

Aleksandra Wawrzycka

Mechanizm wiązania polimerazy III *Escherichia coli* z origin plazmidu RK2

STRESZCZENIE

Molekularne podstawy replikacji DNA od dawna znajdują się w centrum zainteresowania wielu zespołów badawczych, jednak mechanizm tworzenia *de novo* kompleksu polimerazy w origin replikacyjnym nie został do tej pory do końca wyjaśniony. Synteza DNA replikonów prokariotycznych jak i eukariotycznych to złożony proces w który zaangażowanych jest wiele białek. Białka te, na poszczególnych etapach replikacji DNA tworzą specyficzne kompleksy nukleoproteinowe. Pokazano, że białka inicjujące replikację są odpowiedzialne za początkową destabilizację dwuniciowej struktury DNA, a także mogą być zaangażowane w proces tworzenia kompleksu helikazy w origin replikacyjnym. W sekwencji plazmidowych inicjatorów replikacji zidentyfikowano motyw oddziaływania z β -pierścieniem polimerazy III *E. coli*, natomiast znaczenie tego oddziaływania nie zostało zbadane.

W niniejszej pracy podjęłam się wykonania szczegółowej analizy oddziaływań prowadzących do utworzenia kompleksu polimerazy III *E. coli* w origin replikacyjnym plazmidu RK2, *oriV*. W wyniku przeprowadzonych badań dowiodłam, że plazmidowy inicjator replikacji, białko TrfA, poprzez oddziaływanie z podjednostkami α i β polimerazy III, jest zaangażowane w tworzenie kompleksu replisomu w *oriV*. Oddziaływanie TrfA i β -pierścienia, a także obecność innych białek *E. coli*: DnaA, helikazy, primazy oraz γ -kompleksu okazały się być czynnikami niezbędnymi do utworzenia kompleksu nukleoproteinowego β -pierścienia z DNA plazmidu RK2. Analiza kompleksu nukleoproteinowego tworzonego w origin plazmidu RK2 doprowadziła do zidentyfikowania oddziaływania pomiędzy TrfA a podjednostką α polimerazy III *E. coli*. Przeprowadzone doświadczenia replikacji *in vitro* z wykorzystaniem jednoniciowych matryc DNA plazmidu RK2 o sekwencji nici dolnej oraz nici górnej *oriV* pokazały, że tworzenie kompleksu replikacyjnego zależy od wiązania plazmidowego inicjatora replikacji do jednej z nici plazmidowego DNA. Specyficzną reakcję syntezy DNA obserwowałam tylko na matrycy jednoniciowego DNA zawierającego sekwencję nici dolnej rejonu DUE *oriV*. W reakcji tej niezbędne było także białko TrfA posiadające motyw do wiązania podjednostki β polimerazy III. Powstanie kompleksu replikacyjnego na tej nici warunkuje kierunkowość replikacji.