

Elżbieta Zabrocka

## **Motywy strukturalne białka TrfA niezbędne do tworzenia kompleksów z DNA**

Promotor: Prof. dr hab. Igor Konieczny

### **Streszczenie**

Pomimo znacznego postępu badań nad replikacją DNA wiele aspektów tego kluczowego procesu pozostaje nie do końca wyjaśnionych. Szczegółowe poznanie molekularnych podstaw inicjacji replikacji DNA w bakteriach może być szczególnie istotne dla nowych koncepcji walki z drobnoustrojami patogennymi. Przedmiotem badań przedstawionych w tej pracy jest białko TrfA, inicjujące replikację DNA plazmidu RK2. Plazmid RK2 należy do rodziny plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy i jest w stanie replikować się i utrzymywać w wielu gatunkach bakterii, w tym w bakteriach patogennych. Białko TrfA wiąże się do powtórzonych sekwencji, tak zwanych iteronów zlokalizowanych w obrębie origin, czyli miejsca inicjacji replikacji DNA. Struktura kompleksu TrfA z dwuniciowym DNA (dsDNA) nie została do tej pory opisana. Białko TrfA tworzy również kompleks z jednoniciowym DNA (ssDNA), jednak nie jest wiadome, który rejon TrfA uczestniczy w tym wiązaniu i nic nie wiemy o strukturze tego kompleksu.

Celem niniejszej pracy była analiza motywów strukturalnych białka TrfA niezbędnych do tworzenia kompleksów z DNA. W pierwszym etapie analizowano aktywność replikacyjną wariantów białek TrfA, posiadających mutacje zmieniające specyfikę wiązania do DNA, oraz oddziaływanie tych białek z dsDNA. Analizy SPR oraz analiza wiązania białek *in vivo* potwierdziły wpływ badanych mutacji na oddziaływanie z dsDNA. Następnie zbadano oddziaływanie poszczególnych rejonów TrfA z dsDNA. Wykazano, że TrfA specyficznie wiąże się z dsDNA w rejonie domen WH1WH2 oraz w N-terminalnym końcu. Stosując metodę sieciowania, hydrolizy oraz analizę w spektrometrze masowym zidentyfikowano miejsca interakcji TrfA z dwuniciowym DNA. W przedstawionej pracy wykazano, że TrfA wiąże się z dsDNA poprzez motyw LMCGSDSTRVK (339-349 aa) zlokalizowany w domenie WH2 oraz poprzez motyw AMPNDTARSALFTTR (148-163 aa) znajdujący się w N-terminalnym końcu białka. W kolejnych etapach projektu analizowano wiązanie TrfA z ssDNA. W szeregu doświadczeń genetycznych i biochemicznych badano wpływ wprowadzania mutacji w białku TrfA na wiązanie z jednoniciowym DNA. Analiza wykazała, że znaczącą rolę w oddziaływaniu TrfA z ssDNA mają reszty zlokalizowane w N-terminalnym rejonie białka. Zidentyfikowano miejsca oddziaływania TrfA z jednoniciowym DNA. W wiązanie to zaangażowany jest N-terminalny rejon TrfA poprzez sekwencję AMPNDTAR (148-156 aa) oraz domena WH2

poprzez sekwencję MFDYFSSHR (318-327 aa). Zidentyfikowane rejony zostały zweryfikowane poprzez analizę wiązania z DNA wariantów białka TrfA posiadających mutację w sekwencjach oddziałujących z dsDNA (TrfA R347E) oraz ssDNA (TrfA R327E). Wyniki doświadczeń wykazały, że białko TrfA, posiadające mutację w miejscu wiążącym dwuniciowy DNA (TrfA R347E), nie wiązało dsDNA, jednocześnie wiążąc ssDNA. Natomiast białko posiadające substytucję w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie ssDNA (R327E), nie wiązało ssDNA, ale oddziaływało z dsDNA. Białko TrfA posiadające mutację w rejonie N-terminalnym (TrfA P151S), nie wiązało zarówno dwuniciowego jak i jednoniciowego DNA. Na podstawie wyników analiz genetycznych i biochemicznych zostały przeprowadzone doświadczenia modelowania molekularnego w celu określenia struktury N-końcowego fragmentu TrfA, a także przedstawienia modelu białka TrfA w kompleksie z dsDNA. Na podstawie analiz dynamiki molekularnej uzyskaną strukturę N-terminalnego końca TrfA określono jako domenę typu Winged Helix.