 1.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) z 100 mM ampicyliną i hodowano w temp. 32°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę do uzyskania OD₆₀₀ = 0.6. Ekspresję genu białka RepE posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie 20% arabinozy do końcowego stężenia 0.2%. Indukcję prowadzono w temp. 32°C przez 2 h. Po tym czasie komórki bakteryjne osadzano poprzez wirowanie z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja DnaA

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* JP313[pBAD24-*dnaA*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w stosunku 1:30 do 1.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) z 100 mM ampicyliną i hodowano w temp. 37°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę do uzyskania OD₆₀₀ = 0.8. Ekspresję genu białka DnaA posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie 20% arabinozy do końcowego stężenia 0.2%. Indukcję prowadzono w temp. 37°C przez 2 h. Po tym czasie komórki bakteryjne osadzano poprzez wirowanie z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja DnaB

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* BL21[pBAD24-*dnaB*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w stosunku 1:30 do 1.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) z 100 mM ampicyliną i hodowano w temp. 37°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę do uzyskania $OD_{600} = 0.8$. Ekspresję genu białka DnaB posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie 20% arabinozy do końcowego stężenia 0.2%. Indukcję prowadzono w temp. 37°C przez 3 h. Po tym czasie komórki bakteryjne osadzano poprzez wirowanie z prędkością 5000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja DnaC

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* BL21[pPS562-*dnaC*] (Materiały 4.1 i 4.2) odmłodzono w 0.5 l pożywki LB (Materiały 4.4) z dodatkiem 100 mM ampicyliny i inkubowano w temp. 30°C z wytrząsaniem 150 obrotów/minutę do uzyskania $OD_{600} = 0.6$. Ekspresję genu białka DnaC posiadającego na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez dodanie 0.5 L pożywki LB podgrzanej do temp. 60 °C, po czym hodowlę inkubowano w temp. 42°C przez 3 h.

Nadprodukcja gyrazy

Nocną hodowlę bakterii *E. coli* BL21(DE3)/pBS59-*gyraza* odmłodzono w 9 L pożywki LB (Materiały 4.4) z dodatkiem 100 mM ampicyliny i inkubowano w temp. 32°C z wytrząsaniem 160 obrotów/minutę do uzyskania $OD_{600} = 0.6$. Ekspresję genu gyrazy posiadającej na C-końcu znacznik histydynowy indukowano poprzez podwyższenie temperatury do 42°C i inkubację w tej temperaturze przez 20 min. Następnie hodowlę inkubowano w temp. 37°C przez 2h. Po zakończonej nadprodukcji, komórki osadzano poprzez wirowanie z prędkością 4000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.9.2. Oczyszczanie białek na złożach chromatograficznych

Oczyszczanie na złożu Ni-NTA białek: TrfA33, TrfA44, RepA, RepE, DnaA, DnaB

Otrzymany osad bakteryjny rozmrażano w łaźni lodowej, po czym rozcieńczano w buforze L dla odpowiedniego białka (Materiały 4.6.3), dodawano szczyptę liofilizowanego lizozymu (Materiały 4.7), inkubowano w temp. 4°C przez 30 min., po

czym zamrażano w ciekłym azocie. Następnie komórki rozmrażano w łaźni lodowej i poddawano sonikacji o parametrach 15 Amp, 32 J, 3x 30 s z użyciem sonikatora Qsonica Sonicators. Lizat (Materiały 4.14) wirowano przy prędkości 25 000 obrotów/minutę przez 30 min. w temp. 4°C. Supernatant dodawano do zrównoważonego buforem L 1.5 ml złoża Ni-NTA (Materiały 4.9) i prowadzono wiązanie białka do złoża poprzez mieszanie rotacyjne (20 obrotów/minutę) w temp. 4°C przez 1 h. Złoże osadzano poprzez wirowanie z prędkością 1000 obrotów/min. przez 3 min. w temp. 4°C. Następnie wykonano serię 3 płukań buforem W dla odpowiedniego białka (Materiały 4.6.3). Złoże ze związanym białkiem płukano poprzez mieszanie rotacyjne złoża w buforze W przez 10 min. w temp. 4°C, po czym wirowano j.w. Tak przygotowane złoże przekładano do kolumny. W celu elucji nanoszono 10 ml buforu E dla odpowiedniego białka (Materiały 4.6.3) i inkubowano przez 15 min. w 4°C. Elucję prowadzono buforem E zbierając frakcje po 0.5 ml. Analiza skanów żeli polikarylamidowych uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE (Metody 5.13), pozwoliła na wybór frakcji oczyszczonych białek, które to frakcje następnie dializowano 3 x po 45 min. do odpowiedniego dla danego białka buforu D (Materiały 4.6.3). Oczyszczone frakcje białka porcjowano, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C.

Oczyszczanie na złożu Hi-Trap białek: TrfA33, TrfA44, RepA i RepE

Frakcje białek, które po oczyszczaniu na złożu Ni-NTA, dalej zawierały zanieczyszczenia, poddawano drugiemu oczyszczaniu stosując chromatografię jonowymienną z użyciem złoża heparynowego Hi-Trap (Materiały 4.9) i systemu AKTA (Materiały 4.14). Oczyszczane frakcje białka nanoszono na zrównoważone buforem D dla odpowiedniego białka (Materiały 4.6.3) złoże Hi-Trap przy przepływie 0.5 ml/min, po czym złoże płukano ilością buforu D odpowiadającą 10-krotnej objętości kolumny ze złożem Hi-Trap. Następnie ustawiano gradient, w którym zmieniano stosunek buforu D do E₂ dla odpowiedniego białka (Materiały 4.6.3). Gradient rozpoczynano od 0% stężenia buforu E₂ i kończono na 100% stężeniu buforu E₂. Prowadzono gradient o objętości 8 ml o przepływie 0,5 ml/min., zbierając frakcje po 0,5 ml. Analiza skanów żeli polikarylamidowych uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE (Metody 5.13), pozwoliła na wybór frakcji oczyszczonych białek, które to frakcje następnie dializowano 3 x po 45 min. do odpowiedniego dla danego białka buforu D (Materiały 4.6.3). Oczyszczone frakcje białka porcjowano, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C.

Oczyszczanie gyrazy

Zamrożony osad bakteryjny rozmrażano w łaźni lodowej. Rozmrożony osad zawieszano w 40 ml buforu Gyr-L (Materiały 4.6.3), dodano szczyptę liofilizowanego lizozymu i inkubowano na lodzie przez 1 h. Następnie lizat dwukrotnie zamrażano w ciekłym azocie i rozmrażano w łaźni lodowej. Lizat wirowano przy prędkości 30 000 obrotów/min. przez 1 h w temp. 4°C, po czym lizat dializowano do buforu Gyr-W (Materiały 4.6.3) 3x 1 l x 45 min.. Dializat наносono na 30 ml zrównoważonego buforem Gyr-W złoża DEAE Sepharose (Materiały 4.9) i płukano 100 ml buforu Gyr-W. Elucję gyrazy prowadzono z użyciem gradientu liniowego o długości 100 ml i przepływie 0.3 ml/min w systemie AKTA, zbierając frakcje o objętości 3 ml. Podczas gradientu zmienny był stosunek buforu Gyr-W do buforu Gyr-E (Materiały 4.6.3). Elucję rozpoczęto od 0% stężenia buforu Gyr-E i 100% stężenia buforu Gyr-W i zakończono na 100% stężeniu buforu Gyr-E i 0% stężeniu buforu Gyr-W. Zebrane frakcje poddano analizie SDS-PAGE (Metody 5.13). Frakcje zawierające gyrazę dializowano do buforu Gyr-PA (Materiały 4.6.3) 3x 1 l przez 45 min. Dializat наносono na 7 ml zrównoważonego buforem Gyr-PA złoża celulozowego P11 (Materiały 4.9), które następnie płukano 50 ml buforu Gyr-PA. Elucję gyrazy ze złoża P11 prowadzono dwuetapowym gradientem o przepływie 0,2 ml/min z użyciem systemu AKTA (Materiały 4.14), zbierając frakcje o objętości 1 ml. Pierwszy etap gradientu o długości 10 ml prowadzono od 0% do 50% stężenia buforu Gyr-PB (Materiały 4.6.3). Drugi etap gradientu o długości 25 ml prowadzono od 50% do 100% stężenia buforu Gyr-PB. Zebrane frakcje poddano analizie SDS-PAGE (Metody 5.13). Frakcje zawierające gyrazę dializowano do buforu Gyr-PA 3x 1 l przez 45 min. Dializat наносono na 1 ml zrównoważonego buforem Gyr-PA złoża heparynowego Hi-Trap (Materiały 4.9). Złoże płukano 10 ml buforu Gyr-PA. Elucję białka ze złoża Hi-Trap prowadzono z użyciem gradientu liniowego o objętości 10 ml i przy przepływie 0.5 ml/min w systemie AKTA, zbierając frakcje o objętości 0,5 ml. Elucję prowadzono od 0% do 100% stężenia buforu Gyr-PB. Zebrane frakcje poddano analizie SDS-PAGE. Frakcje zawierające gyrazę dializowano do buforu Gyr-PA 3x 1 l po 45 min., porcjowano, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.9.3. Oczyszczanie białek poprzez wysalanie: DnaC

Po zakończonej nadprodukcji, komórki osadzano poprzez wirowanie z prędkością 4000 obrotów/minutę przez 10 min. w temp. 4°C. Osad bakteryjny rozpuszczano w buforze

DnaC-L (Materiały 4.6.3), dodawano szczyptę liofilizowanego lizozymu, inkubowano w temp. 4°C przez 1 h, po czym zamrożono w ciekłym azocie. Następnie komórki rozmrażano w łaźni lodowej i poddawano sonikacji o parametrach 15 Amp, 32 J, 3x 30 s z użyciem sonikatora Qsonica Sonicators (Materiały 4.14). Lizat wirowano przy prędkości 25 000 obrotów/minutę przez 30 min. w temp. 4°C. Białka znajdujące się w supernatancie precypitowano dodając stopniowo 0.2 g siarczanu amonu na 1 ml supernatantu i mieszając na mieszadle magnetycznym (Materiały 4.14) w temp. 4°C przez 1 h. Następnie mieszaninę wirowano przy prędkości 25 000 obrotów/minutę przez 45 min. w temp. 4°C. Osad rozpuszczano w 10 ml buforu DnaC-D (Materiały 4.6.3) i dializowano w 2 l buforu DnaC-D przez noc w temp. 4°C. Dializat наносono na 2 ml zrównoważonego buforem DnaC-D fraktożelu (Fractogel EMD TMAE-650(S) (Materiały 4.9). Następnie złoże płukano buforem DnaC-D i zbierano frakcje białka o objętości 0.5 ml. Tak oczyszczone białko porcjowano, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.10. Oznaczanie stężenia białek - densytometria

Oznaczenie czystości oraz stężeń białek przeprowadzono metodą densytometrii z wykorzystaniem elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, SDS-PAGE (Metody 5.13). Jako wzorca stężeniowego używano znanych ilości (0.5, 1, 1.5, 2 µg) Surowiczej Albuminy Wołowej, BSA (*ang.* Bovine Serum Albumin) (Materiały 4.7). Badane białka miareczkowano objętościowo 0.5, 1, 2, 3 i 4 µl w 5 µl buforu obciążającego Laemmli (Materiały 4.6.1), po czym inkubowano w temp. 95°C przez 5 minut. Tak przygotowane próbki наносono do studzienek żelu poliakrylamidowego (Materiały 4.12) i przeprowadzono rozdział SDS-PAGE. Następnie żełe barwiono Coomassie Brilliant Blue (Metody 5.14.1). Analizę densytometryczną przeprowadzono z wykorzystaniem systemu ChemiDoc MP Imaging System (Materiały 4.14), porównując intensywność prążków wzorca stężeniowego z intensywnością prążków oczyszczonego białka.

5.11. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny DNA przeprowadzono w 0.75% lub 1% (wag./obj.) żelach agarozowych (Materiały 2.12). Przed nałożeniem próbek z DNA do studzienek żelu, do DNA dodano 6x stężony bufor obciążający (Materiały 4.6.1). Jeżeli nie podano inaczej, rozdział prowadzono przy stałym napięciu 90 V przez 60 min w 1x stężonym buforze

TBE (Materiały 4.6.1). Elektroforezę przeprowadzano w aparacie Horizontal Mini-Gel Systems MGU-202T (Materiały 4.14). W celu wizualizacji DNA żele barwiono EtBr (Metody 5.12), zaś skany żelów agarozowych wykonywano z użyciem systemu ChemiDoc MP Imaging System (Materiały 4.14).

5.12. Barwienie żeli agarozowych

5.12.1. Barwienie przed rozdziałem elektroforetycznym

Przygotowane roztwory żeli agarozowych (Materiały 4.12) schładzano do temp. ok. 50-60°C i dodawano roztworu EtBr (Materiały 4.10) do końcowego stężenia 0.4 µg/ml. Żele wylewano do aparatu i pozostawiono do zastygnięcia.

5.12.2. Barwienie po rozdziale elektroforetycznym

Po rozdziale elektroforetycznym, żele agarozowe płukano buforem zawierającej 0,5 µg/ml roztwór EtBr (Materiały 4.10) przez 30 min. W celu pozbycia się nadmiaru EtBr, żele płukano przez 20 min. w wodzie.

5.13. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w nieciągłych denaturujących żelach poliakrylamidowych (SDS-PAGE). Żel górny (zagęszczający) zawierał roztwór poliakrylamidów (Materiały 4.10) w stężeniu 4.5% (Materiały 4.12), zaś żel dolny (rozdzielający) w stężeniu 12.5% lub 15% (Materiały 4.12). Do próbek z białkami dodawano buforu Laemmli (Materiały 4.6.1) do końcowego stężenia 1x i inkubowano przez 5 min. w temp. 95°C. Następnie próbki наносzono do studzienek żelu i prowadzono rozdział w 1x stężonym buforze SDS (Materiały 4.6.1) przy stałym napięciu 180 V przez 1 h. Elektroforezę prowadzono w systemie Mini-PROTEAN Tetra Cell (Materiały 4.14). W celu wizualizacji białek, żele barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue (Metody 5.14.1). Skany żeli wykonywano z użyciem systemu ChemiDoc MP Imaging System (Materiały 4.14).

5.14. Elektroforeza DNA w warunkach denaturujących

Produkty reakcji wydłużania startera oraz reakcji sekwencjonowania rozdzielano w 10% żelu denaturującym poliakrylamidowym z 8 M mocznikiem i buforem 0,5 x TBE (Materiały 4.12). Elektroforezę produktów otrzymanych po reakcji wydłużania startera (Metody 5.22.3) prowadzono w buforze 0,5 x TBE przy stałej mocy 40 W, zaś

elektroforezę produktów otrzymanych po reakcji sekwencjonowania (Meody 5.25) prowadzono w buforze 0,5 x TBE przy stałej mocy 55 W. Wyniki wizualizowano za pomocą skanera fluorescencyjnego Amersham Typhoon (Cytiva) (Materiały 4.14).

5.15. Barwienie żeli poliakrylamidowych

5.15.1. Barwienie Coomassie Brilliant Blue

Żele poliakrylamidowe po rozdziale elektroforetycznym płukano w roztworze Coomassie Brilliant Blue (Materiały 4.10) i wytrząsano na niskich obrotach przez 30 min. Żele odbarwiano w roztworze odbarwiającym O (Materiały 4.10) z wytrząsaniem przez noc.

5.15.2. Barwienie srebrem

Po rozdziale elektroforetycznym, żele poliakrylamidowe płukano w 50% roztworze metanolu (Materiały 4.10) przez 1 h. Następnie żele inkubowano w świeżo przygotowanym roztworze srebra (Materiały 4.10) z delikatnym wytrząsaniem przez ok. 15 min. Kolejno przeprowadzano 3 płukania wodą dejonizowaną, każde po 5 min i inkubowano z roztworem wywołującym (Materiały 4.10). Inkubację prowadzono do momentu pojawienia się wyraźnych prążków na żelu. Po pojawieniu się prążków, żel płukano wodą dejonizowaną, a następnie zatrzymywano reakcję poprzez dodanie buforu stopującego (Materiały 4.10).

5.16. Dichroizm kołowy (CD)

Drugorzędową strukturę wariantów białek TrfA-33, TrfA-44, RepA i RepE poddano analizie z wykorzystaniem widma dichroizmu kołowego (CD). Pomiary wykonywano przy użyciu spektrometru CD Jasco J-1500 wyposażonego w termostatowany uchwyt kuwety PTC-517 Peltier (Materiały 4.14). Widma uzyskiwano poprzez pomiar białek o stężeniu 3 μM w 25 mM KPi (pH 7,2), 100 mM KCl i 1 mM DTT w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 1cm. Dane rejestrowano w zakresie długości fali od 195 do 260 nm z prędkością 50 nm/min w temp. 25°C. Pomiary z pięciu widm uśredniano, a rejestrowany sygnał przeliczano na eliptyczność molową na resztę aminokwasową:

$$(\Theta)\text{MRW} \text{ (deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}\text{)} \text{ według zależności: } (\Theta)\text{MRW} = (\Theta_{\text{obs}}) / 10 \cdot n \cdot 1 \cdot C,$$

gdzie (Θ_{obs}) - eliptyczność wyrażona w mdeg, n - ilość reszt aminokwasowych, C - stężenie molowe wyrażone w mol/dm³, l - długość drogi optycznej wyrażona w cm.

Zawartość struktury wtórnej obliczano przy użyciu pakietu oprogramowania Spectra Manager ver.2, Jasco.

5.17. Sieciowanie kompleksów nukleoproteidowych i ich analiza w spektrometrii mas
30 μ l mieszaniny reakcyjnej do sieciowania UV zawierało 1 μ M ssDNA z wewnętrzną modyfikacją 5BrdU (5- Bromo-2-Deoksyurydyna) (Materiały 4.3), 5 μ M białka RepA, 40 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 20mM Tris-HCl (pH 8), 4% sacharoza, 4 mM ATP, 11 mM Mg(OAc)₂. Mieszaninę inkubowano w temp. 32°C przez 30 min. Sieciowanie UV prowadzono przez 360 s, długością fali 302 nm przy natężeniu 8W z użyciem lampy UV Tube for EL Series UV Lamps (UVP) (Materiały 4.14). Następnie przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne próbek w 10% żelu SDS-PAGE (Metody 5.12), który barwiono roztworem srebra (Metody 5.15.2). Prążki odpowiadające kompleksom nukleoproteinowym wycinano z żelu i odbarwiano zestawem SilverQuestTM Silver Staining Kit (Materiały 4.13). Następnie wycięte prążki płukano 50 mM wodorowęglanem amonu (ABC) (Materiały 4.10), odwadniano 50 μ M acetonitrylem (ACN) (Materiały 4.10) i zredukowano 10 mM DTT (Materiały 4.11). Następnie próbki poddawano alkilacji 55 mM jodoacetamidem (IAA) (Materiały 4.10) i ponownie płukano buforem ABC. DNA trawiono 1 μ l benzonazy (Materiały 4.7) w temp. 30°C przez noc z wytrząsaniem. Proteolizę przeprowadzono dodając 12.5 ng/ μ l trypsyny (Materiały 4.7), a następnie mieszaninę inkubowano w 37°C przez 2 h. W celu ekstrakcji peptydów z żelu, fragmenty żelu sonikowano w 100% ACN, następnie dodawano 0.5% kwasu trifluorooctowego (TFA) (Materiały 4.10) rozcieńczonego w ACN i ponownie sonikowano. Na koniec powtarzano sonikację w 100% stężonym roztworze ACN. Próbki poddawano suszeniu próżniowemu i rozpuszczano w 10 μ l 0.1% TFA. Peptydy oczyszczano z użyciem kolumny Top-Tip C-18 (Glygen) (Materiały 4.13), po czym eluowano 20 μ l 0.3 M roztworem amoniaku (Materiały 4.10). Próbki analizowano techniką spektrometrii mas MALDI TOF przy użyciu spektrometru mas 5800 MALDITOF/TOF (AB Sciex, Framingham, MA, USA) z detekcją w liniowej masie środkowej w zakresie od 5000 do 20 000 Da, tryb jonów dodatnich na łącznie 1000 strzałów lasera za pomocą lasera OptiBeam 1 kHz (YAG, 349 nm) (Materiały 4.14). Dane zbierano za pomocą oprogramowanie Data Explorer (AB Sciex). Masy peptydów porównano z przewidywanymi (FindPept i PeptideMass) dla trawienia trypsyną RepA, uwzględniając pominięte rozszczepienia. Pojedyncze piki wyznaczano jako potencjalnie utrwalone kompleksy peptydów z DNA i porównano masy peptydów doświadczalnych z masami obliczonymi dla dowolnej pary peptydów trypsynowych. W obliczeniach

uwzględniono co najmniej jedną niestrawioną wewnętrzną resztę Lys (Gasser-Rosa F. i wsp., 2008).

5.18. Porównanie sekwencji białek Rep

Porównanie struktur drugorzędowych białek inicjujących replikację wykonano z użyciem oprogramowania of PROMALS3D serwer (prodata.swmed.edu/promals3d/). Porównywano sekwencje drugorzędowe struktury białek TrfA, RepE i RepA. W oparciu o wiedzę, że struktury drugorzędowe białek Rep są konserwowane (Giraldo R., 2003; Sharma S. i wsp., 2004; Węgrzyn i wsp., 2021), założono, że interakcja Rep-ssDNA odbywa się poprzez homologiczne domeny i reszty aminokwasowe w pozostałych białkach Rep. Na podstawie struktury krystalograficznej białka RepE i analizy MS dla białek TrfA, RepA i RepE (Metody 5.17) oraz porównania sekwencji drugorzędowych struktur białek Rep, dla poszczególnego białka Rep wyznaczono aminokwasy potencjalnie mające znaczenie w oddziaływaniu z ssDNA.

5.19. Replikacja *in vitro* w ekstrakcie bakteryjnym

Do przeprowadzenia replikacji *in vitro* w ekstrakcie bakteryjnym w rejonie *oriV* plazmidu RK2, jako matrycy DNA używano superzwiniętej formy plazmidu pKD19L1 (Materiały 4.2), będącego minireplikonem plazmidu RK2 (Materiały 4.2). Ekstrakt bakteryjny zawierający frakcje białek replikacyjnych izolowano z komórek *E. coli* C600 (Materiały 4.1) (Metody 5.8). 20 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierało 40 mM Hepes-KOH pH 7.6, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 80 μ g/ml BSA, 4% cukroza, 4 mM DTT, 11 mM Mg(OAc)₂, 2 mM ATP, 50 mM KCl, 500 μ M każdego CTP, GTP i UTP, 80 mM kinazy fosforanowej, 16 μ g/ml kinazy keratynowej, 50 μ M każdego z deoksyrybonukleotydów, 5% PEG 6000, 150 cpm/pmol [metylo-3H]-dTTP, 250 ng superzwiniętej matrycy pKD19L1, 1 μ l ekstraktu bakteryjnego z komórek *E. coli* C600 oraz wzrastające stężenia wariantów białka TrfA33 (10, 50, 100, 150, 250, 400 nM). Mieszaniny inkubowano w temp. 32°C przez 1.5 h, a następnie zatrzymywano reakcje poprzez dodanie 1 ml buforu STOP (0.1 M pirofosforan sodu i 10% TCA) (Materiały 4.6.2). Reakcje filtrowano przez filtry z mikrofibry szklanej Whatman GF/C (Materiały 4.13). Pomiar syntezy DNA i całkowite wbudowanie nukleotydów mierzono z użyciem licznika scyntylicyjnego Liquid Scintillator, po czym przeliczano na wartość wyrażoną w piko-molach (Materiały 4.14).

5.20. Opóźnienie migracji prążka w żelu (EMSA) – elektroforeza DNA w żelu poliakrylamidowym

5.20.1. Znakowanie dwuniciowych fragmentów DNA

W celu przygotowania znakowanych fragmentów dwuniciowego DNA zawierającego miejsca iteronowe plazmidu RK2 lub plazmidu P1, przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) z wykorzystaniem starterów znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym Cy3 (Materiały 4.3). Składy mieszanin reakcyjnych przedstawiono w Tabeli 2. Parametry reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 2 Składy mieszanin reakcyjnych użyte do przeprowadzenia znakowania fragmentów dsDNA zawierającego iterony plazmidu RK2 lub P1. Do wyznakowania miejsc iteronowych oriV użyto plazmidu RK2 (Materiały 4.2). Do wyznakowania miejsc iteronowych oriP1 użyto plazmidu P1 (Materiały 4.2).

dsDNA _{iterony} plazmidu RK2		dsDNA _{iterony} plazmidu P1	
2X buf. Marathon	1X	10X buf. WALK	1X
10 mM dNTPs	250 μM każdy	10 mM dNTPs	250 μM każdy
Cy3-oriV-It _{bot}	200 ng	Cy3-oriP1-It _{top}	100 nM
oriV-It _{top}	200 ng	oriP1-It _{bot}	100 nM
RK2	500 ng	P1	500 ng
Pol. Marathon	1 U	Pol. WALK	2 U
Końcowa objętość (V)	50 μl	Końcowa objętość (V)	50 μl

Tabela 3 Parametry reakcji PCR do przeprowadzenia znakowania fragmentów dsDNA zawierającego iterony plazmidu RK2 lub P1.

	RK2			P1		
	Temp.	Czas	Cykle	Temp.	Czas	Cykle
Wstępna denaturacja	93°C	1 min	1	98°C	30 s	1
Denaturacja	93°C	30 s	30	98°C	30 s	30
Hybrydyzacja	56°C	30 s		57,5°C	30 s	
Elongacja	68°C	45 s		72°C	26 s	
Końcowa elongacja	68°C	3 min	1	72°C	5 min	1

5.20.2. Eksperyment EMSA wariantów białka TrfA z ssDNA i z dsDNA

Analizie poddawano oddziaływanie wariantów białka TrfA z ssDNA *oriV_{DUE_bottom}* i dsDNA *oriV_{iterony}*. Mieszanina reakcyjna o objętości 20µl zawierała: 40mM HEPES-KOH pH 7.6, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5mM ATP, 11mM Mg(OAc)₂, 4mM ditiotretitol, 80µl/ml BSA, 20 ng/µl kompetytora poly (dI-dC) (tylko w przypadku reakcji z ssDNA), 0.5 pmola ssDNA znakowanego fluorescencyjnie (Materiały 4.3) lub dsDNA znakowanego fluorescencyjnie (Metody 5.19.1) oraz wzrastające stężenia wariantów białka TrfA33 (10, 50, 100, 150, 250 nM). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 32°C przez 20 min. W celu zatrzymania reakcji dodawano 25% wodny roztwór fikolu 400 (Materiały 4.10) do końcowego stężenia 2.5% (w/v). Próbkę po reakcji rozdzielano poprzez elektroforezę w niedenaturującym 5% żelu poliakrylamidowym (Materiały 4.12). Rozdział prowadzono przy napięciu 115 V przez 45 min w przypadku reakcji z ssDNA i przez 2 h w przypadku reakcji z dsDNA.

5.20.3. Eksperyment EMSA wariantów białka RepA z ssDNA i z dsDNA

Analizie poddawano oddziaływanie wariantów białka RepA z ssDNA *oriPI_{DUE_top}*, ssDNA *oriPI_{DUE_bottom}* oraz dsDNA *oriPI_{iterony}*. Mieszanina reakcyjna o objętości 20µl zawierała: 40mM HEPES-KOH pH 7.6, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5mM ATP, 11mM Mg(OAc)₂, 4mM ditiotretitol, 80µl/ml BSA, 20 ng/µl kompetytora poly-(dI-dC) (tylko w przypadku reakcji z ssDNA), 0.5 pmola ssDNA znakowanego fluorescencyjnie (Materiały 4.3) lub dsDNA znakowanego fluorescencyjnie (Metody 5.19.1) oraz wzrastające stężenia wariantów białka RepA. Dla reakcji z ssDNA przeprowadzono miareczkowanie białka RepA w następujących stężeniach 250, 500, 1000, 1500 nM, zaś dla reakcji z dsDNA stężenia białka RepA były następujące 4, 8, 16, 32 nM. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 32°C przez 20 min. W celu zatrzymania reakcji dodawano 25% fikolu 400 (Materiały 4.12) do końcowego stężenia 2.5% (w/v). Próbkę po reakcji rozdzielano poprzez elektroforezę w niedenaturującym 5% żelu poliakrylamidowym (Materiały 4.12). Rozdział prowadzono przy napięciu 115V przez 45 min w przypadku reakcji z ssDNA oraz 1.5 h w przypadku reakcji z dsDNA.

5.21. Plazmonowy rezonans powierzchniowy (SPR)

Analizę oddziaływań molekularnych z użyciem Plazmonowego Rezonansu Powierzchniowego przeprowadzono używając oprogramowania BiacoreT200 software

w aparacie Biacore T200 (Materiały 4.14) oraz sensorów Biacore Series S Sensor Chip SA (Materiały 4.13), których powierzchnia jest pokryta warstwą dekstranów kowalencyjnie związanych ze streptawidyną. W celu przygotowania sensora do analiz, jego powierzchnię płukano buforem TNE (Materiały 4.6.1), a następnie trzykrotnie nastrzykiwano po 10 μ l buforu WS (Materiały 4.6.1). Przed rozpoczęciem immobilizacji DNA, wykonywano nastrzyk 70% glicerolem w celu zrównoważenia detektora.

Do immobilizacji DNA używano fragmentów jednoniciowego DNA biotynylowanego na końcu 5' DNA (Materiały 4.3) oraz dwuniciowego DNA, powstałego w skutek hybrydyzacji (Metody 5.5) dwóch fragmentów jednoniciowego DNA, w którym jedna z nici była biotynylowana na 5'-końcu (Materiały 4.3). Fragmenty ssDNA zawierały jedną z nici (górną lub dolną) rejonu DUE origin replikacji, bogatego w pary AT. Fragmenty dsDNA zawierały sekwencje iteronowe *origin* replikacji. Zarówno ssDNA, jak i dsDNA przygotowywano w buforze TNE, do końcowego stężenia 1.7 nM. Na powierzchnię jednego z kanałów sensora nastrzykiwano DNA przy przepływie 20 μ l/min do osiągnięcia odpowiedniego poziomu odpowiedzi RU (*ang.* Response Units; gdzie 1 RU odpowiada 1 pg/mm² substratu). Drugi z kanałów pozostawał pusty, jako kanał referencyjny. Fragmenty ssDNA immobilizowano na powierzchni sensora do poziomu 20 RU, zaś fragmenty dsDNA immobilizowano na powierzchni sensora do poziomu odpowiedzi 60 RU. Niezwiązany DNA usuwano poprzez płukanie powierzchni sensora 0.2% roztworem SDS.

W celu przeprowadzenia analizy kinetyki oddziaływania białek z DNA, powierzchnię sensora z immobilizowanymi fragmentami DNA płukano buforem HBS-EP (Materiały 4.6.1). W tym samym buforze przygotowywano rozcieńczenia analizowanych białek. Dla wariantów białka TrfA33 stężenia wynosiły: 2, 5, 7.5, 15, 30, 60 nM. Dla wariantów białka RepA stężenia wynosiły: 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 15 nM. Nastrzyk analitu prowadzono przy przepływie 20 μ l/min przez 200 s. Czas dysocjacji analitu wynosił 120 s. Powierzchnię sensora regenerowano 0.2% roztworem SDS.

5.22. Footprinting z użyciem KMnO₄

5.22.1. Modyfikacja ssDNA z użyciem KMnO₄

Otwieranie *origin* replikacji *oriV* plazmidu RK2 i *oriS* plazmidu F z użyciem KMnO₄ przeprowadzono, jak opisano poprzednio (Konieczny i wsp., 1997) z modyfikacjami. W skład 25 μ l mieszaniny reakcyjnej wchodził 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM Hepes-KOH pH 7.6, 80 μ g/ml BSA, 4% sacharoza; 4 mM DTT, 11 mM Mg(OAc)₂, 2 mM ATP,

500 μ M GTP, CTP, UTP każdego, 8 mM fosforan kreatyny, 20 mg/ml kinazy kreatynowej, 8 ng białka HU, 200 ng białka DnaA, 300 ng DNA w postaci super-zwiniętej matrycy plazmidowego DNA, odpowiednio pKD19L1 lub pZZ35 (Materiały 4.2) oraz odpowiednio 200 ng wariantów białka TrfA33 lub 100 ng białka RepE. Mieszanki reakcyjne inkubowano w temp. 37°C przez 15 min., następnie dodawano KMnO_4 do końcowego stężenia 9 nM i wydłużano inkubację o kolejne 3 min. Reakcję zatrzymywano przez dodanie β -merkaptoetanolu do końcowego stężenia 1.5 M i EDTA do końcowego stężenia 15 mM. DNA otrzymany po reakcji Footprinting, oczyszczano za pomocą zestawu GeneClean Kit II (Materiały 4.13; Metody 5.22.2).

5.22.2. Oczyszczanie plazmidowego DNA po reakcji modyfikacji

Do oczyszczenia plazmidowego DNA po reakcji PCR używano komercyjnego zestawu GeneClean II Kit (MP). Oczyszczanie prowadzono zgodnie z protokołem producenta z modyfikacjami. Na każde 70 μ l otrzymanego po reakcji otwierania DNA, dodawano 15 μ l roztworu GlassMilk. Następnie prowadzono elucję z użyciem 70 μ l ciepłej wody wolnej od DNaz i RNaz (Materiały 4.13), z czego po osadzeniu złoża pobierano i przenoszono do nowej probówki 55 μ l supernatantu zawierającego oczyszczony DNA.

5.22.3. Reakcja wydłużenie startera

Reakcje wydłużania startera w rejonie *oriV* plazmidu pKD19L1 i rejonie *oriS* plazmidu pZZ35 prowadzono z użyciem starterów znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym Cy3 (Materiały 4.3). Skład poszczególnych mieszanin reakcyjnych przedstawiono w Tabeli 4. Matrycowy DNA wykorzystany w reakcjach PCR, otrzymywano po reakcji otwierania z użyciem KMnO_4 (Metody 5.22.1) i oczyszczania z użyciem zestawu GeneClean® II Kit (MP) (Metody 5.22.2). Warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 5. W celu zatrzymania reakcji PCR dodawano 15 μ l buforu formamidowego (Materiały 4.6.1), a następnie mieszaninę inkubowano w temp. 95°C przez 3 min. Produkty reakcji wydłużenia startera rozdzielano w 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 8 M mocznikiem i buforem 0,5 x TBE (Materiały 4.12). Elektroforezę prowadzono jak opisano w Metody 5.14.

Tabela 4 Składy mieszanin reakcyjnych użytych do przeprowadzenia reakcji wydłużenia startera w miejscu *origin* replikacji *oriV* lub *oriS*.

<i>oriV</i> plazmidu pKD19L1		<i>oriS</i> plazmidu pZZ35	
2X bufor Phanta Max	1X	10X PCR Buf. I	1X
10 mM dNTPs	200 μ M każdy	10 mM dNTPs	200 μ M każdy
Cy3-oriV-Ft	0.08 μ M	Cy3-oriS-Ft	0.08 μ M
pKD19L1	40 ng	pZZ35	40 ng
Phanta Max Super-Fidelity DNA Pol.	0.5 U	AmpliTaq Gold® DNA Pol.	0.625 U
Końcowa objętość (V)	25 μ l	Końcowa objętość (V)	25 μ l

Tabela 5 Parametry reakcji PCR do przeprowadzenia reakcji wydłużenia startera w miejscu *origin* replikacji *oriV* lub *oriS*.

	pKD19L1			pZZ35		
	Temp.	Czas	Cykle	Temp.	Czas	Cykle
Wstępna denaturacja	95°C	3 min	1	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	30	95°C	15 s	30
Hybrydyzacja	72°C	30 s		66°C	30 s	
Elongacja	72°C	15 s		72°C	20 s	
Końcowa elongacja	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1

5.23. Test immunoenzymatyczny (ELISA)

Do przeprowadzenia testu typu ELISA używano 96-dołkowych płytek COSTAR 3591 (Materiały 4.13). Do dołków płytki наносono po 500 ng białka BSA (Materiały 4.7) (kontrola negatywna) lub wariantów białka TrfA-33. Płytki z białkiem inkubowano w temp. pokojowej przez 1h. Następnie każdy dołek płukano dwukrotnie 100 μ l buforu A (Materiały 4.6.1), po czym dodawano 200 μ l buforu A i płytkę inkubowano w temp. pokojowej przez 1h (blokowanie miejsc niezwiązanych przez warianty białka TrfA33). Następnie każdy dołek płukano jednokrotnie 100 μ l buforu B (Materiały 4.6.1), po czym

miareczkowano białkiem DnaB (7, 15, 30, 60, 125, 250, 500 ng) i inkubowano w temp. 30°C przez 30 min. Dołki ponownie płukano 100 µl buforu B, a następnie trzykrotnie 100 µl buforu A. Na każdy dołek наносono po 100 µl roztworu I-rzędowych króliczych przeciwciał anti-DnaB (Materiały 4.8) rozcieńczonych w buforze A w stosunku 1:1000, po czym płytkę inkubowano w temp. pokojowej przez 1.5 h. Powtarzano trzykrotnie płukanie 100 µl buforu A. Następnie na każdy dołek наносono po 100 µl II-rzędowych kozich przeciwciał anti-króliczych IgG wyznakowanych peroksydazą chrzanową (HRP) (Materiały 4.8) rozcieńczonych w buforze A w stosunku 1:3000. Płytki inkubowano w temp. pokojowej przez 45 min. Po zakończeniu inkubacji, dołki w płytkach płukano trzykrotnie 100 µl buforu A. Do wywołania testu używano zestawu roztworów TMB peroxidase EIA (Materiały 4.11) zgodnie z protokołem producenta. Nanoszono po 100 µl roztworów TMB i peroksydazy wodorowej w stosunku 9:1. Test wywoływano przez 8 minut. W celu zatrzymania reakcji, na każdy dołek наносono po 100 µl 1 N roztworu H₂SO₄ (Materiały 4.10). Odczyt absorbancji prowadzono w czytniku płytek Spektrofotometr EPOCH 2 (Materiały 4.14) przy długości fali 450 nm.

5.24. Test aktywności helikazy w rejonie *oriV* plazmidu RK2 (FI*)

Do przeprowadzenia testu aktywności helikazy DnaB w rejonie *oriV* plazmidu RK2, jako matrycy DNA używano superzwiniętej cząsteczki plazmidu pKD19L1 (Materiały 4.2). W skład 25 µl mieszaniny reakcyjnej wchodził 40 mM Hepes-KOH pH 7.6, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 80 µg/ml BSA, 4% sacharoza, 4 mM DTT, 11 mM Mg(OAc)₂, 4 mM ATP, 40 mM kinazy fosforanowej (CP) pH 7.6, 0.08 µg/µl kinazy kreatynowej (CK), 125 ng superzwiniętego plazmidowego DNA pKD19L1, 100 nM DnaB, 2 nM gyraza, 1 µM DnaC, 8 nM DnaA, 100 nM HU, 115 nM SSB, 125 ng superzwiniętej matrycy pKD19L1 oraz wzrastające stężenia wariantów białka TrfA33 (10, 50, 100, 150, 250, 400 nM). Reakcję prowadzono w temp. 32°C przez 30 min., po czym dodawano 5 µl buforu stopującego i całość inkubowano w temp. 65°C przez 5 min. Reakcje rozdzielano poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym przy natężeniu 25 V przez 24 godziny (Metody 5.11). Następnie żel barwiłam w roztworze EtBr, po czym odbarwiałam przez noc w czystej wodzie (Metody 5.12.2).

5.25. Reakcja sekwencjonowania

5.25.1. Denaturacja dsDNA do ssDNA – przygotowanie matrycy DNA do sekwencjonowania

W celu uzyskania jednoniciowego łańcucha plazmidowego DNA wykorzystywanego do reakcji sekwencjonowania, cząsteczkę dsDNA poddawano denaturacji. W tym celu 1 µg plazmidowego dsDNA rozcieńczano w 18 µl H₂O i dodawano 2 µl mieszaniny składającej się z 2 M NaOH i 2 mM EDTA pH 8.0. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 37°C przez 15 min., po czym przekładano na lód i dodawano 2 µl 2 M CH₃CO₂NH₄. W celu oczyszczenia ssDNA ze składników mieszaniny reakcyjnej, DNA precypitowano dodając 60 µl 96% etanolu i inkubowano w temp. -80°C przez 15 min. Następnie ssDNA osadzano przez wirowanie przy prędkości 15 000 obrotów/min. w temp. 4°C przez 15 min. ssDNA płukano 300 µl 70% etanolu, powtarzano wirowanie, po czym usuwano etanol. ssDNA zawieszano w 20 µl H₂O wolnej od DNaz i RNaz, i mierzono stężenie (Metody 5.4).

5.25.2. Reakcja sekwencjonowania

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzano z użyciem zestawu do sekwencjonowania Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Materiały 4.13). Do reakcji sekwencjonowania *oriV*, jako matrycy używano ssDNA otrzymany po reakcji denaturacji plazmid pKD19L1 (Metody 5.24.1) oraz znakowany znacznikiem Cy3 na 5'- końcu starter Cy3-oriV-Ft (Materiały 4.3). Do reakcji sekwencjonowania *oriS*, jako matrycy używano ssDNA otrzymany po reakcji denaturacji plazmidu pZZ35 (Metody 5.24.1) oraz znakowany znacznikiem Cy3 na 5'- końcu starter St. Cy3-oriS-Ft (Materiały 4.3). W skład 16 µl mieszaniny reakcyjnej wchodziły 1 x stężony bufor reakcyjny, 160 ng matrycowego ssDNA, 16 nM odpowiedni starter oraz Thermo Sequenase z termostabilną pirofosfatazą. Następnie mieszaninę rozdzielano do 4 probówek zawierających odpowiednio 4 µl ddTTP Termination Mix (7-deaza_dGTP), ddATP Termination Mix (7-deaza_dGTP), ddGTP Termination Mix (7-deaza_dGTP) lub ddCTP Termination Mix (7-deaza_dGTP). Mieszaniny reakcyjne poddawano reakcji PCR, której parametry przedstawiono w Tabeli 6. Produkty reakcji sekwencjonowania rozdzielano w 10% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 8 M mocznikiem i buforem 0,5 x TBE (Materiały 4.12). Elektroforezę prowadzono jak opisano w Metody 5.14.

Tabela 6 Parametry reakcji PCR do przeprowadzenia sekwencjonowania origin replikacji *oriV* lub *oriS*.

	pKD19L1			pZZ35		
	Temp.	Czas	Cykle	Temp.	Czas	Cykle
Wstępna denaturacja	95°C	30 s	1	95°C	30 s	1
Denaturacja	95°C	30 s	40	95°C	30 s	40
Hybrydyzacja	72°C	30 s		66°C	30 s	
Elongacja	72°C	30 s		72°C	20 s	
Końcowa elongacja	72°C	3 min	1	72°C	3 min	1

5.26. Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Mikroskopię sił atomowych ssDNA, białek (RepE lub TrfA) i kompleksów nukleoproteinowych przeprowadzano przy użyciu BioScope Resolve AFM (Bruker, Brema, Niemcy) w temp. 23°C. Reakcje przeprowadzano w 10 mM Tris (pH 7,6), 100 mM KCl, 50 μM spermidyny o końcowym stężeniu 5 nM ssDNA i 30 nM białka (RepE lub TrfA), które inkubowano w temp. 32°C przez 10 min. Następnie próbki osadzano na świeżo oczyszczonej powierzchni miki i inkubowano w temp. pokojowej przez 5 minut, po czym przemywano wodą dejonizowaną i suszono strumieniami gazowego azotu przed obrazowaniem AFM. Do obrazowania sił atomowych wykorzystano sondę ScanAsyst-Fluid+ (Bruker) (częstotliwość rezonansowa $f_0 = 150$ kHz; stała sprężystości $k = 0,7$ N/m). Obrazy wykonywano w rozdzielczości 512×512 pikseli z częstotliwością wynoszącą 1 kHz i amplitudą 150 nm. Sygnał czujnika wzrostu wykorzystano do wyświetlenia obrazu białka przy użyciu NanoScope Analysis v1.9 (Bruker, Bremen, Niemcy). Dla każdego rodzaju próbki obliczono średnią objętość cząstek skanowanych na powierzchni miki z użyciem oprogramowania NanoScope Analysis v1.9.

6. WYNIKI

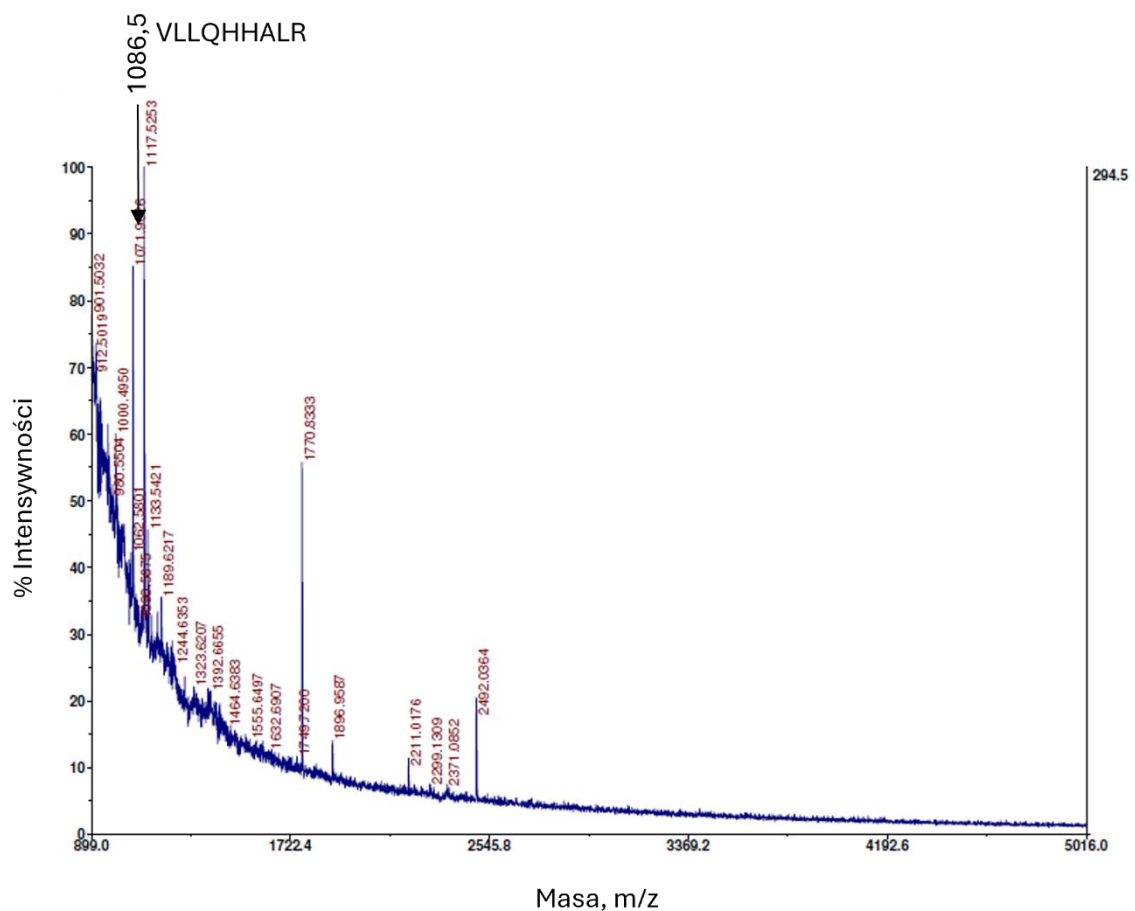
Moja praca doktorska jest częścią projektu SONATA 13 2017/26/D/NZ1/00239 oraz częścią publikacji Węgrzyn i wsp. z 2023 roku. Dla zachowania ciągłości logicznej oraz lepszego zrozumienia pełnego kontekstu projektu, w niniejszej rozprawie doktorskiej umieściłam i opisałam również niektóre wyniki otrzymane przy udziale osób zaangażowanych w ten projekt. W każdym przypadku zostało to zaznaczone w tekście rozprawy, zaś dodatkowe wyniki zostały umieszczone w rozdziale: 9. WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE. Na potrzeby mojej pracy doktorskiej: oczyściłam wszystkie warianty białka TrfA, RepA oraz dwa warianty białka RepE (WT oraz F146E); dodatkowo zaprojektowałam mutagenезę miejscowo specyficzną, a następnie oczyściłam warianty białka TrfA: K127E, R194E, R259E; wytypowałam aminokwasy mogące mieć znaczenie w oddziaływaniu z ssDNA, zaprojektowałam mutagenезę miejscowospecyficzną, a następnie oczyściłam następujące warianty białka RepA: Y190E, Q195E, R200E, R269E; przeprowadziłam sieciowanie UV z ssDNA białka RepA, a następnie przeprowadziłam analizę spektrometrii mass; przygotowałam roztwory wariantów białka TrfA i RepE do analizy struktury II-rzędowej z wykorzystaniem dichroizmu kołowego; przeprowadziłam analizę aktywności replikacyjnej wariantów białka TrfA; przeprowadziłam analizę aktywności helikazy w *oriV* oraz analizę oddziaływania helikazy z wariantami białka TrfA; zoptymalizowałam oraz wykonałam analizę otwierania *origin* replikacji *oriV* i *oriS* dla wariantów białka TrfA i RepE; zoptymalizowałam oraz przeprowadziłam sekwencjonowanie rejonów DUE *origin* replikacji *oriV* i *oriS*; przeprowadziłam analizy oddziaływania wariantów białka TrfA z dsDNA i ssDNA *oriV* przy użyciu technik EMSA oraz SPR; przygotowałam preparaty wariantów białka TrfA do analizy AFM; wykonałam ryciny znajdujące się w tekście główny rozprawy doktorskiej. Wyniki i ryciny umieszczone w rozdziale 9. WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE zostały uzyskane przez dr Katarzynę Węgrzyn i pochodzą z naszej publikacji: Węgrzyn K., Oliwa M., Nowacka M., Zabrocka E., Bury K., Purzycki P., Czaplewska P., Pipka J., Nowotny M., Giraldo R., Konieczny I., (2023). Rep molecule accomodates both up together dsDNA and ssDNA which contributes a loop-back mechanism for DNA replication initiation. *Nuclei Acids Res.*, 51(19) 10551-10567; nadprodukowałam oraz oczyściłam pozostałe białka niezbędne do przeprowadzenia opisanych tu analiz: DnaA, DnaB, DnaC, gyrazę

Do projektu wybrałam trzy modele badawcze. Pierwszym modelem badawczym było białko TrfA, pochodzące z plazmidu RK2, drugim białko RepE z plazmidu F oraz trzecim białko RepA z bakteriofagowego plazmidu P1. W niniejszej pracy wykorzystałam krótszą wersję białka TrfA o masie 33 kDa. Wszystkie warianty białek Rep użyte do analizy były w wersji aktywnej replikacyjnie (monomery). Monomeryczne warianty białek Rep uzyskałam, dzięki ekspresji genów kodujących te białka z wprowadzonymi punktowymi mutacjami. W przypadku białka TrfA wykorzystałam wariant posiadający substytucje: G254D i S267L. W przypadku białka RepE wykorzystałam wariant z substytucją: R118E. Natomiast, jako monomeryczny wariant białka RepA, wykorzystałam białko z substytucjami: V134E/K142E/N156E. Na potrzebę tej pracy wszystkie wyżej wymienione warianty białek Rep, będące w aktywnej replikacyjnie postaci monomerycznej, są określane, jako dzikie warianty białek, WT (*ang. Wild Type*).

6.1. Identyfikacja reszt aminokwasowych białek Rep odpowiedzialnych za wiązanie ssDNA DUE.

Aby zidentyfikować reszty aminokwasowe potencjalnie mające znaczenie w wiązaniu białek Rep do ssDNA DUE zastosowano reakcję sieciowania UV fragmentów ssDNA i białek, połączoną z analizą spektrometrii mas (MS) opisaną w Metody 5.16. Analiza dotycząca białka RepA została przeprowadzona przeze mnie, natomiast analizy dla białek TrfA i RepE zostały przeprowadzone w naszym zespole, jak opisałam to w dalszej części pracy. Do przeprowadzenia analizy z białkiem RepA wykorzystałam fragmenty ssDNA, które posiadały wewnętrzną modyfikację w dwóch różnych miejscach w sekwencji, w których jedna z tyminy została zastąpiona modyfikacją 5-Br-dU. Użycie ssDNA z wewnętrzną modyfikacją tyminy na 5-Br-dU umożliwiła sieciowanie wybranego fragmentu z białkiem przy użyciu lampy UV. Sieciowane z RepA fragmenty ssDNA, DUE_{oriP1} T5 oraz DUE_{oriP1} T10 odpowiadają sekwencji fragmentowi sekwencji DUE *oriR* plazmidu P1 i zostały przedstawione w Materiały 4.3. Po reakcji sieciowania, mieszaniny reakcyjne rozdzieliłam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, a następnie wykonałam barwienie srebrem (Metody 5.14.2). Prążki w żelu, które wykazywały retardację w stosunku do prążków uzyskanych od białka RepA niesieciowanego z ssDNA, wytypowałam jako powstałe w skutek utworzenia się kompleksów nukleoproteinowych RepA z fragmentami ssDNA. Następnie wyselekcjonowane prążki

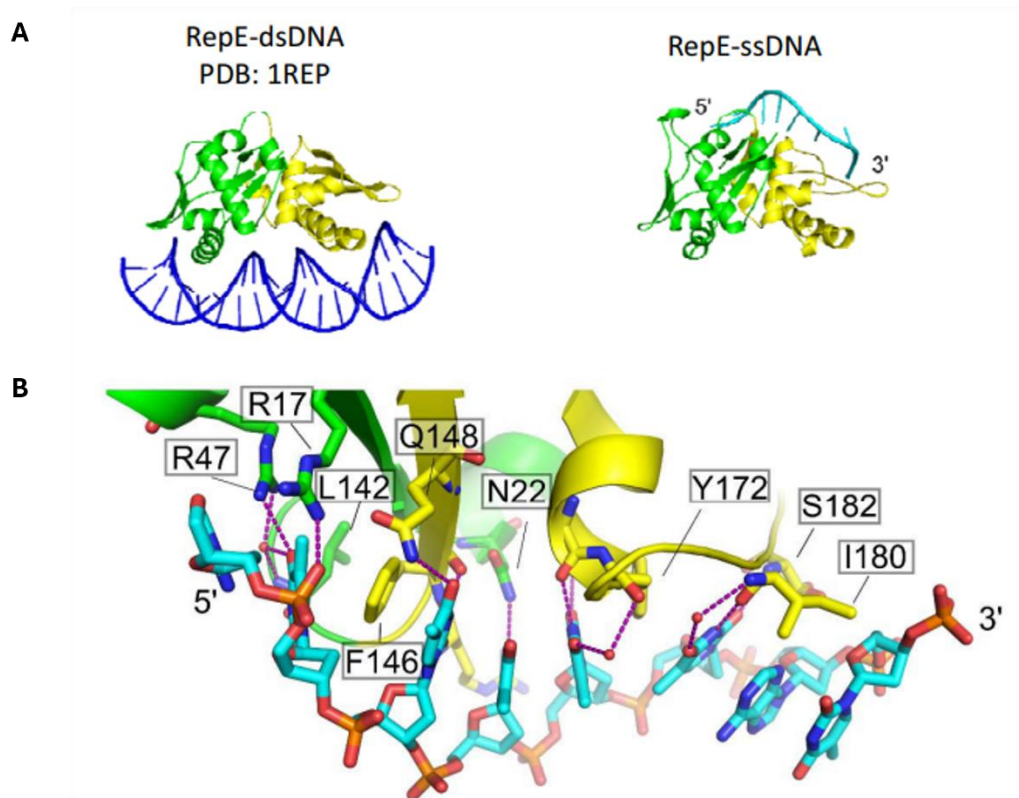
wyciął z żelu i przygotowałam do analizy MALDI-TOF według Metody 5.16. Na podstawie analizy widma MALDI-TOF zidentyfikowałam 1 pik, odpowiadający masie peptydu powstałego w skutek teoretycznego cięcia białka RepA z sieciowanym fragmentem ssDNA, którego sekwencja była następująca: VLLQHHALR. Sekwencja ta jest zlokalizowana w domenie WH2 białka RepA i odpowiada aminokwasom od 122 do 130. Ze względu na słabą jakość widma, analiza MALDI-TOF/TOF nie pozwoliła na dalszą fragmentację i potwierdzenie sekwencji peptydu VLLQHHALR. Jakość pozostałych pików była zbyt niska i nie mogłam poddać ich dalszej analizie przy użyciu metody MALDI-TOF/TOF.



Rycina 11 Widmo MALDI-TOF uzyskane dla białka RepA trawionego trypsyną sieciowanego z ssDNA posiadającym wewnętrzną modyfikację 5-Br-dU. Czarna strzałka wskazuje na zidentyfikowany peptyd.

Analizy identyfikacji reszt aminokwasowych białek TrfA i RepE odpowiedzialnych za wiązanie ssDNA DUE zostały przeprowadzone w naszym zespole przez dr Elżbietę Zabrocką oraz dr Katarzynę Węgrzyn (Węgrzyn i wsp., 2023). W analizach zostały użyte fragmenty ssDNA rejonu DUE, które są specyficznym wiązane przez białka Rep (Węgrzyn i wsp., 2014). Białko TrfA było wiązane z ssDNA DUE_{oriV}, natomiast białko RepE z ssDNA DUE_{oriS}. Białko TrfA WT było sieciowane z trzema fragmentami dolnej nici

ssDNA DUE_{oriV}. Były to fragmenty 13-merów M1, M2 i R: DUE_{oriV} 5T, DUE_{oriV} 7T i DUE_{oriV} 13T. Każda sekwencja posiadała modyfikację substytucji 5-Br-dU w miejscu jednej z tymidyn. Po sieciowaniu, kompleksy TrfA z ssDNA zostały poddane analizie MALDI-TOF. Analiza pozwoliła na identyfikację dwóch pików, odpowiadających peptydom sieciowanym z fragmentami ssDNA DUE_{oriV} 7T o następujących sekwencjach: AMPNDTAR oraz MFDYFSSHR. Pierwsza z sekwencji znajdowała się między 148 a 156 aminokwasem białka TrfA i została zlokalizowana w domenie DBD. Druga sekwencja znajdowała się między 318, a 327 aminokwasem białka TrfA i została zlokalizowana w domenie WH2. Analiza MALDI-TOF/TOF pozwoliła na uzyskanie widma fragmentacji dla peptydu MFDYFSSHR. Otrzymanie widma fragmentacji peptydu AMPNDTAR było niemożliwe, ze względu na zbyt niską jakość próbki. Podobnie za słaba jakość próbek po sieciowaniu peptydów białka z sekwencjami ssDNA DUE_{oriV} 5T i 13T uniemożliwiła dalszą analizę MALDI-TOF (Węgrzyn i wsp. 2023). W przypadku białka RepE WT do analizy MS wykorzystano fragmenty 8-nukleotydowych powtórzeń M1 i M2 górnej nici ssDNA DUE_{oriS} z wprowadzonymi modyfikacjami 5-Br-dU. Modyfikacje zostały wprowadzone w następujących pozycjach DUE_{oriS}: 14T, 19T i 20T. Po sieciowaniu białka RepE z ssDNA DUE_{oriS}, uzyskane i wyselekcjonowane prążki po SDS-PAGE i barwieniu srebrem, poddano analizie MALDI-TOF. Analiza ta pozwoliła na wyselekcjonowanie 7 pików odpowiadających kompleksom ssDNA z peptydami białka RepE o następujących sekwencjach: KPDGSGIVSLK (174-184 aa), TPMR (220-223 aa) i DITMTTG (244-251 aa) sieciowane z ssDNA DUE_{oriS} 14T; FTQFR (146-150 aa) i MPDFR (201-204 aa) sieciowane z ssDNA DUE_{oriS} 19T; KPDGSGIVSLK (174-184 aa) i YQLPQSYQR (192-200 aa) sieciowane z ssDNA DUE_{oriS} 20T. Analiza MALDI-TOF/TOF pozwoliła na potwierdzenie sieciowania peptydu KPDGSGIVSLK do ssDNA DUE_{oriS} 19T i ssDNA DUE_{oriS} 20T oraz peptydu FTQFR do ssDNA DUE_{oriS} 19T. Dla pozostałych pików, jakość analizy MALDI-TOF/TOF była zbyt słaba, aby potwierdzić sekwencje peptydów (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.1.).



Rycina 12 Struktura krystalograficzna kompleksów nukleoproteinowych białka RepE. (A) Struktura krystalograficzna białka RepE z dsDNA odpowiadającemu sekwencji iteronowej (Nakamura i wsp., 2007) oraz z ssDNA (Węgrzyn i wsp., 2023). Domena WH1 białka RepE została oznaczona kolorem zielonym, domena WH2 kolorem żółtym, dsDNA kolorem niebieskim, natomiast ssDNA kolorem jasno-niebieskim (B). Przybliżony obraz fragmentu białka RepE oddziałującego z rejonem bogatym w reszty tymidyny na ssDNA w rejonie DUE. Reszty białek oddziałujące z kwasem nukleinowym pokazano w formie prętów i odpowiednio oznaczono. Oddziałujące atomy są połączone fioletowymi przerywanymi liniami.

Ważnym aspektem niniejszej pracy jest uzyskanie struktury krystalograficznej białka RepE z ssDNA DUE_{oriS} o rozdzielczości 1,85 Å dzięki współpracy dr Katarzyny Węgrzyn i zespołu prof. Marcina Nowotnego przedstawionej na Rycinie 12 (Węgrzyn i wsp., 2023). W strukturze tej białko RepE oddziałuje z pentamerem sekwencji tymidyn ssDNA poprzez określone regiony domen WH1 i WH2 białka RepE (Rycina 12). Interakcja białko-DNA zachodzi poprzez reszty aminokwasowe obecne w alfa-helisach α_1 (N22) i α_2 (R47), na pętli białka (L142) oraz w początkowych fragmentach β -kartki β_1' (F146, Q148), na pętli poprzedzającej (Q171, Y172) i w β_2' (I180, S182). Dodatkowe interakcje powstawały również pomiędzy grupami fosforanowymi ssDNA a łańcuchem bocznym reszty R17 (w β_1) i R145 (pętli poprzedzającej β_1'). Ponieważ zarówno dla białka RepA, jak i TrfA do tej pory nie opublikowano struktur krystalograficznych, które pokazywałyby oddziaływanie tych białek z odpowiednim fragmentem ssDNA rejonu DUE (dla białka RepA z ssDNA_{oriP1} DUE; dla białka TrfA z ssDNA_{oriV} DUE), podjęłam

próbę uzyskania takich danych krystalograficznych. Analiza strukturalna przy użyciu krystalografii rentgenowskiej charakteryzuje się tym, że wymaga użycia bardzo wysokich stężeń badanych preparatów. W przypadku białka RepA, pomimo że udało mi się uzyskać odpowiednie stężenia białka, nie udało się otrzymać kryształów, które mogłyby być poddane dyfrakcji przy użyciu promieniowania rentgenowskiego. W przypadku białka TrfA, niemożliwym było oczyszczenie białka na tyle wysokim stężeniu, by mogło być poddane analizie krystalografii rentgenowskiej. Białko TrfA w wysokich stężeniach wykazuje dużą tendencję do precypitacji.

W przypadku białka TrfA przeprowadzono modelowanie *in silico*, które miało na celu pokazanie modelu struktury potrójnego kompleksu nukleoproteinowego białka TrfA z ssDNA i dsDNA. Modelowanie zostało przeprowadzone dzięki uprzejmości Igora Grochowiny z zespołu prof. Jarosława Mraszałka z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej. Analiza otrzymanego modelu pozwoliła na wytypowanie dodatkowych reszt aminokwasowych, potencjalnie mających znaczenie w oddziaływaniu TrfA z ssDNA, takich jak: R259, znana już R327, R194 i K127.

TrfA-33	98	MTTKRRKTAGEDLAKQVSEAKQAALLKHTKQOIKEMQLSLFDIAPWPDT-----MRA-MPNDTAR	156
RepE	1	MA-----	3
RepA	1	MN-----QSFISDILYADIESKAKELTVNSNNTVQPVALMR	36
Consensus_ss:		hhhhh	
TrfA-33	157	SALFTTRNKKIPR-----EALQNKVIFHNKDKVITYTGVELRADDDELVWQVLEYAKRTP----I	214
RepE	4	TAVINHKRKR-----NSPRIVQS---NDLTEAAYSLSRDQKRMLYLFVDQIRKSDGTLQEH	56
RepA	37	LGVFVPKPSKSKGESKEIDATKAFSQLEIAKAEGYDDIKITGPRLDMDTDFKWTWIGVIYAFSKYGL---S	103
Consensus_ss:		h eeee eeeeeee hhhhhhhhhhhhh	
TrfA-33	215	GEPITFTFYELCQDLGWSI---NGRYTKAEECLSRQATAMGFTSDRV-----GHLESVSLLRFRVLD	276
RepE	57	DGICEIHVAKYAEIFGLTS---AEASKDIRQALKSFAGKEVVFYRPEEDAGDEKGYESFPWFIKRAHSP	122
RepA	104	SNTIQLSFQEFKACGFPKRLDAKLRLLTIHESLGRRLRNKGIAFKRKGK----AKGYQTGLLKVGRFDA	169
Consensus_ss:		eeeehhhhhh hhhhhhhhhhhhh eeeee eeeeeeeeeeeee	
TrfA-33	277	RGKKT SRCQVLIDEIIVVLFAG--DHYTKFIWEKYRKLSP--PTARRMFDYFSSHR-EP----YPLKLET	336
RepE	123	S---RGLYSVHINPYLIPFFIGLQNRFTQFRLSETKET-NPYAMRLYESLQYR-KPDGSGIVSLKIDW	187
RepA	170	D---LDLIELEADSKLWELFQL--DYRVLICHHALALPKKEAAQAIYTFIESLQNP-----LPLSFAR	229
Consensus_ss:		eeeeee hhhhhhh eehhhhhhh hhhhhhhhhhh eee hhh	
TrfA-33	337	FRLMCGSD--STRVKKWREQ-VGEACEELRGSGLVEHAWV--NDDLIVHC-----KR-----	282
RepE	188	IIERYQLPQSYQRMPDFRRRFLQVCVNEINSRTPMRLSYIEKKKGRQTTHIVSFRDITSMTTG--	251
RepA	230	IRERLALQ---SAVGEQNR I- IKKAIEQLKTIG-YLDCSIE-KKGR---ESFVIVHSRNPKLKLEPE	286
Consensus_ss:		hhhh hhhhhh hhhhhhhhh eeeee ee eeeeeeeeeee	

Rycina 13 Zestawienie sekwencji drugorzędowych struktur białek TrfA33, RepE i RepA. W przypadku białka TrfA, RepE oraz białka RepA oznaczono fragmenty sekwencji aminokwasowych, zidentyfikowanych podczas analizy MALDI-TOF, jako te które potencjalnie biorą udział w oddziaływaniu z ssDNA. Kolorem jasnoniebieskim oznaczono sekwencje w białku TrfA. Kolorem szarym oznaczono sekwencje w białku RepE. Kolorem zielonym oznaczono sekwencje w białku RepA. Kolorem czerwonym oznaczono aminokwasy, które wytypowano do dalszych analiz pod względem oddziaływania z ssDNA dla poszczególnych białek Rep. W przypadku białka RepE aminokwasy zostały wybrane w oparciu o analizę MALDI-TOF/TOF oraz analizę struktury krystalograficznej. (Wegrzyn i wsp., 2023) W przypadku białka TrfA33 oraz RepA, aminokwasy zostały wybrane na podstawie wyników z analizy MALDI-TOF oraz analizy porównawczej struktur drugorzędowych białek Rep. Kolorem zielonym oznaczono aminokwasy poszczególnych białek Rep odpowiedzialne za wiązanie dsDNA w *origin* replikacji. Kolorem pomarańczowym oznaczono aminokwasy białka TrfA, wytypowane na podstawie analizy *in silico* modelowania przewidywań wiązania białka TrfA z ssDNA. h - fragmenty sekwencji struktur drugorzędowych tworzących alfa-helisy; e - fragmenty sekwencji struktur drugorzędowych tworzące beta-kartki.

Biorąc pod uwagę strukturę krystalograficzną białka RepE z ssDNA_{oriS}, wyniki analizy spektrometrii mas dla wszystkich trzech białek Rep oraz fakt, że struktura drugorzędowa białek Rep wydaje się być silnie konserwowana (Bowers i wsp., 2007; Giraldo, 2003; Nakamura i wsp., 2007; Sharma i wsp., 2004; Wegrzyn, Zabrocka i wsp., 2021), przyjąłam, że prawdopodobnie oddziaływanie wszystkich białek Rep z ich ssDNA zachodzi za pośrednictwem homologicznych domen oraz reszt aminokwasowych. Porównanie sekwencji pierwszo- i drugorzędowych badanych białek Rep pozwoliło mi na wyselekcjonowanie reszt aminokwasowych białka TrfA oraz białka RepA, potencjalnie odpowiedzialnych za oddziaływanie z ssDNA DUE (Rycina 13). Zarówno reszty aminokwasowe wybrane na podstawie struktury oraz analizy MS dla białka RepE, modelowania oddziaływań białka TrfA z ssDNA i dsDNA, jak i reszty aminokwasowe wybrane na podstawie analizy MS i porównania struktur drugorzędowych dla białek TrfA i RepA, zostały przedstawione w Tabeli 7.

Tabela 7 Zestawienie aminokwasów wytypowanych w białkach Rep, potencjalnie mogących mieć znaczenie w oddziaływaniu białek Rep z ssDNA rejonu DUE odpowiedniego dla poszczególnego *origin* replikacji. Na niebiesko oznaczono warianty białek TrfA i RepA zaprojektowane przeze mnie i wykorzystane do przeprowadzenia mutagenazy miejscowo-specyficznej.

	RepE	TrfA	RepA
Wytypowane aminokwasy	R17	K127	Y190
	N22	R156	R191
	R47	R194	Q195
	R145	R259	R200
	F146	K303	Q220
	Q148	R327	N221
	Q171	N374	R245
	Y172		K266
	R173		R269
	K174		
	R173		
	K174		
	I180		

6.2. Oczyszczanie wariantów białka TrfA

W niniejszym podrozdziale wyniki oczyszczania białek Rep przedstawiłam na przykładzie wariantu białka TrfA R156E, które zostały umieszczone na Ryczeniu 14. Procedura oczyszczania białek Rep jest opisana w Metody 5.9.

Sprawdzenie, czy wytypowane reszty aminokwasowe białek Rep są kluczowe dla oddziaływania i tworzenia kompleksów nukleoproteinowych z ssDNA DUE, wymagało oczyszczenia wariantów białek Rep, z substytucjami, w których wybrane aminokwasy zostały zamienione na aminokwasy o przeciwnym lub neutralnym ładunku. Jak zaznaczyłam w Tabeli 7, samodzielnie zaprojektowałam oraz przeprowadziłam mutagenezę miejscowo-specyficzną dla następujących wariantów białka TrfA: K127, R194 i R259, oraz dla białka RepA: R190, Q195, R200 i R269,. Pozostałe konstrukty znajdowały się w kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej. Do przeprowadzenia mutagenazy miejscowo-specyficzynej dla białka TrfA wykorzystałam wektor pAT30-*trfA33-G253D/S269L* niosący gen białka TrfA33 z dwiema substytucjami pozwalającymi na nadprodukcję monomerycznej i aktywnej replikacyjnie formy białka TrfA (Materiały 4.2). W przypadku białka RepA wykorzystałam wektor pET15b-*repA-V134E/K142E/N156E* niosący gen białka RepA z dwiema substytucjami pozwalającymi na nadprodukcję monomerycznej i aktywnej replikacyjnie formy białka RepA (Materiały 4.2). Wektory amplifikowałam w szczepie bakterii *E. coli* DH5 α (Materiały 4.1) oraz oczyściłam, jak opisano w Metody 5.1.2.. Mutagenaza miejscowo-specyficzna przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych par starterów (Materiały 4.3), wprowadzających substytucje w genach kodujących docelowo badane aminokwasy, umożliwiła mi uzyskanie wektorów ekspresyjnych do nadprodukcji poszczególnych wariantów białek TrfA i RepA (Metody 5.2). Oczyszczone konstrukty trawiłam enzymem DpnI w celu wyeliminowania matrycowego DNA (Metody 5.3). Stężenia oraz czystość otrzymanego materiału genetycznego określałam przy użyciu urządzenia Nano-drop (Metody 5.4). W celu weryfikacji wprowadzenia mutacji w sekwencji genów kodujących warianty ww. białek Rep, otrzymane konstrukty wysłałam do sekwencjonowania. Porównanie otrzymanych sekwencji konstruktów białek z sekwencją białek typu dzikiego potwierdziły poprawność wprowadzonych mutacji.

Następnie szczepy *E. coli* B ArcticExpress (DE3) służące do ekspresji genów oraz nadprodukcji wariantów białka TrfA lub *E. coli* BL21 (DE3) (Materiały 4.1) służące do ekspresji genów oraz nadprodukcji wariantów białka RepA transformowałam uzyskanymi konstruktami wektorowymi według procedury (Metody 5.7). Bakterie

szczepu *E. coli* BL21 (DE3) wprowadziłam w stan kompetencji (Metody 5.6). Bakterie szczepu komercyjnego, *E. coli* B ArcticExpress (DE3), posiadały stan kompetencji i były gotowe do transformacji plazmidowym DNA. Tabela 8 przedstawia wszystkie mutacje wprowadzone do wektorów ekspresyjnych dla poszczególnych białek Rep, które zostały wykorzystane w dalszych etapach projektu.

Tabela 8 Zestawienie mutacji aminokwasów w wektorach ekspresyjnych kodujących geny poszczególnych białek Rep. W tabeli znajduje się zestawienie substytucji poszczególnych aminokwasów w białkach Rep po przeprowadzonej mutageniezie miejscowo-specyficznej. Wprowadzone mutacje miały na celu możliwość nadprodukcji i oczyszczenia wariantów białek Rep w formie monomerycznej, nie oddziałujących z dsDNA lub potencjalnie nieoddziałujących z ssDNA. Kolorem niebieskim oznaczono warianty, których nadprodukcję i oczyszczanie przeprowadziłam samodzielnie. Kolorem czarnym oznaczono warianty białek Rep, które otrzymałam dzięki uprzejmości dr Katarzyny Węgrzyn.

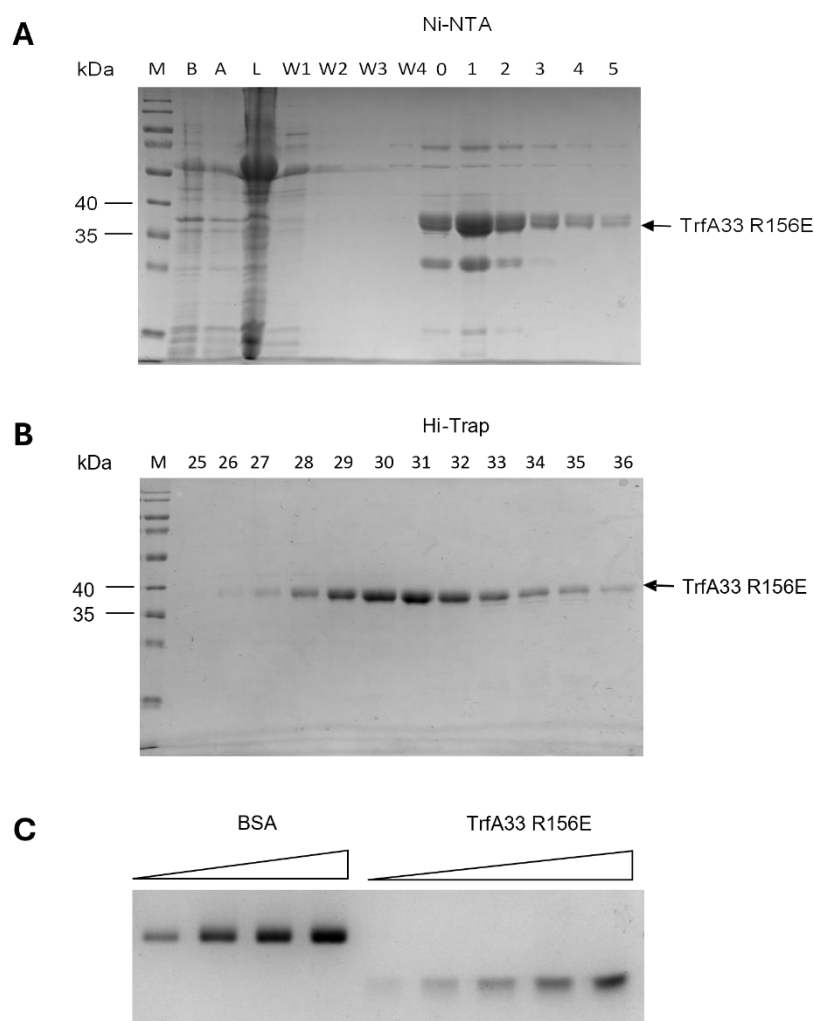
	TrfA	RepE	RepA
WT monomer	G254D/S267L	R118P	H134N/N142K/ G156V
Brak oddziaływania z dsDNA w sekwencji iteronowej	R347E	R205E/R206E/ R207E	R245E
Potencjalny brak oddziaływania z ssDNA rejonu DUE	K127E R156E R194E R259E K303E R327E N374E	R145E F146E Q148E Q171E Y172E K174E R173E/K174E Q210E K229E K230E	Q190E R191E R200E Q220E Q220E/N221E R245E K266E

Tak przygotowane szczepy posłużyły mi do nadprodukcji wariantów białek Rep według opisanych procedur (Metody 5.9.1), (Metody 5.9.2). Indukcja ekspresji genów *trfA* była możliwa poprzez dodanie do hodowli chemicznego analogu laktozy izopropyl- β -d-1-tiogalatopiranozdu (IPTG) (Metody 5.9.1). Prawidłowe zajście nadprodukcji białek weryfikowałam poprzez porównanie intensywności prążków otrzymanych po rozdziale SDS-PAGE, odpowiadającym wielkości oczyszczanego białka z próbek pobranych z hodowli bakteryjnych przed i po nadprodukcji i rozcieńczonych w buforze Laemmli (Rycina 14.A, ścieżki B i A)(Materiały 4.6.1; Metody 5.13). W przypadku wariantów białka TrfA porównanie to zazwyczaj nie wykazywało różnicy w intensywności prążków. Jednak podczas analizy próbek otrzymanych w następujących

etapach oczyszczania wariantów białka mogłam zauważyć znacznie większą intensywność prążków odpowiadających masie białka TrfA ze znacznikiem histydynowym (Rycina 14.A, ścieżki 0-5). W kolejnym kroku rozpoczęłam pierwszy etap oczyszczania wariantów białka TrfA poprzez chromatografię powinowactwa z wykorzystaniem złoża Ni-NTA agarose (Materiały 4.9). Każdy wariant białka TrfA, posiadał na N-końcu znacznik histydynowy helatujący jony dwuwartościowe i silnie wiążący się do złoża niklowego. Oczyszczanie na złożu niklowym przeprowadziłam według procedury opisanej w rozdziale (Metody 5.9.2). Na każdym etapie oczyszczania oraz podczas elucji białka ze złoża, zbierałam frakcje, z których następnie pobierałam próbki do rozdzielania w SDS-PAGE w celu weryfikacji etapów procesu oczyszczania oraz czystości uzyskanych preparatów (Rycina 14A). Dla większości wariantów białek Rep, czystość uzyskanych preparatów nie była wystarczająca i wymagane było przeprowadzenie drugiego etapu oczyszczania wykorzystującego chromatografię jonowymienną. Oczyszczanie przy użyciu chromatografii jonowymiennej przeprowadzałam według procedury opisanej w rozdziale (Metody 5.9.2). Po oczyszczeniu, czystość zebranych frakcji oceniałam na podstawie zdjęcia żelu po rozdzielaniu elektroforetycznym SDS-PAGE (Rycina 14B). Frakcje cechujące się najwyższą czystością oraz stężeniem oczyszczonego białka, łączyłam w jedną, po czym dializowałam do buforu dializującego (T33-D), w którym białka były ostatecznie przechowywane w -80°C . Stężenie białek wyznaczałam metodą densytometryczną (Rycina 14C)(Metody 5.10). Wszystkie oczyszczone przeze mnie warianty białek Rep cechowały się czystością na poziomie 95%. Poszczególne preparaty wariantów białka TrfA oczyściłam w następujących stężeniach: WT 370 ng/ μl , K127E 230 ng/ μl , R156E 440 ng/ μl , R194E 500 ng/ μl , R259E 330 ng/ μl , K303E 300 ng/ μl , R327E 310 ng/ μl , R347E 325 ng/ μl , N374E ng/ μl . Poszczególne preparaty wariantów białka RepA oczyściłam w stężeniach: WT 2700 ng/ μl , Q190E 1250 ng/ μl , R191E 3500 ng/ μl , R200E 680 ng/ μl , Q220E 1100 ng/ μl , Q220E/N221E 2700 ng/ μl , R245E 920 ng/ μl , K266E 1400 ng/ μl . Końcowe stężenia preparatów dwóch oczyszczonych przeze mnie wariantów białka RepE wynosiły: WT 300 ng/ μl oraz F146E 850 ng/ μl .

Dodatkowo na potrzebę projektu oczyściłam wszystkie pozostałe białka powiązane z procesem inicjacji replikacji. Do tych białek należą: DnaA (900 ng/ μl), DnaB (1010 ng/ μl), DnaC oraz gyraza. Nadprodukcję oraz oczyszczanie ww. białek przeprowadziłam zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale (Metody 5.9.2), (Metody 5.9.3). Białko

HU otrzymałam z kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej. Białka te posłużyły mi do przeprowadzenia opisanych w tej pracy analiz.

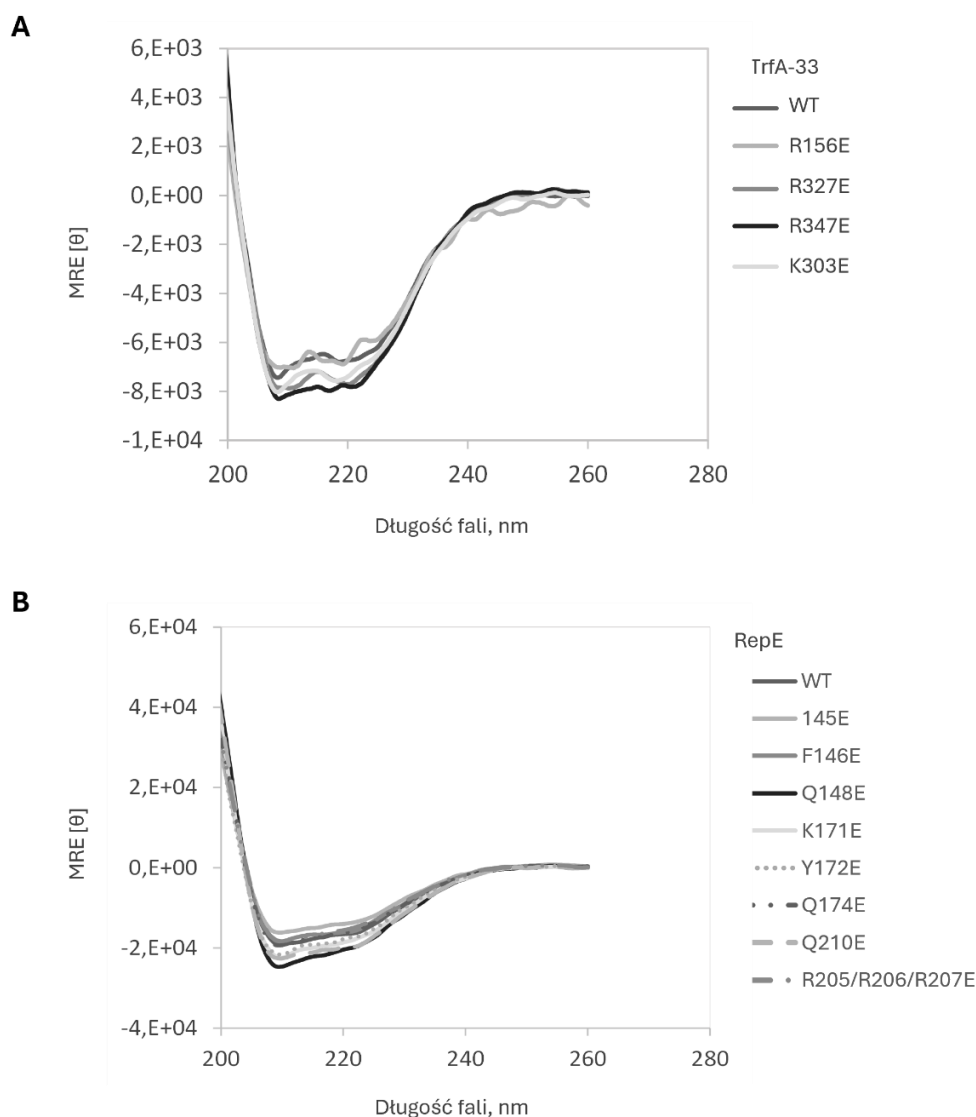


Rycina 14 Przykładowa analiza procesu oczyszczania białek Rep na przykładzie wariantu białka TrfA33 R156E metodą (A) chromatografii powinowactwa i (B) chromatografii jonowymiennej. Czarna strzałka wskazuje wariant oczyszczonego białka TrfA33 R156E; M – marker białkowy; B – próba przed indukcją ekspresji; A – próba po indukcji ekspresji przez 1M IPTG; L – lizat; W1-4 – kolejne etapy procedury wypłukiwania; 0-4 frakcje białka TrfA33 R156E po elucji ze złoża agarozowego Ni-NTA; 25-36 frakcji białka TrfA33 R156E po elucji z kolumny Hi-Trap. (C) Przykładowy wynik analizy oznaczenia stężenia białek Rep z użyciem densytometrii, na przykładzie białka TrfA R156E. Jako wzorca molekularnego użyto białka BSA w znanych ilościach (500, 100, 1500, 2000 ng), zaś stężenie oczyszczanego białka miareczkowano objętościowo (0.5, 1, 2, 3 i 4 μ l białka zawieszony w 5 μ l buforu Laemmli). Pomiar densytometryczny przeprowadzono za pomocą systemu ChemiDoc.

6.3. Analiza struktury II-rzędowej oczyszczonych wariantów białek Rep

Kolejnym etapem była weryfikacja, czy wprowadzone mutacje w białkach Rep nie zaburzają struktury oczyszczonych wariantów białka, w porównaniu do białka typu dzikiego (Rep WT). Zaburzenie struktury mogłoby przełożyć się na zafałszowanie wyników w dalszych analizach. Na tym etapie postanowiłam przeprowadzić analizę II-

rzędowej struktury uzyskanych preparatów białka TrfA i RepE, którą wykonałam z użyciem dichroizmu kołowego z pomocą dr hab. Rafała Dutkiewicza, prof. UG z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej (Metody 5.15). Wartości eliptyczności molarnej dla wszystkich wariantów białka TrfA i RepE nie różniły się od siebie w większym stopniu. Dla każdego z oczyszczonych wariantów, mogłam zidentyfikować dwa piki przy długości fali 205 oraz 220 nm (Rycina 15). Wyniki wskazują na brak zaburzeń w strukturze drugorzędowej uzyskanych po oczyszczaniu wariantów białka TrfA i RepE z wprowadzonymi substytucjami.

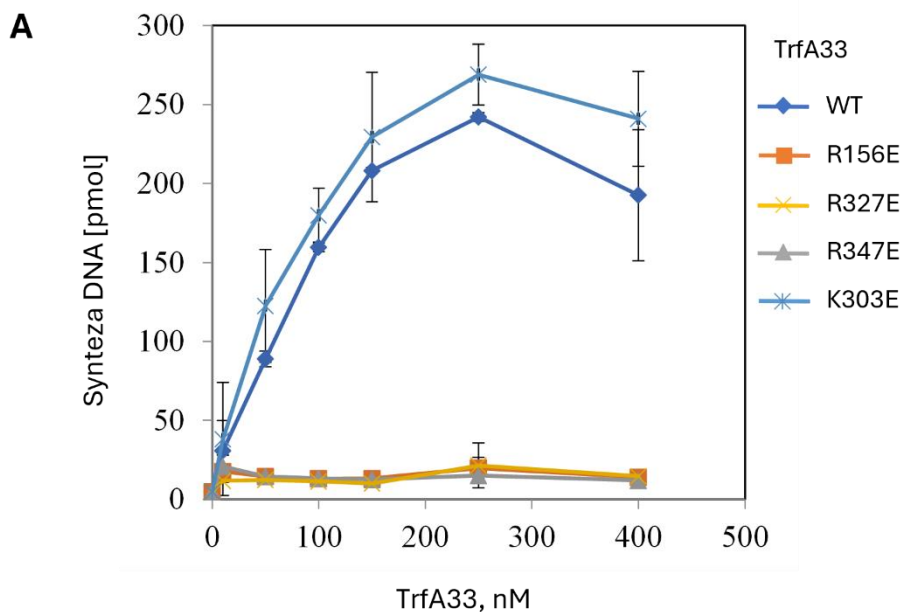


Rycina 15 Widma dichroizmu kołowego struktur drugorzędowych oczyszczonych wariantów białek (A) TrfA33 i (B) RepE. Pomiary wykonano w zakresie 200 -260 nm. MRE – eliptyczność molowa w [θ]

6.4. Analiza aktywności replikacyjnej wariantów białka TrfA

Przeprowadzona analiza DC wykazała brak wpływu wprowadzonych mutacji na strukturę drugorzędową oczyszczonych wariantów białka TrfA. Wobec tego weryfikację znaczenia oddziaływania białek Rep z DNA w rejonie DUE rozpoczęłam od przeprowadzenia analizy aktywności replikacyjnej wariantów białka TrfA. Do tego celu wykorzystałam metodę replikacji *in vitro* w ekstrakcie bakteryjnym. Ekstrakt bakteryjny uzyskałam z komórek bakterii *E. coli* C600 (Materiały 4.1; Metody 5.8). Ekstrakt bakteryjny jest źródłem wszystkich białek niezbędnych do zajścia procesu replikacji bakteryjnego DNA, z wyłączeniem plazmidowych białek Rep. Do przeprowadzenia analizy replikacji *in vitro*, jako matrycę wykorzystałam superzwiniętą cząsteczkę plazmidu pKD19L1. Poziomą syntezę DNA mierzyłam dla wybranych stężeń każdego wariantu białka TrfA. Całkowita ilość zsyntetyzowanego DNA została przeliczona na piko-mole. Wynik eksperymentu z uwzględnieniem przeliczenia ilości zsyntetyzowanego DNA przedstawiłam na Rycinie 16.

Otrzymane wyniki wykazały, że jedynie warianty WT oraz K303E białka TrfA są aktywne w reakcji na matrycy DNA zawierającej *oriV*, natomiast pozostałe warianty, tj. R156E, R327E oraz wariant niewiążący dsDNA, R347E, były defektywne w przeprowadzonych reakcjach *in vitro*. (Rycina 16A) Analiza porównawcza wariantów białka TrfA wykazała, że maksymalna synteza DNA zachodziła przy 250 nM stężeniu białka i wynosiła odpowiednio około 242 pmol dla TrfA WT oraz 249 pmol dla TrfA K303E (Rycina 16B). Zaobserwowałam również obniżanie się poziomu syntezy DNA przy stężeniu białka 400 nmol (Rycina 16A). Analiza przeprowadzona dla wariantów białek RepE wykazała, że prócz białka RepE WT, wszystkie pozostałe warianty białek nie wspierały replikacji plazmidowego DNA zawierającego *oriS* (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.2).



B

TrfA33	Replikacja <i>in vitro</i>	
	pmol	%
WT	242 ± 3	100
R156E	20 ± 7	8,3
R327E	15 ± 3	6,2
R347E	21 ± 14	8,7
K303E	249 ± 19	103

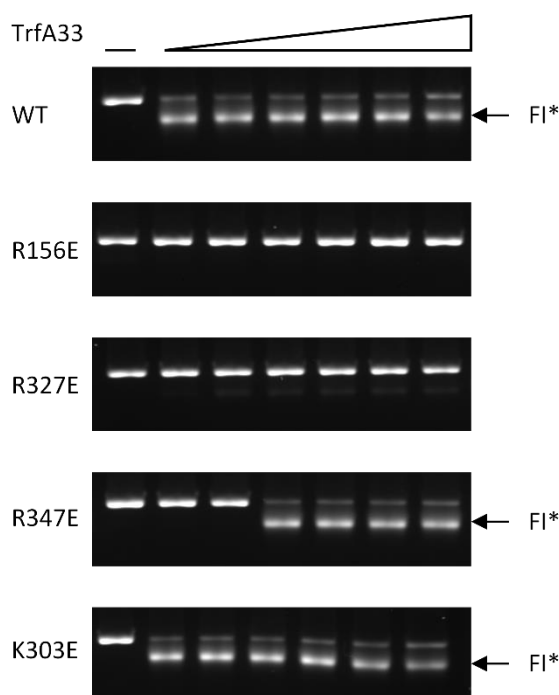
Rycina 16 Replikacja *in vitro* *oriV* w ekstrakcie bakteryjnym. (A) Jako matrycę DNA wykorzystałam plazmid pKD19L1 będący minireplikonem RK2 i zawierającym *oriV*. Reakcja składa się z 250 ng matrycy pKD19L1, rosnących stężeń wariantów białka TrfA33 (10, 50, 100, 150, 250, 400 nM), dNTPs-[3H]dTTp i surowego ekstraktu bakteryjnego otrzymanego ze szczepu bakterii *E. coli* C600. Syntezę DNA zmierzyłam w pmolach. (B) Średnie pomiary z trzech powtórzeń syntezy DNA podczas replikacji *in vitro* wyrażone w pmolach przy stężeniu 250 nM wariantów białka TrfA33.

6.5. Test aktywności helikazy DnaB w rejonie *oriV*

Wiedząc, że niektóre mutacje w białku TrfA uniemożliwiają syntezę DNA, postanowiłam sprawdzić, na którym etapie inicjacji replikacji dochodzi do zatrzymania tego procesu. Helikaza jest jednym z kluczowych elementów kompleksu przedreplikacyjnego i białkiem niezbędnym do prawidłowego zainicjowania procesu replikacji. Helikaza w asyście między innymi białka TrfA wiąże się do ssDNA rejonu DUE w miejscu inicjacji replikacji i odpowiada za dalsze rozwijanie podwójnej helisy DNA, tworząc tym samym dwie pojedyncze nici DNA, będące matrycą do syntezy

nowych cząsteczek DNA (Caspi i wsp., 2001; Pacek i wsp. 2001; Rajewska i wsp, 2008). Aby zweryfikować, czy badane warianty białka TrfA są defektywne w oddziaływaniu z helikazą, a tym samym zaburzają jej aktywność podczas procesu inicjacji replikacji, przeprowadziłam test aktywności helikazy (FI*).

Eksperyment przeprowadziłam według procedury opisanej w rozdziale (Metody 5.24). Jako matrycy DNA użyłam superzwinioną cząsteczkę plazmidu pKD19L1, którą inkubowałam z helikazą DnaB *E. coli* o stężeniu 100 nM oraz wzrastającymi stężeniami wariantów białka TrfA. W składzie mieszaniny reakcyjnej znajdowały się również pozostałe niezbędne białka w następujących stężeniach: 8 nM DnaA, 1 μ M DnaC, 2 nM gyraza, 100 nM HU, 115 nM SSB. Rozdział elektroforetyczny próbek przeprowadziłam w 1% żelu agarozowym (Materiały 4.12), jak opisałam w rozdziale (Metody 5.11) zmieniając natężenie prądu na 25 V i prowadząc rozdział przez 24 godziny (Metody 5.24). Wyniki analizy przedstawiłam na Rycinie 17. Poczynione obserwacje pozwoliły mi na identyfikację dodatkowego prążka opisanego jako FI* dla oddziaływań trzech wariantów białka TrfA: WT, K303E i R347E. Dla wariantu TrfA WT oraz K303E prążek FI* jest obserwowany już od najniższych stężeń białka TrfA. Dla wariantu defektywnego w wiązaniu dsDNA, TrfA R347E, prążek FI* pojawia się przy 100 nM stężeniu białka TrfA. Przy żadnym użytym stężeniu wariantów TrfA R156E i R327E nie zaobserwowałam pojawienia się prążka FI*, co świadczy o braku aktywacji helikazy DnaB. Analiza przeprowadzona dla wariantów białka RepE wykazała, że w reakcji z wariantami białka RepE: F146E i Y172E, helikaza nie została aktywowana (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.3. Ze względu na brak możliwości skonstruowania i oczyszczenia odpowiedniej matrycy, nie przeprowadziłam testu aktywności helikazy dla wariantów białka RepA.

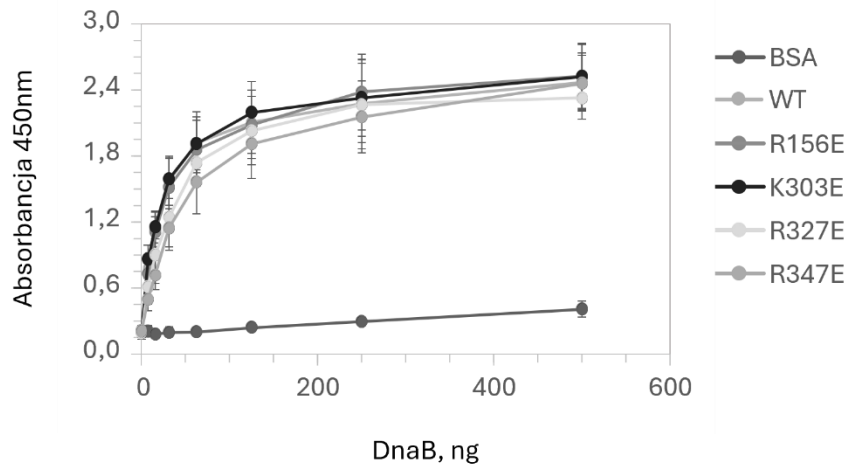


Rycina 17 Aktywacja helikazy *in vitro* przez warianty białka TrfA33 w obrębie *oriV* w teście aktywności helikazy (FI*). Test FI* przeprowadzono przy rosnącym stężeniu wariantów białka TrfA33 (10, 50, 100, 150, 250, 400 nM). Do reakcji użyto 200 ng plazmidu pKD19L1 jako matrycy DNA, 200 ng białka DnaA, 500 ng białka helikazy DnaB w obecności białka HU. Rozdział prowadzono w 1% żelu agarozowym zawierającym EtBr, przy natężeniu 25 V przez okres 24 godziny. Prążki oznaczone strzałkami jako FI* wskazują na aktywację helikazy podczas inicjacji replikacji *origin* replikacji.

6.6. Oddziaływanie wariantów białka TrfA z helikazą DnaB

Według wyników opublikowanych w pracy Pacek i wsp., (2001), białko TrfA oddziałuje z helikazą DnaB i ma istotny wpływ na jej aktywację podczas inicjacji replikacji DNA. Zaburzenie tego oddziaływania, może zablokować proces inicjacji replikacji.

W przypadku wariantów białka TrfA R156E i R327E test aktywności helikazy nie wykazał pojawienia się prążka FI*, co świadczy o braku aktywacji helikazy DnaB podczas inicjacji replikacji. W kolejnym kroku sprawdziłam, czy uzyskany wynik jest skutkiem braku oddziaływania wariantów białka TrfA z białkiem DnaB, tym samym uniemożliwiając jego aktywację podczas procesu inicjacji replikacji. W celu weryfikacji przeprowadziłam test immunoenzymatyczny, ELISA, według procedury opisanej w rozdziale (Metody 5.23). Do analizy wykorzystałam wzrastającą ilość białka DnaB (0, 7, 15, 30, 60, 125, 250, 500 ng) i 200 ng wariantów białka TrfA. Jako kontroli negatywnej użyłam białka BSA, które nie wiąże helikazy DnaB. Wyniki z otrzymanej analizy przedstawiłam na Rycinie 18.



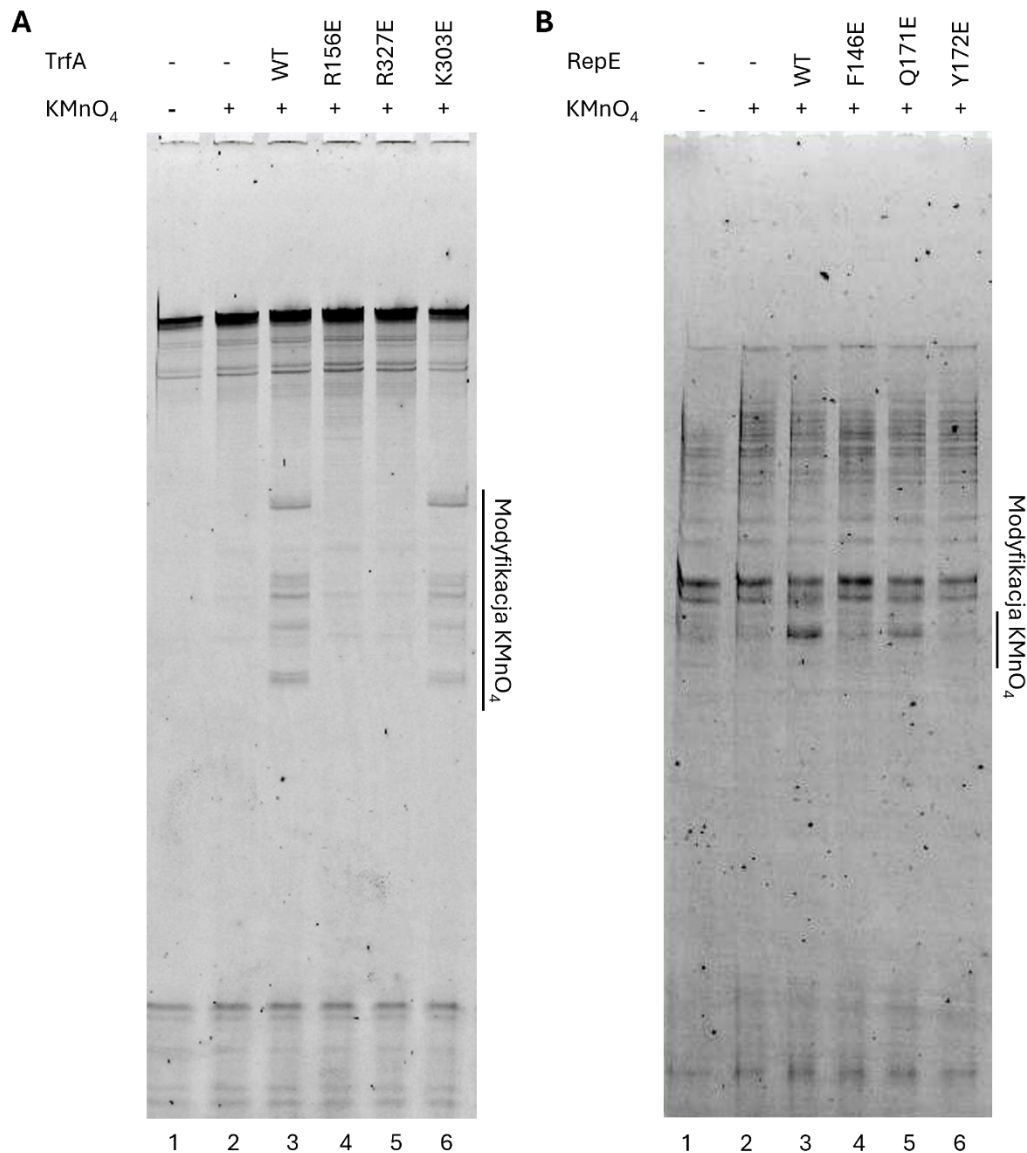
Rycina 18 Interakcja wariantów białka TrfA33 z helikazą DnaB w teście immunoenzymatycznym (ELISA). Test ELISA przeprowadziłam przy rosnących stężeniach helikazy DnaB (7, 15, 30, 60, 125, 250, 500 nM) i stałej ilości wariantów białka TrfA33 (500 ng). Absorbancję zmierzyłam przy długości fali 450 nm.

Analiza wykazała wzrost absorbancji przy długości fali 450 nm dla wszystkich badanych wariantów białka TrfA. Dodatkowo dla wszystkich wariantów białka TrfA wzrost absorbancji jest na podobnym poziomie w każdym punkcie stężeniowym helikazy DnaB. Z otrzymanych wyników mogłam zatem wywnioskować, że to nie oddziaływanie wariantów białka TrfA (R156E i R327E) z helikazą odpowiada za brak jej aktywacji w procesie inicjacji replikacji DNA, ani za brak syntezy DNA. Wyniki otrzymane z przeprowadzonej analizy dla wariantów białka RepE również wykazały, że żaden z badanych wariantów białka RepE nie ma zaburzonego oddziaływania z helikazą DnaB (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.4).

6.7. Analiza otwierania origin replikacji *oriV* i *oriS* – footprinting $KMnO_4$

Pomimo, że żaden z wariantów białka TrfA nie miał zaburzonego oddziaływania z helikazą DnaB (Rycina 18), to w przypadku analizy dwóch wariantów białka TrfA, wariantu R156E i TrfA R327E, helikaza nie została aktywowana w procesie inicjacji replikacji DNA (Rycina 17). Ten efekt przełożył się na zahamowanie syntezy DNA *in vitro*, jak wykazałam na Rycinie 16 (Wyniki 6.4). Dane literaturowe donoszą, że aby helikaza mogła przyłączyć się do DNA w rejonie DUE, musi mieć dostęp do ssDNA w miejscu inicjacji replikacji. Aby ten proces mógł zajść prawidłowo, musi nastąpić topnienie dsDNA ww. rejonie DUE i musi dojść do utworzenia dwóch fragmentów ssDNA, do których będzie możliwe przyłączenie się niektórych białek biorących udział

w inicjacji replikacji, m.in. helikazy (Konieczny i wsp., 2014) W celu weryfikacji, czy badane warianty białka TrfA wpływają na proces otwierania rejonu DUE w *origin* replikacji plazmidu RK2, przeprowadziłam analizę typu Footprinting KMnO_4 , jak opisałam w Metody 5.22. Metoda typu Footprinting z użyciem KMnO_4 pozwala na detekcję ssDNA poprzez modyfikację reszt tymidynowych, w skutek czego proces wydłużania startera zostaje zahamowany w miejscu powstałej modyfikacji. (Doran i wsp., 1998).



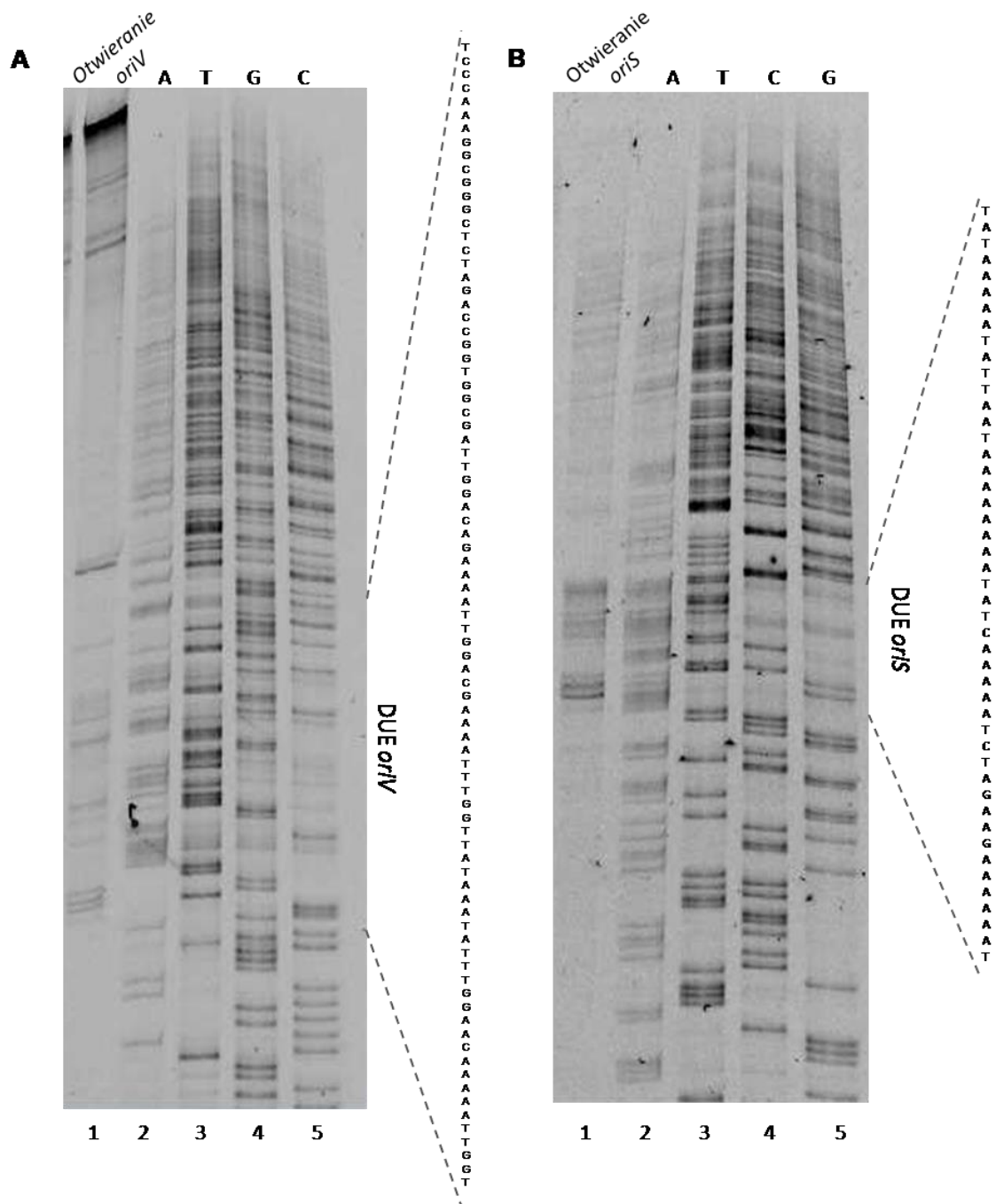
Rycina 19 Otwieranie *origin* replikacji (A) *oriV* przez warianty białka TrfA33 i (B) *oriS* przez warianty białka RepE przeprowadzona za pomocą testu typu Footprinting KMnO_4 z wydłużaniem startera. Do reakcji otwierania *origin* replikacji przez warianty białka TrfA lub RepE, jako matrycy DNA użyto odpowiednio plazmidu pKD19L1 lub pZZ35. Czarną pionową linią oznaczono region, w którym następuje destabilizacja dsDNA w rejonie DUE i w którym zaszła modyfikacja KMnO_4 ; Zarówno na panelu A i B, ścieżka nr 1- kontrola negatywna bez białka i nietraktowana KMnO_4 , ścieżka nr 2 – kontrola negatywna bez białka TrfA33, traktowana KMnO_4 , ścieżki 3-7 na panelu A oraz ścieżki 3-6 na panelu B – otwieranie miejsca inicjacji replikacji *origin* przez warianty białka (A) TrfA33 lub (B) RepE.

W pierwszym kroku przeprowadziłam optymalizację metody, która pozwoliła mi dobrać odpowiednie stężenia wariantów białek oraz fragmentów DNA, a także stężenie żeli i warunki rozdzału elektroforetycznego. Do przeprowadzenia analizy typu footprinting KMnO₄ jako matrycowego DNA używałam plazmidu pKD19L1 oraz 200 ng wariantów białka TrfA. Analizę rozpocząłam od przeprowadzenia reakcji otwierania *origin* replikacji oraz wprowadzenia modyfikacji reszt tymidynowych, jak opisałam w rozdziale (Metody 5.22.1). Następnie próbki z DNA otrzymane po reakcji otwierania oczyściłam przy użyciu komercyjnego zestawu GeneClean II Kit (MP) (Metody 5.22.2). Oczyszczone próbki poddałam reakcji wydłużenia startera, do której wykorzystałam zaprojektowane startery wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym Cy3. Dla próbek analizowanych po reakcji z wariantami białka TrfA i plazmidem pKD19L1 używałam startera Cy3-oriV-Ft. Probki rozdzielałam w poliakrylamidowym żelu sekwencyjnym (Materiały 4.12) według procedury opisanej w Metody 5.14.

Wyniki otrzymane dla wariantów białka TrfA zaprezentowałam na Rycinie 19A. W otrzymanych wynikach analizowałam rejon żeli opisany jako „Modyfikacja KMnO₄„. W przypadku obu kontroli negatywnych (ścieżka 1, pierwsza kontrola negatywna – próbka bez białka i bez udziału KMnO₄; ścieżka 2, druga kontrola negatywna – próbka bez białka, z udziałem KMnO₄), jak i dwóch wariantów białka TrfA, R156E i R327E (ścieżka 4 i 5), obserwuje się brak obecności lub redukcję intensywności niektórych prążków, które są wyraźnie obecne w kontroli pozytywnej (TrfA WT) oraz dla wariantu TrfA K303E (ścieżka 3, 6). Oznacza to, że w przypadku wariantów TrfA R156E i R327E nie doszło do otwarcia *origin* replikacji, a tym samym powstania fragmentów ssDNA, którego tymidyny mogłyby zostać zmodyfikowane przez KMnO₄.

W przypadku wariantów białka RepE, do przeprowadzenia analizy typu Footprinting KMnO₄, jako matrycowego DNA używałam plazmidu pZZ35 oraz 100 ng wariantów białka RepE. Po reakcji otwierania *oriS* i modyfikacji KMnO₄, reakcję wydłużenia startera przeprowadziłam z użyciem startera Cy3-oriS-Ft (Materiały 4.2),(Metody 5.22.3). Uzyskane wyniki wskazują, że otwieranie *origin* replikacji nastąpiło dla wariantów RepE WT i RepE Q171E (Rycina 19B, ścieżki 3 i 5), natomiast zaburzone otwieranie lub zahamowanie otwierania *origin* replikacji wystąpiło dla wariantów RepE F146E i RepE Y172E (Rycina 19B, ścieżki 4 i 6). W analizie typu Footprinting KMnO₄ dla wariantu białka RepE N22E, wprowadzona mutacja wpływa na zahamowanie otwierania *oriS* (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.5). Ze względu na

brak możliwości otrzymania odpowiedniej matrycy DNA, nie byłam w stanie przeprowadzić reakcji Footprinting KMnO₄ dla wariantów białka RepA.



Rycina 20 Sekwencjonowanie *origin* replikacji: (A) *oriV* z plazmidu RK2 i (B) *oriS* z plazmidu F w celu określenia pozycji ssDNA rejonu DUE. Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono, jak opisano w rozdziale (Metody 5.25). Próbkę otrzymaną po reakcji Footprinting KMnO₄ z wydłużaniem startera (A ścieżka 1 oraz B ścieżka1) rozdzielono obok drabinek sekwenacyjnych. Sekwencje odczytanych rejonów ssDNA opisano obok zdjęć. Odczytane sekwencje pokrywają się z sekwencjami rejonów DUE odpowiednio: (A) *oriV* oraz (B) *oriS*.

Aby odczytać sekwencję rejonu otwartego oraz potwierdzić, że sekwencja ta odpowiada rejonowi DUE *oriV* na plazmidzie pKD19L1 lub *oriS* na plazmidzie pZZ35, przeprowadziłam reakcję sekwencjonowania próbek otrzymanych po reakcji typu

Footprinting KMnO₄ dla ww. plazmidów (Metody 5.25). Analiza otrzymanych wyników pozwoliła mi na identyfikację sekwencji odpowiadającym rejonom DUE *oriV* oraz *oriS* (Rycina 20A i 20B odpowiednio).

6.8. Oddziaływanie wariantów białka TrfA z dsDNA i ssDNA

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie analiz replikacji *in vitro* w ekstrakcie bakteryjnym ewidentnie wskazują, że niektóre z wytypowanych aminokwasów białek Rep mają znaczenie dla prawidłowego zajścia replikacji (Rycina 16). Co więcej analiza aktywności helikazy FI* wykazała, że substytucja niektórych wytypowanych aminokwasów w białkach może zahamować aktywację helikazy podczas inicjacji replikacji (Rycina 17), pomimo że substytucje te nie wpływają na samo oddziaływanie pomiędzy wariantami białek Rep a helikazą (Rycina 18). Wyniki, które otrzymałam z analizy typu footprinting KMnO₄ z wydłużaniem startera, dostarczyły mi informacji, że wprowadzone substytucje w białkach Rep mają znaczenie i przełożenie na proces samego otwierania *origin* replikacji. Niektóre warianty białek Rep, tj.: TrfA R156E, TrfA R327E, RepE N22E, RepE F146 i RepE Y172 hamują proces otwierania *origin* replikacji (Rycina 19). Posiadając te wszystkie informacje przystąpiłam do weryfikacji, czy to właśnie zaburzone oddziaływanie białek Rep z ssDNA ma kluczowe znaczenie w procesie inicjacji replikacji plazmidowego DNA. W dalszej części pracy skupiłam się na przedstawieniu wyników, które otrzymałam dla wariantów białka TrfA i wytypowanych wariantów białka RepA. Każdy z oczyszczonych wariantów białka TrfA został sprawdzony pod kątem zdolności oddziaływania zarówno z ssDNA, jak i z dsDNA przy zastosowaniu następującej metodologii: analiza typu EMSA, analiza z użyciem mikroskopii sił atomowych AFM oraz analiza SPR. Dla wariantów białka RepA wykonałam analizy typu EMSA oraz SPR.

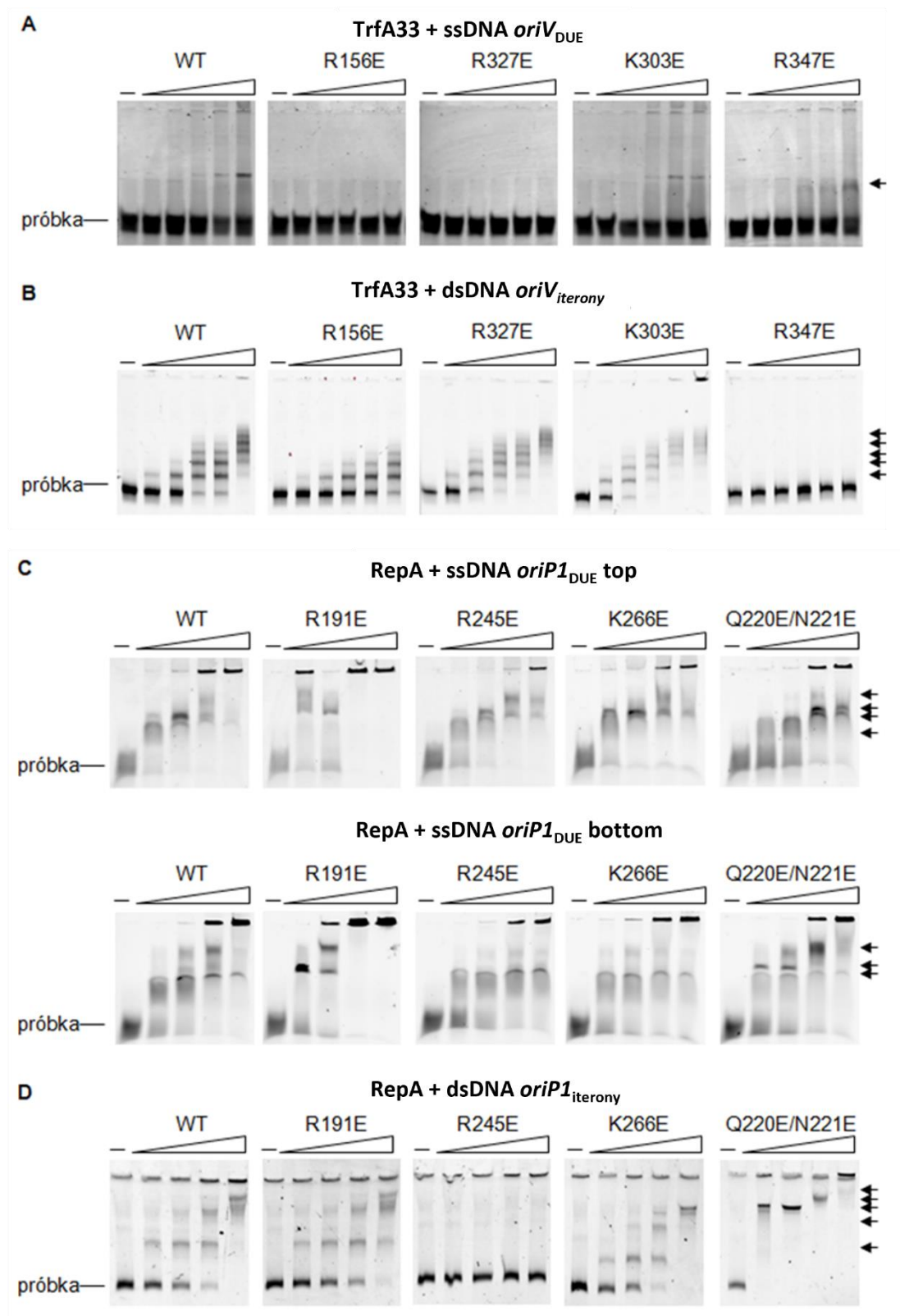
6.8.1. Weryfikacja oddziaływania wariantów białek Rep z rejonem *origin* replikacji przy użyciu metody EMSA.

W kolejnym etapie badań zastosowałam test EMSA do przeprowadzenia analizy oddziaływań białek Rep z dsDNA oraz ssDNA. Analizę przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w Metody 5.20. Do analizy wariantów białka TrfA używałam wzrastających stężeń białka (10, 50, 100, 150, 250 nM) oraz odpowiednich fragmentów DNA znakowanego fluorescencyjnie. Jako ssDNA użyłam fragmentu Cy3-*oriV*_DUE_{bot} o sekwencji odpowiadającej dolnej nici rejonu DUE *oriV*, natomiast jako dsDNA użyłam fragmentów, które otrzymałam po reakcji PCR z użyciem starterów Cy3-*oriV*_It_{top} i

oriV_It_{top} na matrycy pKD19L1 (Materiały 4.3). Do analizy wariantów białek RepA używałam wzrastających stężeń białka (250, 500, 1000, 1500 nM) oraz odpowiednich fragmentów DNA znakowanego fluorescencyjnie. Jako ssDNA użyłam fragmentów DNA Cy3-*oriP1_DUE_{top}* i Cy3-*oriP1_DUE_{bot}* odpowiadającym kolejno górnej i dolnej nici rejonu DUE *oriR*. Jako dsDNA użyłam fragmentu DNA, który otrzymałam po reakcji PCR z użyciem starterów Cy3-*oriP1_It_{top}* i *oriP1_It_{top}* na matrycy plazmidu P1 (Materiały 4.3). Analizy typu EMSA dla wariantów białka TrfA i RepA przeprowadziłam jak opisałam w Metody 5.20.2 i 5.20.3. Rycina 20 przedstawia opóźnienie migracji prążków w żelu w skutek oddziaływania wariantów białka TrfA lub RepA z odpowiednim fragmentem ssDNA rejonu DUE (Rycina 20A i C) lub odpowiednim fragmentem dsDNA, odpowiadającym sekwencji iteronowej (Rycina 20B i D). Strzałką zaznaczyłam prążki odpowiadające fragmentom DNA, których migracja została opóźniona. W przypadku oddziaływań wariantów białka TrfA z ssDNA opóźnienie migracji fragmentów ssDNA obserwowałam dla TrfA WT, K303E i R347E. Brak opóźnienia migracji fragmentów DNA obserwowałam dla wariantów TrfA R156E i R327E, co świadczy o braku powstawania kompleksów nukleoproteinowych ww. białek z ssDNA rejonu DUE *oriV* (Rycina 20A). W przypadku analizy oddziaływań wariantów TrfA z dsDNA, wszystkie analizowane białka, oprócz TrfA R347E, tworzyły kompleksy z dsDNA, co skutkowało opóźnieniem migracji tych kompleksów w żelu (Rycina 20B). Wynik uzyskany dla wariantu TrfA R347E jest zgodny z danymi literaturowymi, opisującymi ten wariant białka jako defektywny w wiązaniu dsDNA *oriV* (Węgrzyn i wsp., 2021).

W przypadku oddziaływania wariantów białka RepA z ssDNA i dsDNA, opóźnienie migracji fragmentów DNA w żelu obserwowałam dla wszystkich oczyszczonych wariantów białka RepA (Rycina 20C i D). Jedynie wynik uzyskany dla wariantu RepA R245E, nie utworzył kompleksu nukleoproteinowego z dsDNA (Rycina 20D).

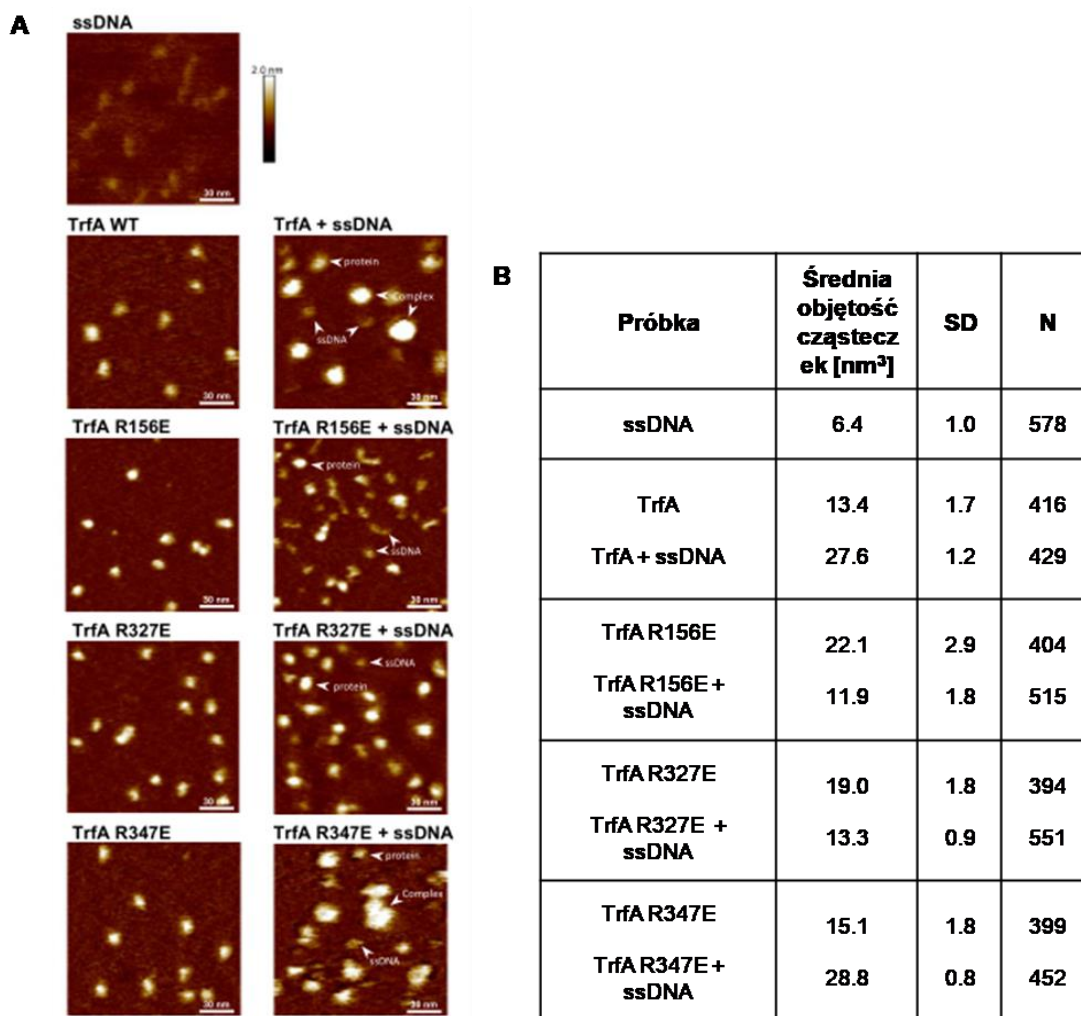
Analiza typu EMSA została przeprowadzona dla wariantów białka RepE wykazała, że warianty N22E, R146E i Y172E nie wywołują opóźnienia migracji prążków w żelu w reakcji z ssDNA DUE *oriS*, natomiast opóźniają migrację prążków w momencie oddziaływania z dsDNA. Jest to wynik odwrotny do wyniku uzyskanego dla wariantu RepE R205E/R206E/R207E, który jest defektywny w wiązaniu dsDNA (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.6).



Rycina 21. Wyniki testu EMSA przedstawiające: wiązanie wariantów białka TrfA33 z ssDNA w regionie DUE *oriV* (A) i z dsDNA iteronów w *oriV* (B); wiązanie wariantów białka RepA w rejonie DUE *oriP1* z nicią górną lub dolną (C) i z dsDNA iteronów w *oriP1* (D). Rosnące stężenia wariantów białka TrfA33 lub RepA inkubowano z 0,5 pmola znakowanego fluorescencyjnie ssDNA zawierającego odpowiednią nić regionu DUE (A i C) lub 1 pmol dsDNA zawierającego fragmenty iteronów (B i D) (Metody 5.20.1; 5.20.2; 5.20.3). Czarne strzałki wskazują fragmentów DNA, których migracja w żelu uległa opóźnieniu, co wskazuje na utworzenie się kompleksów nukleoproteinowych z danym wariantem białka Rep.

6.8.2. Analiza oddziaływania wariantów białka TrfA z rejonem *oriV* przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM)

Przy współpracy z dr Katarzyną Bury z Zakładu Biologii Molekularnej, dla wariantów TrfA WT, R156E oraz R327E przeprowadziłam dodatkową weryfikację tworzenia się kompleksów nukleoproteinowych i wykorzystałam do tego analizę mikroskopii sił atomowych, opisaną w Metody 5.25. Metoda ta pozwala na weryfikację, czy w mieszaninie dochodzi do tworzenia się kompleksów pomiędzy cząsteczkami białek i kwasów nukleinowych. Tworzące się z kompleksy posiadają większą sumaryczną objętość niż każda z cząsteczek osobno. Otrzymane wyniki wykazały, że wariant białka TrfA WT oddziałuje z dolną nicią ssDNA rejonu DUE, tworząc kompleksy nukleoproteinowe, które na rycinie zostały oznaczone strzałkami (Rycina 21A). Rycina 21B przedstawia zestawienie średniej objętości cząsteczek podanej w nm³. Jedynie dla wariantu białka TrfA WT oddziałującego z ssDNA, wartość średniej objętości cząsteczek jest większa niż dla samego ssDNA lub samego białka TrfA WT. W przypadku wariantów TrfA R156E i R327E średnia objętość cząsteczek znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej zawierającej tylko warianty białka TrfA, jest większa, niż średnia wartość cząsteczek mieszaniny, w której znajdowały się zarówno cząsteczki zmutowanych wariantów białka TrfA wraz z fragmentami ssDNA DUE_{*oriV*}, co świadczy o braku powstawania większych kompleksów nukleoproteinowych.

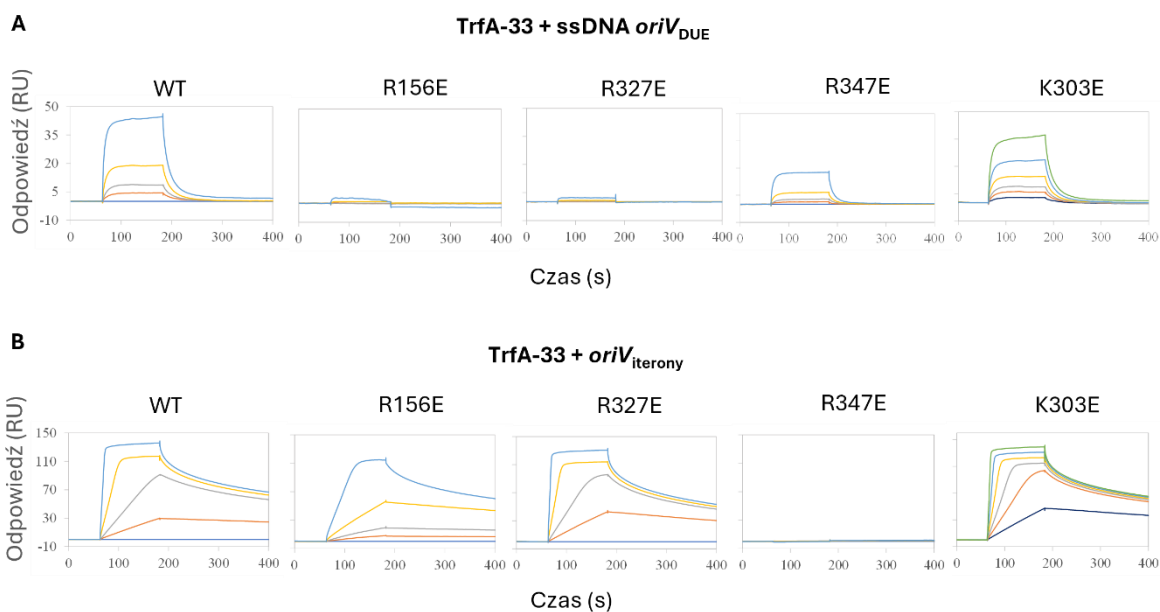


Rycina 22 Analiza AFM kompleksów nukleoproteinowych wariantów białka TrfA z dolną nicią ssDNA DUE_{oriV}. (A) Zdjęcia cząsteczek samego ssDNA i samych wariantów białka TrfA oraz wariantów białka TrfA inkubowanych z ssDNA. Cząsteczki osadzone na powierzchni miki i skanowane za pomocą AFM. Do wyświetlenia obrazów wykorzystano oprogramowanie NanoScope Analysis v1.9 (Bruker, Bremen, Niemcy) (B) Tabela przedstawiająca średnią objętość cząstek wykrytych podczas analizy AFM. Dla każdej próbki zmierzono ok. 400 - 500 cząstek. Pomiar wykonano przy użyciu oprogramowania NanoScope Analysis v1.9. Średnia objętość cząstek wykrytych podczas analizy mieszaniny TrfA WT z fragmentem ssDNA w porównaniu z samymi wariantami białka lub samym ssDNA była znacznie większa. Otrzymany wynik wskazuje na tworzenie kompleksu pomiędzy białkami i ssDNA. W przypadku wariantów TrfA R156E i TrfA R327E nie zaobserwowano cząstek o większej objętości.

Podobna analiza została przeprowadzona dla wariantów białek RepE przez dr Katarzynę Bury. Analizy te wykazały, że średnia objętość cząstek wykrytych podczas analizy mieszaniny RepE WT z fragmentem ssDNA i RepE R205E/R206E/R207E z ssDNA w porównaniu z samymi białkami lub samym ssDNA była znacznie wyższa, co wskazuje na tworzenie kompleksów nukleoproteinowych pomiędzy tymi wariantami białka RepE i ssDNA. W przypadku wariantów RepE N22E, RepE F146E i RepE Y172E nie zaobserwowano cząstek o dużej objętości (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.7).

6.8.3. Analiza wiązania wariantów białka *TrfA* z *ssDNA* i *dsDNA* przy użyciu techniki SPR.

Wobec przedstawionych powyżej wyników, postanowiłam przeprowadzić dodatkową weryfikację tworzenia się kompleksów nukleoproteinowych wariantów białka *TrfA* z fragmentem dolnej nici rejonu DUE lub z fragmentem *dsDNA* odpowiadającym iteronom. W tym celu wykonałam analizę z użyciem techniki SPR opisanej w Metody 5.21. Na powierzchnię sensora z immobilizowanym fragmentem *ssDNA* rejonu DUE (Biot-oriV_DUE_{bot}) lub *dsDNA* (zhybrydyzowane fragmenty Biot-oriV_It_{top} i oriV_It_{bot}) (Materiały 4.3) nastrzykiwałam rosnące stężenia wariantów białka *TrfA* (2, 5, 7.5, 15, 30, 60 nM). Wzrost sygnału na sensogramie świadczył o wiązaniu się białka do DNA, zaś odpowiedź została wyrażona w jednostkach RU. W przypadku wiązania białka *TrfA* z *ssDNA* obserwowałam wzrost sygnału dla wariantów WT, R347E oraz K303E, odpowiednio na poziomie odpowiedzi ok. 45 RU, 15 RU, 35 RU. Dla wariantów białka *TrfA* R156E i R327E uzyskana odpowiedź RU była bliska zeru, niezależnie od użytego stężenia białka. (Rycina 22A.) W przypadku wiązania białka *TrfA* z *dsDNA* wzrost sygnału obserwowałam dla wszystkich wariantów białka *TrfA* (odpowiedź na poziomie pomiędzy 120-140 RU), prócz wariantu R347E, który jak wcześniej wspomniałam, został scharakteryzowany, jako niezdolny do oddziaływania z *dsDNA* w rejonie *oriV* (Rycina 22B). W Tabeli 9 przedstawiłam dane dotyczące stałych kinetycznych reakcji oraz odchyłeń standardowych dla każdej przeprowadzonej reakcji. W przypadku braku oddziaływań pomiędzy wariantem białka *TrfA* z fragmentem DNA, wyliczenie ww. wartości było niemożliwe, jak w przedstawionych danych dotyczących wariantów *TrfA* R156E i R327E z *ssDNA* DUE_{oriV} (Tabela 9A) oraz wariantu *TrfA* R347E z *dsDNA*_{iterony} (Tabela 9B). Analizę SPR przeprowadziłam także dla wariantów białka RepA, jak opisałam w Metody 5.21 z użyciem odpowiednich sekwencji. Jako *ssDNA* użyłam Biot-oriP1_DUE_{top} lub Biot-oriP1_DUE_{bot}. Natomiast, jako *dsDNA* użyłam zhybrydyzowanych sekwencji Biot-oriP1_It_{top} i oriP1_It_{bot} (Materiały 4.3).



Rycina 23 Analiza interakcji wariantów białek TrfA z ssDNA i dsDNA. Analizę interakcji wariantów białka TrfA z ssDNA (A) lub dsDNA (B) przeprowadzono metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego. W analizie SPR rosnące ilości białka (2, 5, 10, 15, 30, 60 nM) przepuszczano przez powierzchnię sensora z unieruchomionym ssDNA zawierającym sekwencję dolnej nici DUE_{*oriV*} (A) lub dsDNA_{*oriV*} zawierającym sekwencję iterony (B).

Tabela 9 Stałe kinetyczne z odchyleniami standardowymi z analizy SPR dla wariantów białka TrfA33 z dolną nicią ssDNA *oriV* (A) lub iteronami dsDNA *oriV* (B). Ka – szybkość asocjacji, Kd – szybkość dysocjacji, KD – stała dysocjacji równowagi.

A. TrfA-33 + ssDNA *oriV*_{DUE}

TrfA33	Ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	SD	Kd (S ⁻¹)	SD	KD (M)	SD
WT	1.69 e+06	9.19 e+03	5.10 e-02	8.73 e-03	2.91 e-08	3.95 e-09
R156E	-	-	-	-	-	-
R327E	-	-	-	-	-	-
R347E	1.73 e+06	3.13 e+05	1.04 e-01	1.66 e-02	6.01 e-08	9.90 e-10
K303E	1.37 e+06	2.09 e+05	4.81 e-02	2.90 e-03	3.75 e-08	1.01 e-08

B. TrfA-33 + dsDNA *oriV*_{iterony}

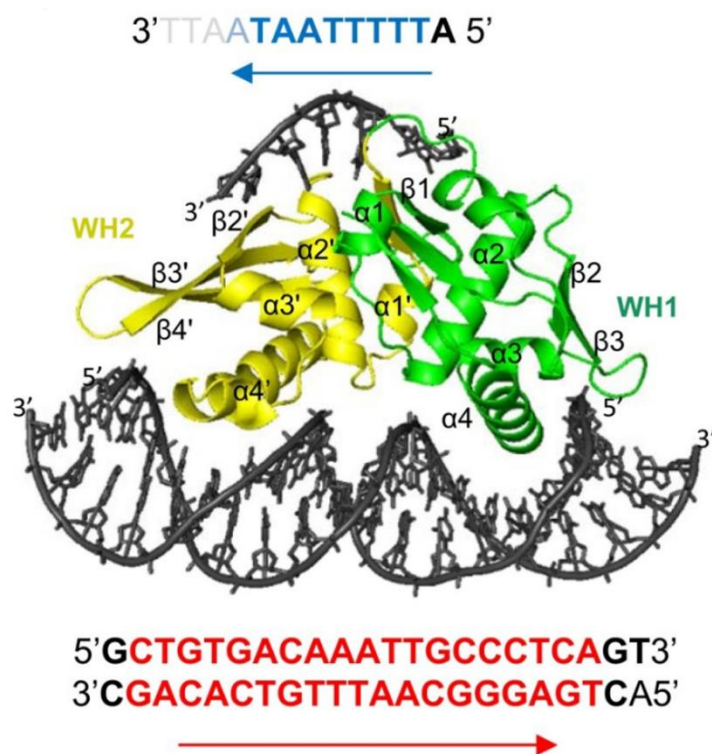
TrfA33	Ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	SD	Kd (S ⁻¹)	SD	KD (M)	SD
WT	2.47 e+07	5.49 e+06	1.25 e-02	1.53 e-03	5.12 e-10	5.15 e-10
R156E	6.57 e+06	6.90 e+06	1.79 e-02	1.81 e-02	2.84 e-09	2.21 e-10
R327E	2.44 e+07	6.01 e+06	1.49 e-02	6.58 e-4	5.57 e-10	3.53 e-11
R347E	-	-	-	-	-	-
K303E	4.65 e+07	4.10 e+07	2.25 e-02	1.86 e-02	5.05 e-10	4.6 e-11

Analiza SPR przeprowadzona dla wariantów białek RepE wykazała, że dla wariantów N22E, R146E i Y172E nie odnotowano wzrostu sygnału odpowiedzi RU w oddziaływaniu z fragmentem ssDNA *oriS*, natomiast odnotowano wzrost sygnału odpowiedzi RU z dsDNA *oriS*, na poziomie zbliżonym do wariantu białka typu dzikiego. Z kolei potrójny mutant RepE R205E/R206E/R207E miał całkowicie zniesione oddziaływanie z dsDNA, a wiązanie tego wariantu do ssDNA przebiegało z mniejszym powinowactwem w porównaniu do RepE WT (patrz. 9 WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE, Rycina S9.6).

7. DYSKUSJA

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki są częścią publikacji: „Wegrzyn K. i wsp., (2023). Rep molecule accommodates both up together dsDNA and ssDNA which contributes a loop-back mechanism for DNA replication initiation. *Nuclei Acids Res.*, 51(19) 10551-10567. i częścią projektu NCN SONATA 13 2017/26/D/NZ1/00239 „Structural-functional analysis of nucleoprotein complexes of plasmid Rep proteins and ssDNA DUE origin region”. W wyżej wymienionej publikacji mój wkład jako współautora obejmował: oczyszczenie wariantów białka TrfA, przeprowadzenie testów aktywności wariantów białka TrfA, tj.: EMSA, SPR, replikacji *in vitro*, analizę typu footprinting KMnO₄ z optymalizacją metody (również dla wariantów białka RepE WT, F146E, Q171E, Y172E, R145E, Q148E, K174E), optymalizację metody sekwencjonowania *oriV* i *oriS*, przygotowanie rycin wraz z ich opisem dla wariantów białka TrfA. Analizy wykonane przeze mnie w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały wymienione na początku rozdziału 6 WYNIKI.

W rozprawie doktorskiej przedstawiam dane, które przyczyniły się do przybliżenia odpowiedzi na stawiane pytania: Które aminokwasy wybranych białek Rep są odpowiedzialne za oddziaływanie z ssDNA rejonu DUE w plazmidowych *origin* replikacji? Na którym etapie inicjacji replikacji, wiązanie Rep-ssDNA DUE ma kluczowe znaczenie, do prawidłowego zajścia tego procesu? Ponadto przeprowadzone analizy biochemiczne, analiza fenotypowa białek z substytucjami aminokwasów oraz przedstawiona struktura potrójnego kompleksu nukleoproteinowego białka RepE z ssDNA i dsDNA wspierają teorię modelu „loop-back” inicjacji replikacji zaproponowanego dla chromosomu bakteryjnego *E. coli* (Ozaki i Katayama, 2012), *B. subtilis* (Pellicciari i wsp., 2023), czy też *V. cholerae* (Chatterjee i wsp., 2020). W moim projekcie doktorskim analizowałam aktywności białka TrfA plazmidu RK2, białka RepE plazmidu F oraz białka RepA bakteriofaga P1.



Rycina 24. Struktura krystaliczna kompleksu nukleoproteinowego białka RepE z dsDNA zawierającym sekwencję pojedynczego iteronu (czerwony) i ssDNA zawierającym sekwencję 8-meru górnej nici *DUEoriS* (niebieski). Sekwencja fragmentów DNA wykrytych w kryształach jest pogrubiona. Strzałki wskazują kierunek poszczególnych motywów (Węgrzyn i wsp., 2023).

Obecnie w literaturze można znaleźć coraz więcej doniesień omawiających strukturę potrójnych kompleksów nukleoproteinowych dotyczących oddziaływania białek inicjatorowych z dsDNA i ssDNA w rejonie *origin* replikacji (Węgrzyn i wsp., 2023; Leonard i wsp., 2019; Yoshida i wsp., 2023). Praca Węgrzyn i wsp. z 2023 roku, dostarczyła nowych danych dotyczących właściwości strukturalno-funkcjonalnych oddziaływań białek Rep z dsDNA i ssDNA. Zaprezentowana w tej pracy struktura potrójnego kompleksu białka RepE z dsDNA i ssDNA wskazuje, że białko to oddziałuje z rowkiem większym w dsDNA będącym sekwencją iteronową, poprzez α -helisy $\alpha 4$ i $\alpha 4'$ umiejscowione odpowiednio w domenach WH1 i WH2 białka. Powyższe dane pokrywają się z danymi opublikowanymi w 2007 roku przez Nakamura i wsp., dla kompleksu białka RepE z dsDNA. W literaturze można również odnaleźć podobne dane na temat ułożenia domen WH1 i WH2 innych białek Rep będących w kompleksie z dsDNA, tj.: struktura krystalograficzna kompleksu białka π plazmidu R6K (Swan i wsp., 2006), modele białka RepA z plazmidu P1 (Sharma i wsp., 2004), czy też model białka TrfA z plazmidu RK2 (Węgrzyn i wsp., 2021). Co więcej porównanie danych strukturalnych dotyczących kompleksów białka RepE z dsDNA (PDB: 1REP) (Komori i wsp., 1999) i potrójnego kompleksu RepE z dsDNA i ssDNA (Węgrzyn i wsp., 2023), potwierdziły podobne

pozycjonowanie białka względem DNA. Ponadto struktura krystalograficzna otrzymana dla podwójnego kompleksu nukleoproteinowego RepE-ssDNA, gdzie ssDNA jest reprezentowany przez 8-nukleotydowy fragment rejonu DUE, wykazała, że białko RepE wiąże ssDNA poprzez aminokwasy zlokalizowane w $\beta 1$, $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domeny WH1 oraz pętle zlokalizowane w $\beta 1'$ i $\beta 2'$ domeny WH2 białka. Lokalizacja oddziaływań pomiędzy białkiem RepE a ssDNA w strukturze kompleksu podwójnego koreluje z lokalizacją oddziaływania przedstawioną w strukturze kompleksu potrójnego (RepE-ssDNA-dsDNA) (Węgrzyn i wsp., 2023). ssDNA jest wiązany przez białko RepE po przeciwległej stronie białka, niż miejsce wiązania dsDNA.

Na podstawie struktury krystalograficznej kompleksu białka RepE z ssDNA rejonu DUE, analiz MS, porównania struktur II-rzędowych badanych białek Rep (Węgrzyn i wsp., 2023) oraz analiz *in silico*, dla każdego z inicjatorów replikacji wytypowaliśmy aminokwasy mogące mieć znaczenie w oddziaływaniu tych białek z ssDNA rejonu DUE odpowiedniego *origin* replikacji (białko TrfA z *oriV* DUE, białko RepE z *oriS* DUE i białko RepA z *oriR*). Stosując mutagenezę miejscowo specyficzną wprowadzone zostały odpowiednie zmiany w sekwencji genów rep skutkujące substytucjami wytypowanych aminokwasów (Tabela 8). Następnie oczyściliśmy zaprojektowane warianty białek Rep. Zostały również oczyszczone warianty z substytucjami, które w literaturze zostały opisane jako niewiążące dsDNA (TrfA R347E, RepE R205E/R206E/R307E i RepA R245E) (Tabela 8) (Sharma i wsp., 2004; Węgrzyn i wsp., 2021; Węgrzyn i wsp., 2023). Oczyszczone warianty białek poddaliśmy analizom biochemicznym. Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że dla białka TrfA reszty aminokwasowe w pozycjach R156 oraz R327 odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z ssDNA. W przypadku białka RepE, to aminokwasy w pozycjach N22, F146 i Y172 są kluczowe dla wiązania ssDNA (Węgrzyn i wsp., 2023). Z kolei uzyskane dane dla białka RepA nie są jednoznaczne i rozbieżne pomiędzy różnymi metodami analiz (SPR i EMSA). Analiza SPR wykazała, że wszystkie warianty białka RepA oddziałują z górną nicią rejonu DUE, natomiast żaden z wariantów nie oddziałuje z nicią dolną rejonu DUE. Natomiast wyniki uzyskane z analizy typu EMSA wykazują, że zarówno nić górna, jak i dolna jest wiązana przez wszystkie oczyszczone warianty białka RepA. Niezależnie od otrzymanych wyników, żaden z analizowanych wariantów białka RepA nie charakteryzował się obniżoną zdolnością wiązania górnej nici ssDNA.

Przeprowadzone przeze mnie analizy biochemiczne wariantów białka TrfA R156E i R327E, wykazały, że warianty te pomimo zniesionego oddziaływania z ssDNA, nie mają zaburzonego wiązania do fragmentów dsDNA z iteronami. I odwrotnie, wariant TrfA R347E, niewiążący dsDNA, zachował zdolność wiązania ssDNA rejonu DUE. Interakcja ta jest nieco słabsza w porównaniu do oddziaływania TrfA WT z ssDNA rejonu DUE. Słabszy charakter wiązania wariantu TrfA R437E z ssDNA może wynikać z wywołanej przez wprowadzoną substytucję drobnej różnicy strukturalnej w porównaniu ze strukturą białka typu dzikiego. Podobne wyniki otrzymaliśmy dla białka RepE, którego warianty N22E, F146E i Y172E nie oddziałują z ssDNA rejonu DUE *oriS*, jednak zachowały zdolność wiązania iteronów. Aczkolwiek wariant RepE R146E wiąże dsDNA z mniejszym powinowactwem niż RepE WT. Z kolei potrójny mutant RepE R205E/R206E/R207E mający całkowicie zniesione oddziaływanie z iteronami, zachował zdolność do wiązania ssDNA rejonu DUE, jednak interakcja ta odbywa się z mniejszym powinowactwem w porównaniu do białka RepE typu dzikiego. Rejony z dodatnio naładowanymi aminokwasami, które mogą być odpowiedzialne za wiązanie ssDNA znajdują się również w strukturze białka π plazmidu R6K i podobnie jak w przypadku białka TrfA i białka RepE, ich lokalizacja jest przeciwległa w stosunku do miejsc wiążących dsDNA *oriF* (PDB: 2NRA). Nie jest wykluczone, że taki układ może być prawdziwy również dla innych białek Rep. Co więcej w bakteryjnym białku inicjatorowym, DnaA, także zlokalizowano odrębne miejsca wiążące ssDNA i dsDNA. Białko DnaA oddziałuje z dsDNA poprzez domenę DBD, natomiast z ssDNA poprzez domenę AAA+. Domeny te nie występują w białkach Rep. Pomimo różnic w budowie DnaA a białek Rep, podobnie, jak w przypadku białek Rep, zniesienie oddziaływania białka DnaA z DNA w jednej domenie, nie znosi oddziaływania drugiej domeny z DNA (Ozaki i wsp., 2012).

Analizy *in vitro*, które przeprowadziłam dla wariantów białka TrfA, pokazują, że zniesione oddziaływanie z ssDNA wariantów TrfA R156E i R327E skutkuje brakiem syntezy DNA plazmidowego, a także brakiem możliwości aktywacji helikazy podczas procesu inicjacji replikacji DNA. Co ciekawe zahamowanie aktywności helikazy nie wynika z zaburzonego oddziaływania białka TrfA z helikazą, ponieważ wyniki analiz ELISA wykazały, że wszystkie z badanych wariantów białek były zdolne do interakcji z helikazą. Brak aktywacji helikazy podczas inicjacji replikacji wynikał z braku możliwości przyłączenia się helikazy do ssDNA rejonu DUE, ponieważ, jak wykazały

analizy typu footprinting KMnO_4 , nie doszło do rozdzielania nici dsDNA DUE. Taki stan rzeczy był skutkiem braku interakcji wymienionych mutantów białka TrfA z rejonem DUE *oriV*. Podobnie w przypadku białka RepE, wykazałam, że warianty N22E, R146E i Y172E nie są zdolne do indukowania topnienia dsDNA w rejonie DUE *oriS*, co jak zostało opisane w naszej publikacji (Węgrzyn i wsp. 2023), skutkuje zahamowaniem syntezy DNA w trakcie replikacji *in vitro* i *in vivo*. Obserwacje te pokrywają się z danymi dotyczącymi bakteryjnych inicjatorów replikacji białka DnaA (Ozaki i wsp., 2012) i białka RctB (Chatterjee i wsp., 2020). Może to sugerować, że wiązanie białek inicjatorowych z ssDNA, zarówno w przypadku inicjatorów plazmidowych, jak i chromosomowych, wpływa na tworzenie, stabilizację i utrzymanie kompleksu otwartego *origin* podczas procesu inicjacji replikacji DNA. Dane krystalograficzne białka RepE wykazały, że konformacja monomeru Rep związanego z ssDNA, nie różni się od konformacji monomeru związanego z dsDNA. Nie zaobserwowano też różnic konformacji białka w przypadku gdy monomer RepE pozostawał w kompleksie z dsDNA i ssDNA (Węgrzyn i wsp., 2023) Jest to zasadnicza różnica pomiędzy białkami Rep, a zaproponowanym modelem „two-state model” wiązania białka DnaA, w którym białko to przyjmuje inną konformację w momencie wiązania miejsc DnaA-box na dsDNA oraz inną podczas interakcji z powtórzonymi sekwencjami w rejonie DUE ssDNA (Erzberger i wsp., 2006; Duderstadt i wsp., 2010; Duderstadt i wsp., 2011). Według tego modelu cząsteczki białka DnaA wiążąc dsDNA przyjmują konformację bardziej rozwiniętą tworząc filamenty na dsDNA. To z kolei powoduje destabilizację rejonu DUE i skutkuje powstaniem kompleksu otwartego. Po topnieniu dsDNA w miejscu DUE dostępne stają się dwie oddzielone nici ssDNA, do których mogą wiązać się kolejne protomery białka DnaA, które tym razem przybiera bardziej kompaktową strukturę (Duderstadt i wsp., 2011; Erzberg i wsp., 2006; Duderstadt i wsp., 2010). Zarówno na podstawie otrzymanych danych strukturalnych dotyczących białek Rep (Węgrzyn i wsp., 2023), jak i najnowszych danych uzyskanych dla białka DnaA (Pelliciani i wsp., 2023; Yoshida i wsp., 2023) oraz dla białka RctB (Chatterjee i wsp., 2020), bardziej prawdopodobnym wydaje się być model oparty na tworzeniu „loop-back”. Przedstawione w naszej pracy dane krystalograficzne dla białka RepE (Węgrzyn i wsp., 2023), jak i dane kriomikroskopii elektronowej (Cryo-EM) dla białka DnaA z *B. subtilis* (Pelliciani i wsp., 2023) wskazują, że zarówno jeden monomer plazmidowego białka inicjatorowego, jak i chromosomowego białka inicjatorowego mogą jednocześnie wiązać dsDNA i ssDNA w *origin* replikacji. W przypadku białek Rep, dane strukturalne zostały poparte

eksperymentami biochemicznymi uzyskanymi za pomocą analiz replikacji *in vitro*, jak i analizy typu footprinting KMnO_4 . Wyniki otrzymane w powyższych eksperymentach dostarczyły informacji, że zarówno TrfA, jak i RepE typu dzikiego, które oddziałują z obydwoma typami cząsteczek DNA mogą doprowadzić do prawidłowego topnienia rejonu DUE i w konsekwencji inicjacji syntezy nowej nici DNA w trakcie replikacji DNA. Zarazem przedstawione w tej rozprawie oraz opublikowane przez nas wyniki (Węgrzyn i wsp., 2023), są zbieżne z założeniami modelu inicjacji replikacji opartego na powstawaniu „loop-back”, w którym cząsteczki białek inicjatorowych wiążąc *origin* oddziałują zarówno z dsDNA, jak i z ssDNA DUE. Model zakłada, że dostępność iteronów oraz rejonu DUE dla cząsteczek białka inicjatorowego jest umożliwiona poprzez odgięcie DNA w wyniku wiązania białek histonopodobnych. Tak zaproponowano dla białka DnaA z *E. coli* (Ozaki i wsp., 2012). Niektóre monomery białka DnaA wiążą jednocześnie sekwencje DnaA-box na dsDNA oraz ssDNA DUE, dzięki wygięciu DNA po związaniu białka IHF w sekwencji znajdującej się pomiędzy miejscami DnaA-box a regionem DUE (Sakiyama i wsp., 2017). Wiadomym jest, że białka histonopodobne, takie jak HU, czy IHF, pełnią ważną rolę w procesie replikacji DNA, rekombinacji DNA, czy naprawy i transkrypcji DNA. Wpływają na powstawanie superskrętów w cząsteczce DNA i są odpowiedzialne za regulację ekspresji genów (Berger i wsp., 2010; Oberto i wsp., 2009). W przeciwieństwie do białka IHF, nie jest znane dokładne miejsce wiązania się białka HU na DNA w cząsteczkach plazmidu RK2, czy plazmidu F. Natomiast wiadomym jest, że białko to wiąże 9 par zasad (Bonney i wsp., 1991), a zarówno w *origin* replikacji plazmidu RK2, jak i plazmidu F, pomiędzy sekwencjami iteronowymi, a rejonem DUE znajdują się fragmenty o długości 56 i 42 par zasad (odpowiednio), które teoretycznie mogłyby być potencjalnym miejscem wiązania białka HU. Wiązanie białek HU jest niezbędne w procesie replikacji plazmidowego DNA (Konieczny i wsp., 1997; Fekete i wsp., 2006; Ogura i wsp., 1990). Ponadto, najnowsze dane literaturowe również pokazują znaczenie białek histonopodobnych związanych w *origin* replikacji, w zginaniu DNA i dostępności ssDNA rejonu DUE dla białek inicjatorowych (Yoshida i wsp., 2023). Podobnie, w procesie replikacji plazmidowego DNA, wiązanie białek HU i wygięcie DNA może przyczynić się do zwiększonej destabilizacji dsDNA rejonu DUE. Z kolei zwiększenie destabilizacji rejonu DUE może mieć wpływ na łatwiejsze rozdzielenie nici DNA tego rejonu i lepszą dostępność powstałych fragmentów ssDNA dla białek Rep. W konsekwencji związane z ssDNA białka Rep mogą stabilizować strukturę kompleksu otwartego w *origin*, tym samym

umożliwiając zajście kolejnych etapów inicjacji replikacji. Nasze dane silnie wspierają model „loop-back” i pokazują, że białka Rep typu dzikiego są w stanie oddziaływać jednocześnie z iteronami dsDNA, jak i ssDNA DUE, a wprowadzenie mutacji w miejsce aminokwasów odpowiedzialnych za wiązanie się białka Rep z ssDNA, niweluje możliwość utworzenia potrójnego kompleksu nukleoproteinowego (Węgrzyn i wsp., 2014; Węgrzyn i wsp., 2023). Uzyskanie struktury krystalograficznej potrójnego kompleksu ssDNA-RepE-dsDNA i dane pochodzące z analizy footprinting KMnO_4 są silnym dowodem weryfikującym poprawność modelu. Dodatkowym elementem wzmacniającym słuszność modelu „loop-back” i znaczenia wiązania się białek HU w określonych miejscach origin, są eksperymenty analizujące odstęp między określonymi motywami i regionami *origin* replikacji. Wykazano, że wiązanie się białka inicjatorowego do iteronu jest niemożliwe zarówno w przypadku wprowadzenia mutacji w sekwencji iteronu (Brendrel i wsp., 1997; McEachern i wsp., 1985), jak i zmiany odstęp między iteronami (Bowers i wsp., 2007). Co więcej, wykazano, że jeżeli zmieni się odległość między iteronami i rejonem DUE plazmidowego DNA, wówczas nie dochodzi do inicjacji replikacji przy udziale białek Rep (Kowalczyk i wsp., 2005; Rajewska i wsp., 2008). Podobna sytuacja ma miejsce dla *origin* chromosomu *E. coli* (Hsu i wsp., 1994).

Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione powyżej dane dotyczące strukturalnej organizacji *origin* replikacji zarówno plazmidowego DNA, jak i DNA chromosomowego bakterii, strukturę krystalograficzną potrójnego kompleksu białka RepE z ssDNA i dsDNA, a także przedstawione przeze mnie w tej pracy dane biochemiczne, nasuwa się wniosek, że proces inicjacji replikacji opiera się o podobne schematy dla wszystkich wspomnianych *origin*. Zaprezentowane w tej pracy dane częściowo przyczyniają się do lepszego poznania procesu inicjacji replikacji plazmidowego DNA, które jak się okazuje dobrze wpasowują się w ramy modelu inicjacji replikacji opartej na „loop-back” tworzonej z udziałem białek histonopodobnych, a który to model ma również silne poparcie eksperymentalne w procesie inicjacji replikacji chromosomów bakteryjnych (Chatterjee i wsp., 2020; Katayama, 2017; Ozaki i Katayama, 2012; Richardson i wsp., 2016; Pelliciani i wsp., 2023; Węgrzyn i wsp., 2023; Yoshida i wsp., 2023). Dodatkowo, wykonane przeze mnie i opublikowane (Węgrzyn i wsp., 2023) analizy biochemiczne, pokazują, że w przypadku białek TrfA i RepE, prawidłowe oddziaływanie białek Rep z ssDNA rejonu DUE, ma kluczowe znaczenie w procesie otwierania *origin* replikacji. Ma

to przełożenie na możliwość złożenia pełnego kompleksu przedreplikacyjnego (choćby rekrutację i aktywację helikazy), a po związaniu polimerazy, rozpoczęcie syntezy nowej cząsteczki plazmidowego DNA. Wartością dodaną tej pracy, jest również fakt, że udało się wytypować i eksperymentalnie potwierdzić znaczenie niektórych aminokwasów białek Rep w oddziaływaniu z ssDNA DUE, a także wykazać, że lokalizacja tych aminokwasów, jak też samo oddziaływanie z ssDNA odbywa się po przeciwległej stronie białka, niż wiązania białka Rep z dsDNA. Oczywiście aby móc opisać pełny model inicjacji replikacji DNA, należałoby odpowiedzieć jeszcze na wiele pytań. Bowiem nadal nie jest do końca wiadomym, czy np. wszystkie cząsteczki białek Rep, które są związane z iteronami, oddziałują z ssDNA DUE, czy tylko niektóre z nich. W przypadku struktury potrójnego kompleksu białka RepE, pokazane jest oddziaływanie tylko dla jednego monomeru tego białka. Pomimo to, analizy spektrometrii mas wskazują na interakcję białka RepE z różnymi powtórzeniami w obrębie rejonu DUE, a to z kolei może sugerować tworzenie się większej liczby kompleksów ssDNA-RepE-dsDNA *oriS*. Kolejną niewiadomą jest dokładna rola białka DnaA na pierwszym etapie inicjacji replikacji plazmidowego DNA, choć wykazano, że białko DnaA w jakiś sposób wspomaga proces destabilizacji DUE (Wawrzycka i wsp., 2015; Rajewska i wsp., 2012). Również nie ma dowodów strukturalnych na charakter wiązania się białek HU w obrębie *origin* replikacji plazmidów. Takie dane strukturalne, mogłyby rzucić nowe światło na model inicjacji replikacji DNA.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abeles A.L., Snyder K.M., Chatteraj D.K., (1984). P1 plasmid replication: replicon structure. *J. Mol. Biol.* 173 307–324
- Abhyankar M.M., Zzaman S., Bastia D., (2003). Reconstitution of R6K DNA replication in vitro using 22 purified proteins. *J. Biol. Chem.* 278 45476–45484
- Appleyard R.K., (1954); Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39(4) 440-52
- Ausiannikava D., Allers T., (2017). Diversity of DNA replication in the Archaea. *Genes* (Basel) 8(2) 56
- Bell S.D., (2017). Initiation of DNA replication in the Archaea. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1042 99-115
- Bell S.P., Stillman B., (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic *origins* of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357 128-34
- Berger M., Farcas A., Geertz M., Zhelyazkova P., Brix K., Travers A., Muskhelishvili G., (2010). Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep.* 11 59–64
- Blasina A., Kittell B.L., Toukdarian A.E., Helinski D.R., (1996). Copy-up mutants of the plasmid RK2 replication initiation protein are defective in coupling RK2 replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 3559-64
- Bleichert F., Botchan M.R., Berger J.M., (2015). Crystal structure of the eucaryotic origin recognition complex. *Nature* 519 321-326
- Bonnefoy E., Rouviere-Yaniv J., (1991). HU and IHF, two homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. *EMBO J.* 10 687–696
- Bowers L.M., Kruger R., Filutowicz M., (2007). Mechanism of origin activation by monomers of R6K-encoded pi protein. *J. Mol. Biol.* 368 928–938
- Bowers J.L., Randell J.C., Chen S., Bell S.P., (2004). ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol. Cell* 16 967-978
- Bramhill D., Kornberg A., (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* 54 915–918
- Brendler T.G., Abeles A.L., Reaves L.D., Austin S.J., (1997). The iteron bases and spacers of the P1 replication origin contain information that specifies the formation of a complex structure involved in initiation. *Mol. Microbiol.* 23 559–567
- Bowers L.M., Kruger R., Filutowicz M., (2007). Mechanism of origin activation by monomers of R6K-encoded pi protein. *J. Mol. Biol.* 368 928– 938

- Bramhill D., Kornberg A., (1988). Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the E. coli chromosome. *Cell* 52 743–755
- Brendler T., Abeles A., Austin S., (1991). Critical sequences in the core of the P1 plasmid replication origin. *J. Bacteriol.* 173 3935–3942
- Brendler T.G., Abeles A.L., Reaves L.D., Austin S.J., (1997). The iteron bases and spacers of the P1 replication origin contain information that specifies the formation of a complex structure involved in initiation. *Mol. Microbiol.* 23 559–567
- Bury K., Wegrzyn K., Konieczny I., (2017). Handcuffing reversal is facilitated by proteases and replication initiator monomers. *Nucleic Acids. Res.* 45 3953-3966
- Caspi R., Pacek M., Consiglieri G., Helinski D.R., Toukdarian A., Konieczny I., (2001). A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *EMBO J.* 20 3262–3271
- Celniker S., Sweder T., Srienc F., Bailey J., Campbell J., (1984). Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4 2455-2466
- Cereghino J.L., Helinski D.R., Toukdarian A.E., (1994). Isolation and characterization of DNA-binding mutants of a plasmid replication initiation protein utilizing an in vivo binding assay. *Plasmid* 31:89–99. 52. Sharma S, Sathyanarayana BK, Bird JG, Hoskins JR, Lee B, Wickner S. 2004. Plasmid P1 RepA is homologous to the F plasmid RepE class of initiators. *J. Biol. Chem.* 279 6027–6034
- Chang F., Thies J.F., Miller J., Nieduszynski C.A., Newlon C.S., Weinreich M., (2008). Analysis of chromosome III replicators reveals an unusual structure for ARS318 silencer origin and a conserved WTW sequence within the origin recognition complex binding site. *Mol. Cell. Biol.* 28 5071-5081
- Chatterjee S., Jha J.K., Ciaccia P., Venkova T., Chatteraj D.K., (2020). Interactions of replication initiator RctB with single- and double-stranded DNA in origin opening of *Vibrio cholerae* chromosome 2. *Nucleic Acid Res.* 48 11016-11029
- Chatteraj D.K., Girlando R., Park K., Dibbens J.A., Lewis M.S., (1996). Dissociation kinetics of RepA dimers: implications for mechanisms of activation of DNA binding by chaperones. *Genes Cells* 1 189–199.
- Chatteraj D.K., Snyder K.M., Abeles A.L., (1985). P1 plasmid replication: multiple functions of RepA protein at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 2588–2592
- Ciesielski G.L., Nadalitti C.A., Oliveira M.T., Jacobs H.T., Griffith J.D., Kaguni L.S., (2018). Structural rearrangements in the mitochondrial genome of *Drosophila melanogaster* induced by elevated levels of the replicative DNA helicase. *Nucleic Acid Res.* 46(6) 3034-3046
- Costa A., Diffley J.H.X., (2022). The initiation of eukaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 91 107-131

- Costa A., Hood I.V., Berger J.M., (2013). Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 82 25-54
- Dalrymple B.P., Kongsuwan K., Wijffels G., (2007). Identification of putative DnaN-binding motifs in plasmid replication initiation proteins. *Plasmid* 57 82–88
- Dao F.Y., Lv H., Wang F., Feng C.Q., Ding H., Chen W., Lin H., (2019). Identify origin of replication in *Saccharomyces cerevisiae* using two-step feature selection technique. *Bioinformatics* 35 2075-2083
- DasGupta S., Mukhopadhyay G., Papp P.P., Lewis M.S., Chattoraj D.K., (1993). Activation of DNA binding by the monomeric form of the P1 replication initiator RepA by heat shock proteins DnaJ and DnaK. *J. Mol. Biol.* 232 23–34
- Davey M.J., Fang L., McInerney P., Georgescu R.E., O'Donnell M., (2002). The DnaC helicase loader is a dual ATP/ADP switch protein. *EMBO J.* 21 3148–3159
- Diaz-Lopez T., Davila-Fajardo C., Blaesing F., Lillo M.P., Giraldo R., (2006). Early events in the binding of the pPS10 replication protein RepA to single iteron and operator DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 364 909–920
- Diaz-Lopez T., Lages-Gonzalo M., Serrano-Lopez A., Alfonso C., Rivas G., Diaz-Orejas R., Giraldo R., (2003.) Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *J. Biol. Chem.* 278 18606–18616.
- Diehl F.F., Miettinen T.P., Elbashir R., Nabel C.M., Do B.T., Manalis S.R., Lewis C.A., Vander Heiden M.G., (2022). Nucleotide imbalance decouples cell growth from cell proliferation. *Nature Cell Biol.* 24 1252-1264
- Diffley J.F.X., Cocker J.H., (1992). Protein-DNA interactions at a yeast triplication origin. *Nature* 357 169-172
- Doran K.S., Konieczny I., Helinski D.R., (1998). Replication origin of the broad host range plasmid RK2. Positioning of various motifs is critical for initiation of replication. *J. Biol. Chem.* 273 8447–8453
- Dueber E.L., Corn J.E., Bell S.D., Berger J.M., (2007). Replication origin recognition and deformation by a heterodimeric archeal Orc1 complex. *Science* 5843 1210-1213
- Duderstadt K.E., Chuang K., Berger J.M., (2011). DNA stretching by bacterial initiators promotes replication origin opening. *Nature* 478 209– 213
- Duderstadt K.E., Mott M.L., Crisona N.J., Chuang K., Yang H., Berger J.M., (2010). Origin remodeling and opening in bacteria rely on distinct assembly states of the DnaA initiator. *J. Biol. Chem.* 285 28229–28239
- Durland R.H., Helinski D.R., (1987). The sequence encoding the 43- kilodalton trfA protein is required for efficient replication or maintenance of minimal RK2 replicons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plasmid* 18 164– 169

- Eaton M.L., Galani K., Kang S., Bell S.P., MacAlpine D.M., (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication *origins*. *Genes* 24 748-753
- Ekundayo B., Bleichert F., (2019). Origins of DNA replication. *PLoS Genet.* 15:e1008320
- Erzberger J.P., Mott M.L., Berger J.M., (2006). Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling. *Nature Struct. Mol. Biol.* 13 676–683
- Fang F.C., Helinski D.R., (1991). Broad-host-range properties of plasmid RK2: importance of overlapping genes encoding the plasmid replication initiation protein TrfA. *J. Bacteriol.* 173 5861–5868
- Fekete R.A., Venkova-Canova T., Park K., Chatteraj D.K., (2006). IHF-dependent activation of P1 plasmid origin by dnaA. *Mol. Microbiol.* 62 1739–1751
- Feng X., Noguchi Y., Barbon M., Stillman B., Speck C., Li H., (2021). The structure of ORC-Cdc6 on an origin DNA reveals the mechanism of ORC activation by the replication initiator Cdc6. *Nat. Commun.* 12 3883
- Filutowicz M., McEachern M.J., Mukhopadhyay P., Greener A., Yang S.L., Helinski D.R., (1987). DNA and protein interactions in the regulation of plasmid replication. *J. Cell Sci. Suppl.* 7 15–31
- Foureau E., Courdayault V., Navarro-Gallón S.M., Besseau S., Simkin A.J., Creche J., Atehortua L., Gioglioli-Guivarc'h N., Clastre M., Papon N., (2013). Characterization of an autonomously replicating sequence in *Candida guilliermondii*. *Microbiol. Res.*, 168 580-588
- Ganapathi M., Palumbo M.J., Ansari S.A., He Q., Tsui K., Nislow C., Morse R.H., (2011). Extensive role of general regulatory factors, Abf1 and Rap1, in determining genome-wide chromatin structure in budding yeast. *Nucleic Acid Res.* 39(6) 2032-2044
- Gasset-Rosa F., Diaz-Lopez T., Lurz R., Prieto A., Fernandez-Tresguerres, M.E., Giraldo R. (2008). Negative regulation of pPS10 plasmid replication: origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. *Mol. Microbiol.* 68 560–572.
- Garcia de Viedma D., Serrano-Lopez A., Diaz-Orejas R., (1995). Specific binding of the replication protein of plasmid pPS10 to direct and inverted repeats is mediated by an HTH motif. *Nucleic. Acids. Res.* 23 5048–5054.
- Gaudier M., Schuwirth B.S., Westcott S.L., Wigley D. B., (2007). Structural basis of DNA replication *origin* recognition by an ORC protein. *Science* 5842 1213-1216
- Germino J., Bastia D., (1983). Interaction of the plasmid R6K-encoded replication initiator protein with its binding sites on DNA. *Cell* 34 125– 134

- Giraldo R., (2003). Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 26 533–554
- Giraldo R., Andreu J.M., Diaz-Orejas R., (1998). Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *EMBO J.* 17 4511– 4526
- Giraldo R., Fernandez-Tornero C., Evans P.R., Diaz-Orejas, R., Romero A., (2003). A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat Struct Biol.* 10 565-571
- Grainge I., Gaudier M., Schuwirth B.S., Westcott S.L., Sandall J., Atanassova N., Wigley D., B., (2006). Biochemical analysis of a DNA replication origin in the Archaeon *Aeropyrum pernix*. *J. Mol. Biol.* 363 355-369
- Greci M.D., Bell S D., (2020). Archaeal DNA replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 74 65-80
- Grimwade J.E., Rozgaja T.A., Gupta R., Dyson K., Rao P., Leonard A.C., (2018) Origin recognition is the predominant role for DnaA-ATP in initiation of chromosome replication. *Nucleic Acids Res.* 46 6140-6151
- Guzman L.M., Belin D., Carson M.J., Beckwith J., (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J. Bacteriol.* 177(14) 4121-4130
- Haccard O., Ciardo D., Narrissamprakash H., Bronchain O., Kumagai A., Dunphy W.G., Goldar A., Marheineke K., (2023). Rif1 restrains the rate of replication origin in *Xenopus laevis*. *Nat. Commun. Biol.* 6:788
- Hayashi C., Miyazaki E., Ozaki S., Abe T., Katyama T., (2020). DnaB helicase is recruited to the replication initiation complex via binding of DnaA domain I to lateral surface of the DnaB N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 295 1131-1143
- Houchens C.R., Lu W., Chuang R.Y., Frattini M.G., Fuller A., Simancek P., Kelly T.J., (2008). Multiple mechanisms contribute to *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex-DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 283 30216-30224
- Hsu J., Bramhill D., Thompson C.M., (1994). Open complex-formation by DnaA initiation protein at the *Escherichia coli* chromosomal origin requires the 13-mers precisely spaced relative to the 9-mers. *Mol. Microbiol.* 11 903–911
- Hu Y., Stillmann B., (2023). Origins of DNA replication in eucaryots. *Molecular Cell* 83(3) 352-372
- Hu Y., Tareen A., Sheu Y.J., Ireland W.T., Speck C., et. al., (2020). Evolution of DNA replication origin specification and gene silencing mechanism. *Nat. Commun.* 11 5175
- Hwang D.S., Kornberg A., (1990). A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an E. coli minichromosome. *Cell* 63 325– 331

- Hyrien O., Rappailles A., Guilbaud G., Baker A., Chen C. L., Doldar A., i wsp. (2013). From simple bacterial and archaeal replicons to replication N/U-domains. *J. Mol. Biol.* 425 4673-4689
- Ingmer H., Cohen S.N., (1993). Excess intracellular concentration of the pSC101 RepA protein interferes with both plasmid DNA replication and partitioning. *J. Bacteriol.* 175 7834–7841
- Ingmer H., Fong E.L., Cohen S.N., (1995). Monomer-dimer equilibrium of the pSC101 RepA protein. *J. Mol. Biol.* 250 309–314
- Ishiai M., Wada C., Kawasaki Y., Yura T., (1994). Replication initiator protein RepE of mini-F plasmid: functional differentiation between monomers (initiator) and dimers (autogenous repressor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 3839–3843
- Iyer L.M., Lepe D.D., Koonin E.V., Aravind L., (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* 146 11-31
- Jacob F., Brenner S., (1963). On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 256 298–300.
- Jacob F., Cuzin F., Brenner S., (1963). On regulation of DNA replication in bacteria. *Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 28 329-348
- James F., Newlon C.S., (2001). Two compound replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* contains redundant origin recognition complex binding sites. *Mol. Cell Biol.*, 21(8) 2790-2801
- Jaworski P., Zyla-Uklejewicz D., Nowaczyk-Cieszewska M., Donczew R., Mielke T., Weigel C., (2021). Putative cooperative ATP-DnaA binding to double-stranded DnaA box and single-stranded DnaA-trio motif upon *Helicobacter pylori* replication initiation complex assembly. *Int. J. Mol. Sci.* 22:6643
- Jha J.K., Demarre G., Venkova-Canova T., Chatteraj D.K., (2012). Replication regulation of *Vibrio cholerae* chromosome II involves initiator binding to the origin both as monomer and as dimer. *Nucleic Acids Res.* 40 6026-6038
- Jha J., Ramachandran R., Chatteraj D.K., (2016). Opening the stands replication origins – still an open question. *Front. Mol. Biosci.* 3(62)
- Jiang Y., Pacek M., Helinski D.R., Konieczny I., Toukdarian A., (2003). A multifunctional plasmid-encoded replication initiation protein both recruits and positions an active helicase at the replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 8692–8697
- Jaremko M.J., On K.F., Thomas D.R., Stillman B., Joshua-Tor L., (2020). The dynamic nature of the human origin recognition complex revealed through five cryo-EM structures. *eLife* 9 e58622

- Jaworski P., Zyla-Uklejewicz D., Nowaczyk-Cieszewska M., Donczew R., Mielke T., Weigel C., Zawilak-Pawlik A., (2021). Putative cooperative ATP-DnaA binding to double-stranded DnaA box and single-stranded DnaA-Tri motif upon *Helicobacter pylori* replication initiation complex assembly. *Int. J. Mol. Sci.* 22(12) 6643
- Jenkinson E.R., Chong J.P., (2003). Initiation of archaeal DNA replication. *Biochem. Soc. Trans.*, 31 669-673
- Kamashev D., Agapova Y., Rastorguev S., Talyzina A.A., Boyko K.M., Korzhenevskiy D.A. i wsp., (2017). Comparison of histon-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment. *PLoS One* 12:e0188037
- Katayama T., (2008) Roles for the AAA+ motifs of DnaA in the initiation of DNA replication. *Biochem. Soc. Trans.* 36 78-82
- Katayama T., (2017). Initiation of DNA replication at the chromosomal origin *E. coli*, *oriC*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1042 79-98
- Katayama T., Kasho K., Kwakami H., (2017). The DnaA cycle in *Escherichia coli*: Activation, function and inactivation of the initiator protein. *Front. Microbiol.* 8 2496
- Kawakami H., Keyamura K., Katayama T., (2005). Rormation od an ATP-DnaA-specific initiation complex requires DnaA arginine 285, a conserved motif in the AAA+ protein family. *J. Biol. Chem.* 280 27420-27430
- Kawasaki Y., Matsunaga F., Kano Y., Yura T., Wada C., (1996). The localized melting of mini-F origin by the combined action of the mini-F initiator protein (RepE) and HU and DnaA of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 253 42-49
- Kawasaki Y., Wada C., Yura T., (1990). Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. *Mol. Gen. Genet.* 220 277-282.
- Kawasaki Y., Wada C., Yura T., (1992). Binding of RepE initiator protein to mini-F DNA origin (ori2). Enhancing effects of repE mutations and DnaJ heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 267 11520-11524
- Keyamura K., Abe Y., Higashi M., Ueda T., Katayama T., (2009). DiaA dynamics are coupled with changes in initial origin complexes leading to helicase loading. *J. Biol. Chem.* 284 25038-25050
- Keyamura K., Fujikawa N., Ishida T., Ozaki S., Su'etsugu M., Fujimitsu K., Kagawa W., Yokoyama S., Kurumizaka H., Katayama T., (2007). The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in *E. coli* by directly promoting ATP DnaA-specific initiation complexes. *Genes Dev.* 21 2083-2099
- Kline B.C., (1985). A review of mini-F plasmid maintenance. *Plasmid* 14 1-16
- Kolatka K., Kubik S., Rajewska M. and Konieczny I., (2010). Replication and partitioning of the broad-host-range plasmid RK2. *Plasmid* 64 119-134

- Komori H., Matsunaga F., Higuchi Y., Ishiai M., Wada C., Miki K., (1999). Crystal structure of a prokaryotic replication initiator protein bound to DNA at 2.6 Å resolution. *EMBO J.* 18 4597–4607
- Konieczny I., (2003). Strategies for helicase recruitment and loading in bacteria. *EMBO Rep.* 4 37–41
- Konieczny I., Bury K., Wawrzycka A., Wegrzyn K., (2014). Iteron plasmids. *Microbiol. Spectrum* 2(6)PLAS-0026-2014
- Konieczny I., Doran K.S., Helinski D.R., Blasina A., (1997). Role of TrfA and DnaA proteins in origin opening during initiation of DNA replication of the Broad Host Range plasmid RK2. *J. Biol. Chem.* 272(32) 20173-20178
- Konieczny I., Helinski D.R., (1997). Helicase delivery and activation by DnaA and TrfA proteins during the initiation of replication of the broad host range plasmid RK2. *J. Biol. Chem.* 272 33312–33318
- Konieczny I., Liberek K., (2002) Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein. *J. Biol. Chem.* 277 18483–18488
- Kowalczyk L., Rajewska M., Konieczny I., (2005). Positioning and the specific sequence of each 13-mer motif are critical for activity of the plasmid RK2 replication origin. *Mol. Microbiol.* 57 1439–1449
- Kriegstein H.J., Hogness D.S., (1974). Mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structures of replication forks and evidence of bidirectionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 71(1) 135-139
- Kruger R., Konieczny I., Filutowicz M., (2001). Monomer/dimer ratios of replication protein modulate the DNA strand-opening in a replication origin. *J. Mol. Biol.* 306 945–955
- Lee D.G., Bell S.P., (1997). Architecture of the yeast recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol. Cell Biol.*, 17 7159-7168
- Leonard A.C., Rao P., Kadam R.P., Grimwade J.E., (2019) Changing Perspectives on the Role of DnaA-ATP in Orisome Function and Timing Regulation. *Frontiers in Microbiology* 10
- Leonard A.C., Grimwade J. E., (2015). The orisome: structure and function. *Front. Microbiol.* 6 545
- Li J., Dong J., Wang W.,..., Tye B.K., Dang S., Zhai Y., (2023). The human pre-replication complex is an open complex. *Cell* 186(1) 98-111
- Li N., Lam W.H., Zhai Y., Cheng J., Cheng E., (2018). Structure of the origin recognition complex bound to DNA replication origin. *Nature* 559 217-222

- Li S., Wasserman M.R., Yurieva O., Bai L., O'Donnell M.E., Liu S., (2022). Nucleosome-directed replication origin licensing independent of consensus DNA sequence. *Nat. commun.*, 13 4947
- Lin J., Helinski D.R., (1992). Analysis of mutations in *trfA*, the replication initiation gene of the broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* 174 4110–4119
- Lipford J.R., Bell S.P., (2001). Nucleosome position by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol. Cell* 7 21-30
- Liu J., Smith C.L., DeRyckere D., DeAngelis K., Martin G.S., Berger J.M., (2000). Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol. Cell.* 6 637–648
- Lundgren M., Andersson A., Chen L., Nilsson P., Bernander R., (2004). Tree replication origins in *Sulfolobus* species: synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 7046-7051
- Luscombe N.M., Austin S.E., Berman H.M., Thornton J.M., (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biology* 1 ReviewS001
- Majka J., Zakrzewska-Czerwińska J., Messer W., (2001). Sequence recognition, cooperative interaction, and dimerization of the initiator protein DnaA of *Streptomyces*. *J. Biol. Chem.* 276 6243-52
- Matsunaga F., Kawasaki Y., Ishiai M., Nishikawa K., Yura T., Wada C., (1995). DNA-binding domain of the RepE initiator protein of mini-F plasmid: involvement of the carboxyl-terminal region. *J. Bacteriol.* 177 1994–2001
- Marszalek J., Kaguni J.M., (1994). DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269 4883–4890.
- McEachern M.J., Filutowicz M., Helinski D.R., (1985). Mutations in direct repeat sequences and in a conserved sequence adjacent to the repeats result in a defective replication origin in plasmid R6K. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 82 1480–1484
- Mechali M., (2010). Eucaryotic DNA replication origin: many choices for appropriate answers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11 728-738
- Messer W., (2002). The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* 26 355-374
- Messer W., Blaesing F., Majka J., Nardmann J., Schaper S., Schmidt A., Seitz H., Speck C., Tüngler D., Wegrzyn G., Weigel C., Welzeck M., Zakrzewska-Czerwinska J., (2001). Functional domains of DnaA proteins. *Biochemie.* 81(8-9) 819-825
- Miller T.R.C., Locke J., Freiwe J.F., Diffley J.F.X., Costa A., (2019). Mechanism of head-to-head MCM double-hexamer formation revealed by cryo-EM. *Nature* 575 704-710

- Mukhopadhyay G., Carr K.M., Kaguni J.M., Chatteraj D.K., (1993). Open complex formation by the host initiator, DnaA, at the origin of P1 plasmid replication. *EMBO J.* 12 4547–4554
- Murotsu T., Matsubara K., Sugisaki H., Takanami M., (1981). Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. *Gene* 15 257–271
- Nakamura A., Wada C., Miki K., (2007). Structural basis for regulation of bifunctional roles in replication initiator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 18484-18489
- Nasheuer H.P., Meaney A.M., (2024). Starting DNA synthesis initiation processes during the replication of chromosomal DNA in humans. *Genes* 15:360
- Nieto C., Giraldo R., Fernandez-Tresguerres E., Diaz R., (1992). Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae* patovar savastanoi. *J. Mol. Biol.* 223 415–426
- Norais C., Hawkins M., Hartman A.L., Eisen J.A., Myllykallio H., Allers T., (2007). Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS Genet.*, 3:e77
- Oberto J., Nabti S., Jooste V., Mignot H., Rouviere-Yaniv J., (2009). The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One.* 4:e4367
- O'Donnell M., Langston N., Stillman B., (2013). Principles and concepts of DNA replication in Bacteria, Archea and Eukarya. *Cold Spring Harb. Biol.*, 5:a010108
- Ogura T., Niki H., Kano Y., Imamoto F., Hiraga S., (1990). Maintenance of plasmids in HU and IHF mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 220 197–203
- Orlova N., Gerding M., Ivashkiv O., Olinares P.D.B., Chait B.T., Waldor M.K., Jeruzalmi D., (2017). The replication initiator of the cholera pathogen's second chromosome shows structural similarity to plasmid initiators. *Nucleic Acids Res.*, 45 3724-3737
- Ozaki S., Katayama T., (2009). DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid* 62 71–82
- Ozaki S., Katayama T., (2012). Highly organized DnaA-oriC complexes recruit the single-stranded DNA for replication initiation. *Nucleic Acids Res.* 40 1648–1665
- Ozaki S., Kawakami H., Nakamura K., Fujikawa N., Kagawa W., Park S.Y., Yokoyama S., Kurumizaka H., Katayama T., (2008). A common mechanism for the ATP-DnaA-dependent formation of open complexes at the replication origin. *J. Biol. Chem.* 283 8351-8362
- Pacek M., Konopa G., Konieczny I., (2001). DnaA Box Sequences as the Site for Helicase Delivery during Plasmid RK2 Replication Initiation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276 3639-23644

- Park K., Han E., Paulsson J., Chatteraj D.K., (2001). Origin pairing ('handcuffing') as a mode of negative control of P1 plasmid copy number. *EMBO J.* 20 7323–7332
- Parker M.W., Bochdan M.R., Berger J.M., (2017). Mechanism and regulation of DNA replication in eucaryots. *Crit. Rev. Biochem. Mol Biol.* 52(2) 107-144
- Pellicciari S., Bodet-Lefevre S., Fenyk S., Stevensen D., Winterhalter C., Schramm F.D., Pintar S., Burham D.R., Merces G., Richardson T.T., Tashiro Y., Hubbard J., Yardimci H., Ilangovan A., Murray H., (2023). The bacterial replication origins BUS promotes nucleobase capture. *Nat. commun.* 14:8339
- Pellicciari S., Dong M.J., Gao F., Murray H., (2021). Evidence for a chromosome origin unwinding system broadly conserved in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 49 7525–7536
- Perri S., Helinski D.R., (1993). DNA sequence requirements for interaction of the RK2 replication initiation protein with plasmid origin repeats. *J. Biol. Chem.* 268 3662–3669
- Pichugina T., Sugawara T., Kayko A., Schierding W., Masuda K., Uewaki J., Grand R.S., Allison J.R., Martienssen R.A., Nurse P., Ueno M., O'Sullivan J.M., (2016). A diffusion model for the coordination of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Scient. Rep.* 6:18757
- Pierechod M., Nowak A., Saari A., Purta E., Bujnicki J.M., Konieczny I., (2009). Conformation of a plasmid replication initiator protein affects its proteolysis by ClpXP system. *Protein Sci.* 18 637–649
- Rajewska M., Kowalczyk L., Konopa G., Konieczny I., (2008). Specific mutations within the AT-rich region of a plasmid replication origin affect either origin opening or helicase loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 11134–11139
- Rajewska M., Wegrzyn K., Konieczny I., (2012). AT-rich region and repeated sequences: the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 408–434
- Rao H., Stillman B., (1995). The *origin* recognition complex interacts with bipartite DNA binding site within yeast replicators. *PNAS* 92 2224-2228
- Ratnakar P.V., Mohanty B.K., Lobert M., Bastia D., (1996). The replication initiator protein pi of the plasmid R6K specifically interacts with the host-encoded helicase DnaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 5522–5526
- Remus D., Beall E.L., Botchan M.R., (2004). DNA topology, not DNA sequence, is a critical determination for *Drosophila* ORC-DNA binding. *EMBO J.* 23 897-907
- Riber L., Frimodt-Moller J., Charbon G., Lobner-Olsen A., (2016). Multiple DNA binding proteins contribute to timing of chromosome replication in *E. coli*. *Front. Mol. Biosci.* 3 29

- Richardson T.T., Harran O., and Murray H., (2016). The bacterial DnaA-trio replication origin element specifies single-stranded DNA initiator binding. *Nature* 534 412–416
- Robinson N.P., Bell S.D. (2005). *Origins* of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 272 3757-3766
- Robinson N.P., Blood K.A., McCallum S.A., Edwards P.A., Bell S.D., (2007). Sister chromatid junction in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus sulfataricus*. *EMBO J.* 26 816-824
- Robinson N.P., Dionne I., Lundgren M., Marsh V.L., Brenander R., Bell S.D., (2004). Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus sulfataricus*. *Cell* 116 25-38
- Roth A., Messer W., (1995). The DNA binding domain of the initiator protein DnaA. *EMBO J.* 14 2106–2111
- Rozgaja T.A., Grimwade J.E., Iqbal M., Czerwonka C., Vora M., Leonard A.C., (2011). Two oppositely oriented arrays of low-affinity recognition sites in *oriC* guide progressive binding of DnaA during *Escherichia coli* pre-RC assembly. *Mol. Microbiol.* 82 475-488
- Ryan V.T., Grimwade J.E., Nievera C.J., Leonard A.C., (2002). IHF and HU stimulate assembly of pre-replication complexes at *Escherichia coli* *oriC* by two different mechanisms. *Mol. Microbiol.* 46 113–124
- Sakiyama Y., Kasho K., Noguchi Y., Kawakami H., Katayama T., (2017). Regulatory dynamics in the ternary DnaA complex for initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 45 12354–12373
- Samson R.Y., Xu Y., Gadelha C., Stone T.A., Faqiri J.N., Li D., Qin N., Pu F., Liang Y.X., She Q., Bell S.D., (2013). Specificity and function of archaeal DNA replication initiator proteins. *Cell* 3 485-496
- Schmidt J.M., Bleichter F., (2020). Structural mechanism for replication origin binding and remodeling by a metazoan origin recognition complex and its co-loader Cdc6. *Nat. Commun.* 11 4263
- Sharma S., Sathyanarayana B.K., Bird J.G., Hoskins J.R., Lee B., Wickner S., (2004). Plasmid P1 RepA is homologous to the F plasmid RepE class of initiators. *J. Biol. Chem.* 279 6027–6034
- Simonetta K.R., Kazmirski S.L., Goedken E.R., Cantor A.J., Kelch B.A., McNally R., Seyedin S.N., Makino D.L., O'Donnell M., Kuriyan J., (2009). The mechanism of ATP-dependent primer-template recognition by a clamp loader complex. *Cell* 137 659–671
- Singleton M.R., Morales R., Grainge I., Cook N., Isupov M.N., Wyigley D.B., (2004). Conformational changes induced by nucleotide binding in Cdc6/ORC from *Aeropyrum pernix*. *J. Mol. Biol.* 343 547-557

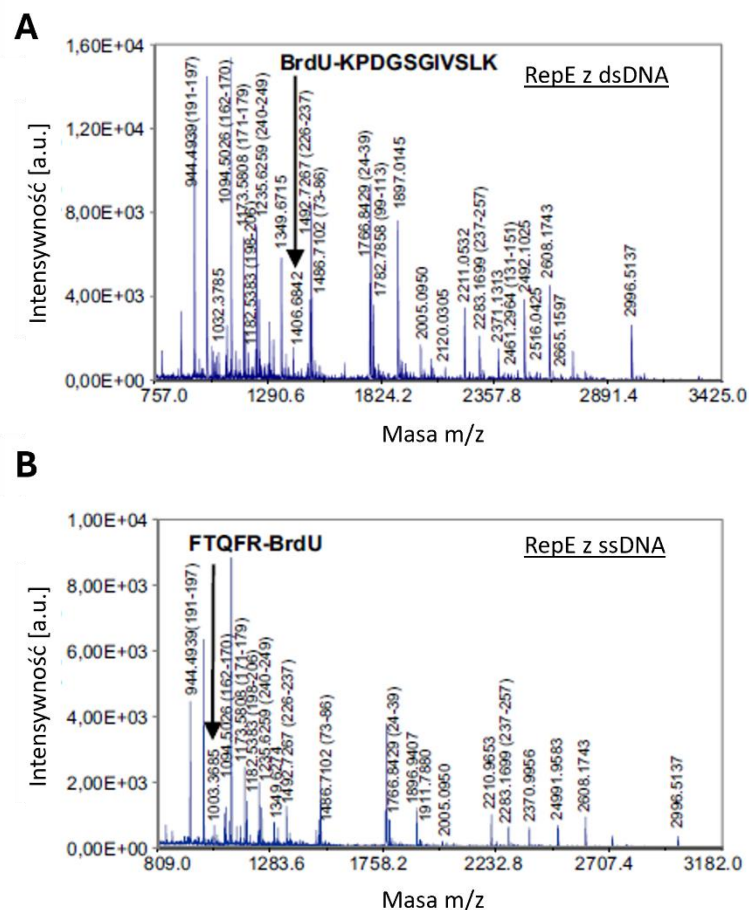
- Skarstad K., Katayama T., (2013). Regulating DNA replication in bacteria. *Colds Spring Harb Perspect Biol.* 5 a012922
- Smyth C., Leigh R.J., Delaney S., Murphy R.A., Walsh F., (2022). Shootikng hoops: globetrotting plasmids spreading more than just antimicrobial resistance genes across One Health. *Microb. Genom.* 8(8) 1-10
- Sozhamannan S., Chatteraj D.K., (1993.) Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. *J. Bacteriol.* 175 3546–3555.
- Stalker D.M., Thomas C.M., Helinski D.R., (1981). Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 181 8–12
- Studier F.W., Moffatt B.A., (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 113-130
- Sugiyama R., Kasho K., Miyoshi K., Ozaki S., Kagawa W., Kurumizaka H., Katayama T., (2019). A novel mode of DnaA-DnaA interaction promotes ADP dissociation for reactivation of replication initiation activity. *Nucleic Acid Res.* 21 11209-11224
- Sun J., Kawakami H., Zech J., Speck C., Stillman B., Li H., (2012). Cdc6-induced conformational changes in ORC bound to *origin* DNA revealed by cryo-electron microscopy. *Structure* 203 534-544
- Sutton M.D., Kaguni J.M., (1997). The *Escherichia coli* dnaA gene: four functional domains. *J. Mol. Biol.* 274 546–561
- Swan M.K., Bastia D., Davies, C., (2006). Crystal structure of pi initiator protein-iteron complex of plasmid R6K: implications for initiation of plasmid DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci .U. S. A*, 103 18481-18486
- Swinger K.K., Rice P.A., (2004). IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 28–35
- Toukdarian A.E., Helinski D.R., Perri S., (1996). The plasmid RK2 initiation protein binds to the origin of replication as a monomer. *J Biol. Chem.* 271(12) 7072–7078
- Urh M., Wu J., Forest K., Inman R.B., Filutowicz M., (1998). Assemblies of replication initiator protein on symmetric and asymmetric DNA sequences depend on multiple protein oligomerization surfaces. *J Mol Biol* 283 619–631
- Wawrzycka A., Gross M., Wasaznik A., Konieczny I., (2015). Plasmid replication initiator interactions with origin 13-mers and polymerase subunits contribute to strand-specific replisome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 4188–4196
- Wegrzyn K., Fuenta-Perez M.G., Bury K., Rajewska M., Moreno-Herrero F., Konieczny I., (2014). Sequence-specific interactions of Rep proteins with ssDNA in the AT-rich region of the plasmid replication origin. *Nucleic Acid Res.* 42(12) 7807-7818

- Wegrzyn K., Konieczny I., (2021). Archeal Orc1 protein interacts with T-rich single-stranded DNA. *BMC Res. Not.* 275
- Wegrzyn K., Oliwa M., Nowacka M., Zabrocka E., Bury K., Purzycki P., Czaplewska P., Pipka J., Nowotny M., Giraldo R., Konieczny I., (2023). Rep molecule accomodates both up together dsDNA and ssDNA which contributes a loop-back mechanism for DNA replication initiation. *Nuclei Acids Res.*, 51(19) 10551-10567
- Wegrzyn K., Witosinska M., Schweiger P., Bury K., Jenal U., Konieczny I., (2013). RK2 plasmid dynamics in *Caulobacter crescentus* cells: two modes of DNA replication initiation. *Microbiology* 159 1010–1022
- Wegrzyn K., Zabrocka E., Bury K., Tomiczek B., Wieczor M., Czub J., Uciechowska U., Moreno-Del Alamo M., Walkow U., Grochowina I. *i wsp.*, (2021). Defining a novel domain that provides an essential contribution to site-specific interaction of Rep protein with DNA. *Nucleic Acids Res.*, 49 3394-3408
- Wei T., Bernander R., (1996). Interaction of the IciA protein with ATrich regions in plasmid replication origins. *Nucleic Acids Res.* 24 1865– 1872
- Weigel C., Schmidt A., Seitz H., Tüngler D., Welzeck M., Messer W., (1999). The Nterminus promotes oligomerization of the *Escherichia coli* initiator protein DnaA. *Mol. Microbiol.* 34 53–66
- Wickner S.H., Chattoraj D.K., (1987). Replication of mini-P1 plasmid DNA in vitro requires two initiation proteins, encoded by the repA gene of phage P1 and the dnaA gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 3668–3672
- Wickner S.H., Hoskins J., McKenney K., (1991). Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 7903–7907
- Wilmes G.M., Bell S.P., (2002). The B2 element of the *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 origin of replication requires specific sequences to facilitate pre-RC formation. *PNAS* 99 101-106
- Włodarczyk M., (2002). Co to jest plazmid? *Kosmos, problemy nauk biologicznych* 3:256 231-240
- Wolanski M., Donczew R., Zawilak-Pawlik A., Zakrzewska-Czerwińska J., (2015). *oriC*-encoded intructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Front. Microbiol.* 5 735
- Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W., (1989); Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17 3469-3478

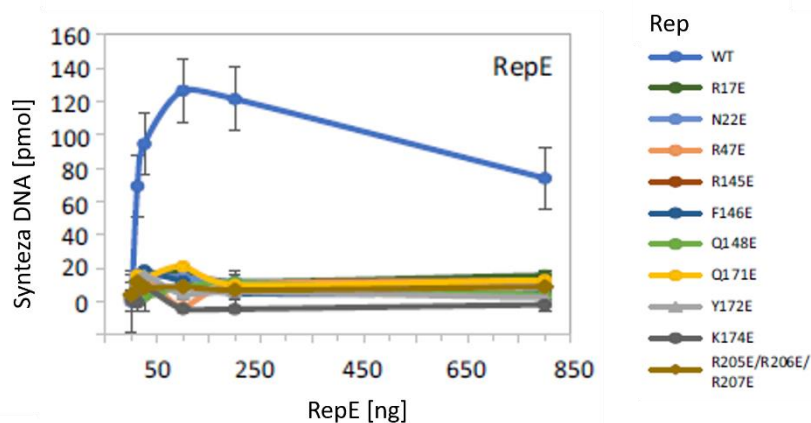
- Wu F., Wu J., Ehley J., Filutowicz M., (1996). Preponderance of Fis-binding sites in the R6K gamma origin and the curious effect of the penicillin resistance marker on replication of this origin in the absence of Fis. *J. Bacteriol.* 178 4965–4974
- Yarragudi A., Parfrey L.W., Morse R.H., (2007). Genome-wide analysis of transcriptional dependence and probable target sites for Abf1 and Rap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 35 193-202
- York D., Filutowicz M., (1993). Autoregulation-deficient mutant of the plasmid R6K encoded pi protein distinguishes between palindromic and nonpalindromic binding sites. *J. Biol. Chem.* 268 21854–21861
- Yoshida R., Ozaki S., Kawakami H., Katayama T., (2023). Single-stranded DNA recruitment mechanism in replication origin unwinding by DnaA initiator protein and HU, an evolutionary ubiquitous nucleoid protein. *Nucleic Acids Res.* 51, 6286–6306
- Zhong Z., Helinski D., Toukdarian A., (2003). A specific region in the N terminus of a replication initiation protein of plasmid RK2 is required for recruitment of *Pseudomonas aeruginosa* DnaB helicase to the plasmid origin. *J. Biol. Chem.* 278 45305–45310
- Zhong Z., Helinski D., Toukdarian A., (2005). Plasmid host-range: restrictions to F replication in *Pseudomonas*. *Plasmid*, 54(1) 48-56.
- Zzaman S., Abhyankar M.M., Bastia D., (2004). Reconstitution of F factor DNA replication in vitro with purified proteins. *J. Biol. Chem.* 279 17404–17410
- Zzaman S., Bastia D., (2005). Oligomeric initiator protein-mediated DNA looping negatively regulates plasmid replication in vitro by preventing origin melting. *Mol. Cell.* 20 833–843

9. WYNIKI UZUPEŁNIAJĄCE

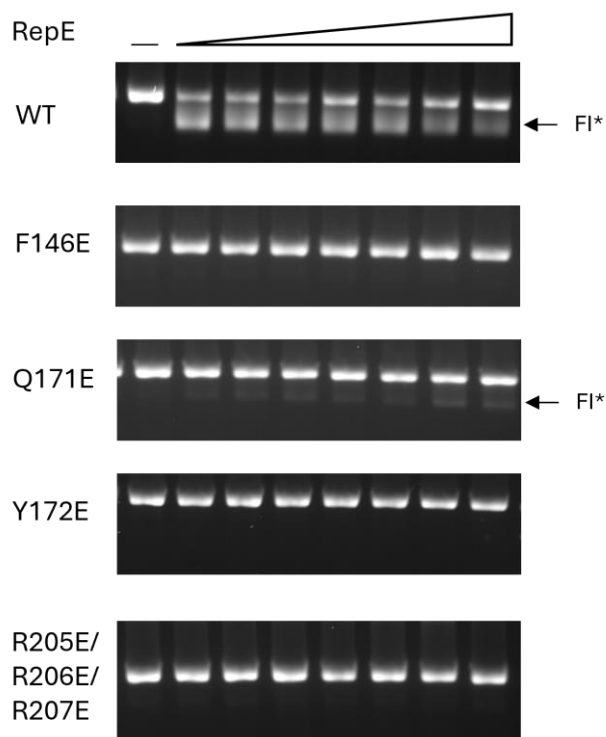
Wyniki przedstawione w tym rozdziale są wynikami uzupełniającymi, mającymi na celu dopełnienie treści tekstu głównego rozprawy doktorskiej dla lepszego przedstawienia kontekstu projektu badawczego oraz utrzymania ciągłości logicznej opisanych analiz. Umieszczone poniżej wyniki pochodzą z naszej publikacji Węgrzyn i wsp., 2023, która została opublikowana po zakończeniu przeze mnie prac badawczych. Opisane eksperymenty zostały przeprowadzone przy współudziale dr hab. Katarzyny Węgrzyn (analiza MS dla białka RepE, analiza syntezy DNA, analiza FI*, eksperyment typu ELISA dla białka RepE, eksperymenty z KMnO₄, oddziaływania wariantów białka RepE z DNA), dr hab. Pauliny Czaplewskiej (analiza MS dla białka TrfA) i dr Katarzyny Bury (analiza AFM dla wariantów białka TrfA i RepE).



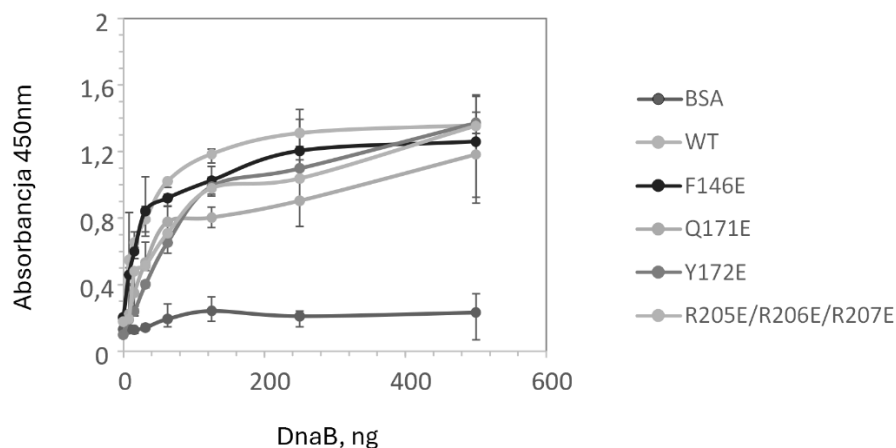
Rycina S9.1 Widmo MALDI-TOF uzyskane dla białka RepE trawionego trypsyną sieciowanego z (A) ssDNA lub (B) dsDNA posiadającym wewnętrzną modyfikację 5-Br-dU. Czarna strzałka wskazuje na zidentyfikowane peptydy.



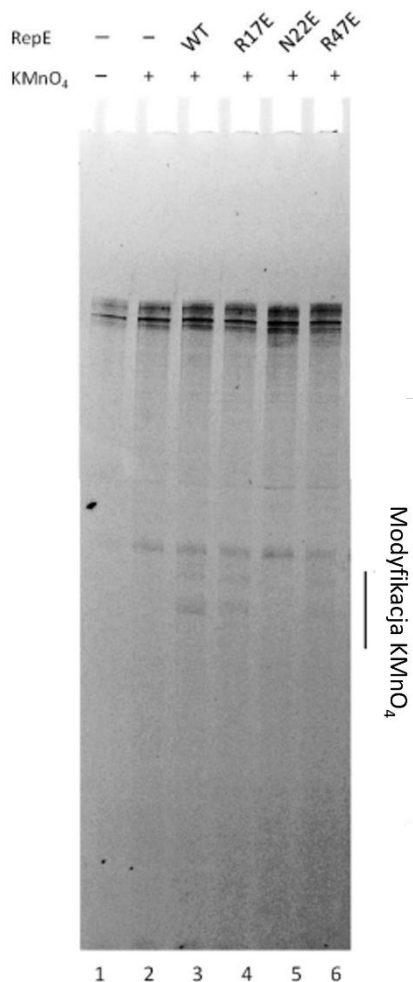
Rycina S9.2 Wpływ substytucji aminokwasów w RepE na replikację plazmidowego DNA *in vitro*. Reakcje przeprowadzono przy użyciu surowego ekstraktu bakteryjnego uzyskanego z komórek *E. coli* C600. Reakcje zawierały 250 ng superskręconego matrycowego DNA, pZZ35 oraz wzrastające stężenia wariantów białka RepE.



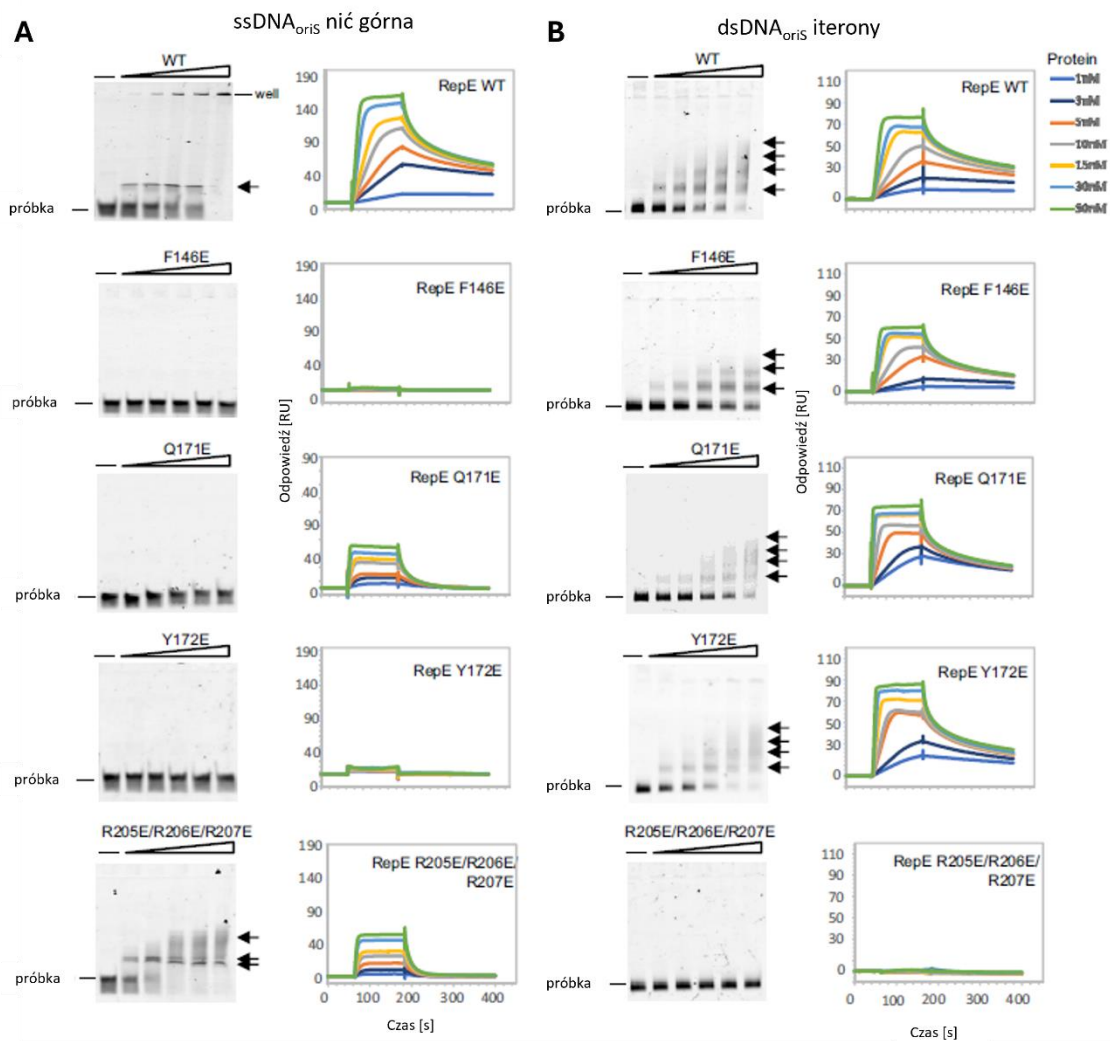
Rycina S 9.3 Aktywacja helikazy *in vitro* przez warianty białka RepE w obrębie *oriS* w teście aktywności helikazy (FI*). Test FI* przeprowadzono przy rosnącym stężeniu wariantów białka RepE. Do reakcji użyto 200 ng plazmidu pZZ35 jako matrycy DNA, 200 ng białka DnaA, 500 ng białka helikazy DnaB w obecności białka HU. Rozdział prowadzono w 1% żelu agarozowym zawierającym EtBr, przy natężeniu 25 V przez okres 24 godziny. Prążki oznaczone strzałkami jako FI* wskazują na aktywację helikazy podczas inicjacji replikacji origin replikacji.



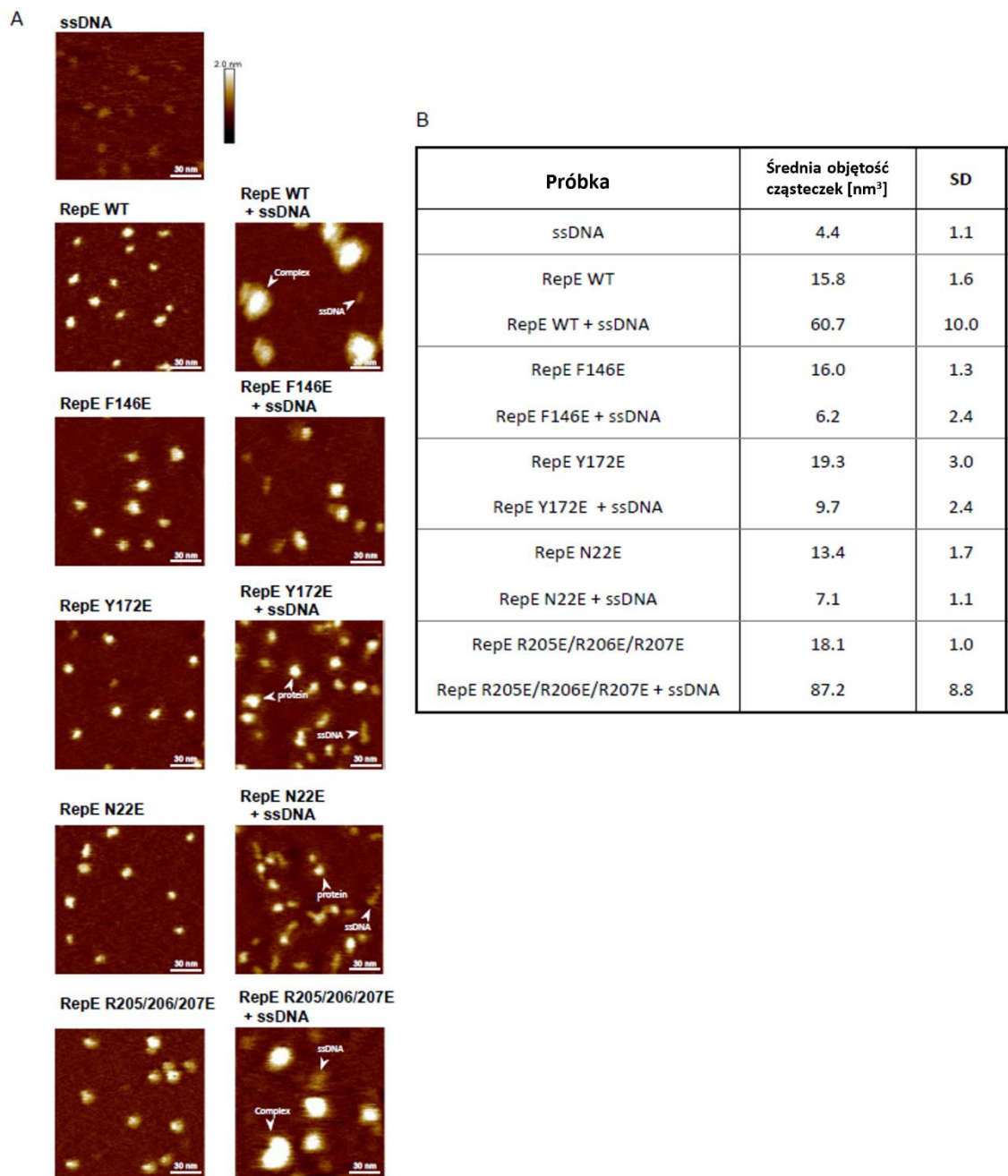
Rycina S9.4 Interakcja wariantów białka RepE z helikazą DnaB w teście immunoenzymatycznym (ELISA). Test typu ELISA przeprowadzono przy rosnących stężeniach helikazy DnaB i stałej ilości wariantów białka RepE. Absorbancję zmierzylam przy długości fali 450 nm.



Rycina S9.5 Otwieranie *origin* replikacji *oriS* przez warianty białka RepE przeprowadzona za pomocą testu typu Footprinting KMnO₄ z wydłużaniem startera. Do reakcji otwierania *origin* replikacji przez warianty białka RepE, jako matrycy DNA użyto plazmidu pZZ35. Czarną pionową linią oznaczono region, w którym następuje destabilizacja dsDNA w rejonie DUE i w którym zaszła modyfikacja KMnO₄. Produkty wydłużenia startera na matrycach uzyskanych w reakcji z: RepE WT (A i B, ścieżki 3), RepE R17E (A, ścieżka 4), RepE N22E (A, ścieżka 5), RepE R47E (A, ścieżka 6).



Rycina S9.6 Analiza interakcji wariantów białek RepE z (A) ssDNA i (B) dsDNA. Interakcję analizowano za pomocą testu typu EMSA SPR. W analizie EMSA wzrastające ilości wariantów białka RepE (10, 20, 40, 80, 165 nM) inkubowano z 20 nM znakowanego fluorescencyjnie ssDNA zawierającego górną nić DUE *oriS* (A) i 50 nM dsDNA zawierającego sekwencję *oriS* (B). Czarne strzałki wskazują kompleksy nukleoproteinowe. W analizie SPR na powierzchnię sensora z unieruchomionym ssDNA zawierającym sekwencję górnej nici DUE *oriS* (A) lub dsDNA *oriS* zawierającego sekwencję iteronów (B) nanoszono wzrastające stężenia wariantów białka RepE (1, 3, 5, 10, 15, 30, 50 nM).



Rycina S9.7 Analiza AFM kompleksów nukleoproteinowych wariantów białka RepE z górną nicią ssDNA DUE_{oris}. (A) Zdjęcie cząsteczek samego ssDNA i samych wariantów białka RepE oraz wariantów białka RepE inkubowanych z ssNA. Cząsteczki osadzone na powierzchni miki i skanowane za pomocą AFM. Do wyświetlenia obrazów wykorzystano oprogramowanie NanoScope Analysis v1.9 (Bruker, Brema, Niemcy) (B) Tabela przedstawiająca średnią objętość cząstek wykrytych podczas analizy AFM. Dla każdej próbki zmierzono co najmniej 300 cząstek. Pomiar wykonano za pomocą oprogramowania NanoScope Analysis v1.9. Średnia objętość cząstek wykrytych podczas analizy mieszaniny RepE WT z fragmentem ssDNA i RepE R205E/R206E/R207E z ssDNA, w porównaniu z samymi wariantami białka lub samym ssDNA, była znacznie wyższa, co wskazuje na tworzenie kompleksów między tymi białkami a ssDNA. W przypadku wariantów RepE N22E, RepE F146E i RepE Y172E nie zaobserwowano cząstek o dużej objętości.