

**„Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA”
mgr Joanna Nowicka**

Ekspansywny rozwój technik biotechnologicznych, w tym metod opartych na reakcji PCR, wymusza poszukiwanie nowych ulepszonych enzymów do amplifikacji kwasów nukleinowych. Metoda ta stanowi podstawę diagnostyki molekularnej zarówno chorób zakaźnych, jak i genetycznych. Dodatkowo jest ona również szeroko stosowana w branży spożywczej, weterynaryjnej, a także w badaniach kryminalistycznych. W technikach amplifikacji DNA, w tym PCR, główny problem sprawiają inhibitory obecne w analizowanych próbkach oraz tzw. trudne matryce np. repetytywne lub bogate w pary GC. Pandemia koronawirusa ujawniła problemy technologiczne zarówno z wysokoprzepustową produkcją polimeraz DNA, jak również ich jakością, zwłaszcza związaną z obecnością pozostałości DNA genomowego gospodarza. Pomimo dużej liczby dostępnych enzymów, wciąż istnieje zapotrzebowanie na nowe, wysokiej klasy enzymy rozwiązujące powyższe problemy i pozwalające na dalszy szybki rozwój diagnostyki molekularnej.

W ciągu ostatnich 20 lat na rynku pojawiło się wiele nowych polimeraz DNA, jak również ich ulepszonych wariantów. Przełomem w projektowaniu wysokowydajnych polimeraz DNA było zastosowanie małych białek wiążących kwasy nukleinowe, jako białek stabilizujących nić DNA podczas jej amplifikacji. Przyszłością nowej generacji komercyjnych polimeraz DNA jest z pewnością zastosowanie inżynierii genetycznej do projektowania i otrzymywania fuzyjnych form polimerazy DNA.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie oraz charakterystyka trzech wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA (V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d). W toku pracy określono wpływ dwóch zupełnie różnych białek wiążących DNA na właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA, utworzonych z ich udziałem. Do badań wykorzystano modyfikacje polimerazy DNA Pfu, która wg dostępnych danych jest najpowszechniej stosowana i uznawana za enzym o wysokiej wierności, termostabilności i odporności na niektóre inhibitory reakcji PCR.

Każda termostabilna polimeraza DNA posiada jedną lub więcej z unikalnych cech, np. czułość, szybkość wydłużania DNA, procesywność, specyficzność, czy odporność na zanieczyszczenia. Charakterystyczne właściwości każdego białka można wykorzystać do stworzenia jedynych w swoim rodzaju wariantów polimeraz DNA. Wiele badań wskazuje na to, że nawet niewielkie różnice w sekwencji aminokwasów oraz dodatek białka wiążącego DNA może skutkować ogromnymi pozytywnymi zmianami ich właściwości biochemicznych,

co sugeruje, że możliwe jest otrzymanie nowych polimeraz DNA o ulepszonej funkcjonalności.

Wszystkie właściwości otrzymanych w niniejszej pracy doktorskiej wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA były porównywane do najbardziej znanej modyfikacji polimerazy Pfu, czyli Pfu-Sso7d, która została wyprodukowana równolegle z pozostałymi enzymami i stosowana jako referencja. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyłonienie spośród trzech wariantów jednego – V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, który wyróżniał się unikalnymi właściwościami, które nie zostały do tej pory udokumentowane w literaturze. Obecność dwóch jednakowych białek wiążących DNA takich jak Sso7d umieszczonych na obu końcach polimerazy DNA V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, pozwala na uzyskanie wariantu polimerazy DNA, umożliwiającej przeprowadzenie reakcji PCR w różnych warunkach reakcyjnych, o wysokiej tolerancji na stężenia soli oraz szerokim zakresie tolerancji na stosowane pH, o wyjątkowej aktywności, pozwalającej na wydajną amplifikację DNA w trudnych warunkach reakcyjnych, o dużej odporności na inhibitory występujące w próbkach klinicznych, takie jak krew pełna, heparyna, ampicylina czy kwas humusowy, o innej kinetyce oddziaływania z kwasami nukleinowymi oraz o zwiększonej czułości, przy zachowaniu pozostałych cennych właściwości referencyjnej polimerazy DNA Ref1 Pfu-Sso7d, takich jak termostabilność, odporność na niektóre inhibitory, czy zdolność amplifikacji tzw. trudnych matryc bogatych w pary GC.

Dodatkowo scharakteryzowano fuzyjną formę archealnej polimerazy DNA zawierającą białko NeqSSB pochodzące z *Nanoarchaeum equitans*. Wykazano, że otrzymana polimeraza DNA wykazała się większą czułością, wyższą aktywnością oraz odpornością na inhibitory takie jak krew pełna w stosunku do referencyjnej polimerazy DNA. Wszystkie zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki mogą przyczynić się do postępu w dziedzinie szeroko pojętej diagnostyki.

Niniejsza praca doktorska była częścią wydziałowego projektu Młodych Naukowców „Fuzyjna polimeraza DNA z białkami wiążącymi jedno- i dwuniciowe DNA – produkcja, charakterystyka i zastosowanie w trudnych reakcjach PCR”.