

Powielanie (replikacja) informacji genetycznej jest niezbędnym elementem cyklu życiowego komórek. Nośnikiem informacji jest kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), który pełni funkcję matrycy do syntezy białek. Sekwencja zasad DNA decyduje o kolejności aminokwasów, a zatem o strukturze oraz własnościach białek. Przed podziałem komórki musi dojść do skopiowania tej informacji, tak aby jeden komplet cząsteczek DNA (chromosomów) trafił do każdej komórki potomnej. Replikacja DNA musi być ściśle kontrolowana. Jeśli bowiem do komórki potomnej trafi niekompletna lub obciążona błędem informacja genetyczna, to taka komórka nie będzie w stanie prawidłowo funkcjonować, co zazwyczaj prowadzi do jej śmierci. Niekiedy, w wyniku otrzymania błędnych informacji, komórka przechodzi transformację nowotworową. Dlatego dokładne zrozumienie procesu replikacji DNA jest bardzo ważne w kontekście opracowywania skutecznych metod zapobiegania i leczenia nowotworów.

Replikacja obejmuje: zmianę przestrzennej organizacji DNA, rozdzielenie jego obu nici, syntezę odcinka początkowego (primera), syntezę komplementarnych nici DNA oraz terminację procesu. Odcinek DNA, w którym dochodzi do rozerwania wiązań między komplementarnymi niciami DNA i w którym działa maszyna replikacyjna, zwany jest widełkami replikacyjnymi. Należy podkreślić, że w jądrze komórkowym kolejne widełki replikacyjne uruchamiane są w pobliżu widełek już aktywnych. Tworzone w ten sposób zgrupowania, fabryki replikacyjne, są budowane przez szereg kompleksów białek zaangażowanych w replikację danego odcinka DNA. Miejsca te są widoczne w mikroskopie świetlnym. Przypuszcza się, że ich powstawanie i dysocjacja są związane z lokalną strukturą DNA i związanymi z nim białkami strukturalnymi (chromatyny). Wiadomo, że każda komórka odtwarza pewną instrukcję, zgodnie z którą różne regiony jądra komórkowego mają przypisany charakterystyczny czas, w którym startuje ich replikacja.

W procesie replikacji uczestniczą enzymy z grupy topoiizomeraz, helikaz, polimeraz DNA, ligaz oraz liczne białka wspomagające replikację. Wśród tych ostatnich ważne miejsce zajmuje PCNA (proliferating cell nuclear antigen), które jest zbudowane z trzech połączonych w pierścień podjednostek (trimer). Struktura taka pozwala na ruch PCNA wzdłuż nici DNA, która przechodzi przez środek pierścieniowego trimera. Dzięki temu PCNA służy jako platforma dokująca dla białek katalizujących replikację DNA, a przede wszystkim dla polimeraz  $\epsilon$  i  $\delta$ , które dodają kolejne nukleotydy do nowej nici DNA syntetyzowanej odpowiednio na wiodącej i opóźnionej nici matrycy. Ponieważ polimeraza działa w sposób jednokierunkowy, synteza DNA odbywa się w sposób ciągły tylko wzdłuż jednej nici (wiodącej). Druga nić (opóźniona) syntetyzowana jest w formie fragmentów (Okazaki), które są następnie łączone. Ze względu na charakter syntezy DNA na nici opóźnionej, w danych widełkach może być obecne na raz wiele cząsteczek PCNA.

Za umieszczenie PCNA na matrycy DNA odpowiada białko RFC (Replication factor C). Uczestniczy ono w otwarciu pierścienia PCNA, ustanowieniu kontaktu pomiędzy PCNA a DNA, oraz zamknięciu pierścienia. Replikacja, a w szczególności oddziaływanie PCNA-RFC było w przeszłości badane głównie metodami biochemicznymi. Brakuje natomiast badań, które odnosiłyby wyniki badań *in vitro* do warunków panujących w żywej komórce. W szczególności, nie wiadomo czy po załadowaniu PCNA na matrycę RFC oddysocjowuje, czy też pozostaje związany z maszyną replikacyjną, uczestnicząc w kolejnych etapach replikacji.

Celem projektu jest zatem poznanie dynamiki RFC w żywych komórkach, ze szczególnym naciskiem na interakcje tego białka z PCNA. Uzyskane dane interpretowane będą w kontekście modeli biochemicznych tego oddziaływania. Podczas badań do komórek modelowych HeLa zostaną wprowadzone fluorescencyjne biosensory, które pozwolą określić poziom i rozmieszczenie białek RFC i PCNA w jądrach komórek podczas replikacji. Dzięki użyciu zaawansowanych technik mikroskopowych poznamy dokładne stężenia białek i to jak zmieniają się one w czasie, jak szybko przemieszczają się pojedyncze molekuly i czy oba białka nie poruszają się połączone. Za pomocą technik inżynierii genetycznej sprawdzimy, że białko RFC utraci część swojej funkcji, po czym sprawdzimy, czy pojawią się różnice w zachowaniu PCNA w komórce.