

Replikacja DNA jest procesem zapewniającym powielenie materiału genetycznego w każdej żywej komórce. Rozpoczęcie tego procesu zachodzi przy udziale białek inicjatorowych, które wiążą się do specyficznych sekwencji w miejscu startu replikacji *origin*. Związanie białka inicjatorowego skutkuje rozpleceniem dwuniciowej helisy DNA w rejonie zwanym DUE (ang. *DNA unwinding element*). Następnie w rejonie tym dochodzi do złożenia maszynarii replikacyjnej i startu syntezy nowej cząsteczki DNA. Białka inicjatorowe różnią się w swej budowie. Inicjacja replikacji chromosomu bakterii zachodzi przy udziale białka inicjatorowego DnaA, które wiąże się do dwuniciowej cząsteczki DNA poprzez domenę DBD (ang. *DNA binding domain*). Następnie białko DnaA poprzez domenę AAA+ (ang. *ATPases Associated with diverse cellular Activities*) tworzy kompleks z powstałym jednoniciowym DNA (ssDNA) w rejonie DUE. Zdolność do tworzenia kompleksu DnaA-ssDNA DUE jest niezbędna do inicjacji replikacji w komórce bakterii. Inicjacja replikacji pozachromosomalnych elementów genetycznych, plazmidów, odbywa się natomiast przy udziale białek Rep. Białka te zbudowane są z domen WH (ang. *Winged Helix*), które odpowiedzialne są za wiązanie dwuniciowego DNA. Jak dotąd nie zidentyfikowano aby jakiegokolwiek ze znanych białek Rep posiadało domenę AAA+. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia pokazały, że pomimo nieposiadania domeny AAA+, białka Rep specyficznym wiążą sekwencję ssDNA rejonu DUE, podobnie jak białka DnaA. Struktura kompleksów Rep z ssDNA nie została jednak opisana. Nie wiadomo które domeny białka Rep wiążą ssDNA oraz które reszty aminokwasowe są zaangażowane w to oddziaływanie. Nieznana jest również rola tworzenia kompleksów Rep z ssDNA w procesie replikacji DNA. Celem przedstawianego projektu jest analiza strukturalno-funkcyjna kompleksów białek Rep z ssDNA DUE. W ramach projektu planuję określić domeny i reszty aminokwasowe białek Rep wiążące ssDNA DUE oraz zbadać jaka jest rola wiązania ssDNA przez białka Rep.

W badaniach przeprowadzę analizy dla kilku plazmidowych białek Rep: białek inicjujących replikację plazmidów o wąskim zakresie gospodarzy (białka RepE plazmidu F oraz białka RepA plazmidu P1) oraz białka inicjującego replikację plazmidu o szerokim zakresie gospodarzy (białka TrfA plazmidu RK2). W pierwszej kolejności okreśnię rejon w białkach Rep zaangażowany w oddziaływanie z ssDNA DUE. Równoległe stosując spektrometrię mas przeprowadzona zostanie identyfikacja reszt aminokwasowych białek Rep będących w bezpośrednim kontakcie z ssDNA. Podjęta zostanie również próba uzyskania struktury kompleksu Rep-ssDNA z wykorzystaniem analiz bioinformatycznych oraz krystalografii. Następnie w oparciu o uzyskane dane zaprojektuję mutanty punktowe białek Rep z zaburzoną zdolnością do oddziaływania z ssDNA. Przeprowadzę analizy *in vivo* i *in vitro* z wykorzystaniem otrzymanych mutantów białek Rep, aby sprawdzić jakie jest znaczenie tworzenia kompleksu Rep-ssDNA na poszczególnych etapach procesu inicjacji replikacji plazmidowego DNA.

Uzyskane wyniki rozszerzą wiedzę o procesie replikacji DNA i oddziaływaniu białek inicjatorowych z DNA. Dane uzyskane w ramach planowanych doświadczeń mogą również mieć znaczenie w pracach nad nowymi strategiami przeciwko lekoopornym szczepom bakterii, zwłaszcza tym, których lekooporność wynika z obecności plazmidowego DNA.