

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

**mgr Monika Oliwa**

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 funkcyjonalny 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-funkcyjnalnej 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.