

Warszawa, 9.08.2023

Dr hab. Anna Bębenek
Pracownia Replikacji DNA i Stabilności Genomu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Sebastiana Dorawy pt.,

“Charakterystyka molekularna polimerazy DNA faga Tt72 bakterii *Thermus thermophilus* MAT72.”

Zachowanie wysokiej wierności replikacji DNA ma fundamentalne znaczenie dla zapewnienia wiernego przekazywania informacji genetycznej w czasie podziałów komórkowych, jak również w czasie replikacji wirusów i przekazywania materiału genetycznego do fagów potomnych. Opiszano wiele polimeraz DNA, które występują w komórkach eukariotycznych, prokariotycznych oraz Archeonach a także wirusowe polimerazy, które kodowane są w genomach wirusowych. Ze względu na ogromną różnorodność organizmów prokariotycznych i zasiedlanych przez nie środowisk, pewną lukę stanowi wiedza na temat polimeraz bakteriofagów namnażających się w bakteriach termofilnych. W swojej pracy mgr. Sebastian Dorawa opisuje termofilną polimerazę DNA faga Tt72 bakterii *Thermus thermophilus* MAT72. Praca doktorska mgr. Sebastiana Dorawy została wykonana na Wydziale Biologii w Katedrze Mikrobiologii, Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Kaczorowskiego.

Praca przygotowana jest w formie monografii i ma układ typowy dla tego typu prac.

Wstęp. W dość obszernym Wstępie Doktorant opisuje rodziny polimeraz, które występują we wszystkich domenach życia. Każdej z rodzin polimeraz Doktorant poświęca oddzielny podrozdział. W części opisującej rodzinę B polimeraz znajduje się zdanie. „Wyjątkiem są polimerazy DNA z organizmów eukariotycznych, u których większość nie posiada aktywności korektorskiej.”
Prosiłabym o komentarz do tego stwierdzenia.

Ponieważ opisywana przez Doktoranta polimeraza DNA faga Tt72 należy do polimeraz z rodziny A, budowa centrum aktywnego polimerazy oraz egzonukleazy, a także mechanizm działania polimeraz zostały omówione na przykładzie budowy polimerazy I z *E. coli*, która jest takim modelem Sevres dla tej rodziny polimeraz.

W dalszej części Wstępu Doktorant omawia znane bakteryjne polimerazy termofilne występujące w termofilnych bakteriach oraz Archeonach. Polimerazy te należą do rodziny polimeraz A oraz rodziny polimeraz B. W Tabeli 2 zebrane są główne polimerazy termofilne z podziałem na rodziny polimeraz i krótką ich charakterystyką.



Ponieważ polimerazy z fagów termofilnych są słabo poznane, opisana jest tylko jedna taka polimeraza z bakteriofaga G20c infekująca bakterię *Thermus thermophilus*, dalsze rozdziały wstępu poświęcone są opisaniu cyklu życiowego oraz przedstawiony jest krótki opis fagowej polimerazy T7, enzymu należącego do polimeraz klasy A. Wstęp zamyka opis zastosowania różnych polimeraz fagowych w biologii molekularnej.

Cel pracy jest ściśle zdefiniowany i można go krótko podsumować, jako charakterystykę na poziomie molekularnym termofilnej polimerazy DNA bakteriofaga vB_Tt72 infekującego bakterię *Thermus thermophilus*.

Kolejny rozdział to **Materiały i Metody**. W rozdziale tym zawarte są wszystkie niezbędne informacje dotyczące zastosowanych szczepów i plazmidów bakteryjnych, oligonukleotydów wykorzystanych do konstrukcji plazmidów do klonowania oraz mutagenyzy ukierunkowanej w celu otrzymania mutantów polimerazy DNA faga Tt72, składy buforów i podłoży. Metody są szczegółowo opisane, co jest pomocne w śledzeniu wyników.

Wyniki. Doktorant wykonał ogromną pracę charakteryzując polimerazę DNA bakteriofaga vB_Tt72. Praca ta poszerza naszą wiedzę o kolejną termofilną polimerazę z rodziny A. Jak wspomina Doktorant we Wstępie jest to pierwsza tak dokładnie scharakteryzowana polimeraza tej rodziny bakteriofagów. Praca porusza szereg zagadnień i zawiera wiele wyników, z których za najbardziej znaczące uznałabym:

1. Sklonowanie genu polimerazy faga vB_Tt72 oraz ustalenie warunków nadprodukcji i etapów czyszczenia polimerazy Tt72.
2. Wykazanie, że polimeraza DNA faga Tt72 nie komplementuje wzrostu szczepu *E. coli* JS200 [pBR322] *recA718 polA12^{ts}* z termowrażliwym wariantem polimerazy DNA I., podobnie jak dwie inne polimerazy DNA z termofilnych fagów ϕ YS40 oraz ϕ TMA.
3. Określenie optymalnych warunków reakcji; temperatury (55°C), stężenia jonów Mg^{2+} (0,5 mM $MgCl_2$), pH 8,5 i soli (25 mM KCl).
4. Wykazanie, że obecność znacznika histydynowego zarówno na N- końcu jak i C-końcu białka nie ma wpływu na aktywność polimerazy.
5. Określenie stabilności termicznej polimerazy.
6. Wykazanie, że chemiczne czaperony takie jak Trehaloza czy TMAO podwyższają stabilność termiczną polimerazy DNA Tt72 i aktywność polimerazy w temperaturze 65°C i 75°C.
7. Wykazanie, że aktywność egzonukleotyczna polimerazy nie jest całkowicie hamowana przez wysokie stężenia dNTP (1 mM).
8. Wykazanie, że badana polimeraza nie ma aktywności terminalnej transferazy.

Dlaczego, gdy badany był wpływ temperatury na aktywność egzonukleolityczną polimerazy DNA Tt72 nie zaobserwowano w żadnym przedziale temperatur obniżenia aktywności egzonukleolitycznej w obecności 100 μ M dNTPów (Ryc. 35)? Taki wpływ obserwowano badając aktywność tej polimerazy w temperaturze 55°C. (Ryc.34)

W swojej pracy Doktorant wykorzystał test α -komplementacji w genie *lacZ* α w plazmidzie pSJ3 stosowany do pomiaru wierności replikacji *in vitro*. Wykorzystując ten test określił częstość mutacji i wierność replikacji dla polimerazy DNA Tt72 typu dzikiego. Chciałabym zwrócić uwagę, że delecja 43 nukleotydów nie jest mutacją przesuwającą ramkę odczytu.

Chciałabym, żeby w czasie obrony Doktorant wyjaśnił dokładnie, w jaki sposób liczona była częstość mutacji oraz wierność replikacji, ponieważ nigdzie w tekście nie ma o tym ani słowa.

Znaczna część Doktoratu poświęcona jest analizie funkcjonalnej polimerazy Tt72. Dla polimerazy tej na podstawie sekwencji i przypisania jej do rodziny polimeraz rodziny A poprzez modelowanie homologiczne stworzony został model strukturalny. W modelu tym, podobnie jak w modelu dla polimerazy I DNA z *E. coli*, można wyróżnić domenę egzonukleazy oraz polimerazy z subdomenami, palców, śródreża i kciuka. Na potrzeby walidacji tego modelu Doktorant skonstruował szereg mutantów, 10 w domenie egzonukleazy oraz 21 w domenie polimerazy. Wszystkie niosły zmiany w wysoko konserwowanych motywach, zmiany korespondujące z ich odpowiednikami w polimerazie I *E. coli*, które to według przewidywań modelu mogą być zaangażowane w aktywność katalityczną domeny egzonukleazy lub polimerazy. Wszystkie te zmutowane warianty polimerazy Tt72 zostały oczyszczone i poddane wnikliwej analizie.

Najważniejsze wyniki dotyczące domeny egzonukleazy.

1. Wprowadzone mutacje w domenie egzonukleazy nie powodują znaczących zmian w strukturze białka, co potwierdzono badając stabilność termiczną zmutowanych wariantów polimerazy.
2. Potwierdzono, że reszty aminokwasowe D15, E17, D78, Y180 oraz Y184 są zaangażowane w tworzenie centrum katalitycznego domeny egzonukleazy. Ich podstawienie do Alaniny powoduje istotne obniżenie aktywności katalitycznej egzonukleazy przy zachowaniu wysokiej aktywności polimerazy i znacznie obniżonym stopniem powinowactwa do substratu dsDNA. Wierność replikacji obniżona jest od 2-3 razy.

Badając wpływ poszczególnych reszt aminokwasowych domeny polimerazy na jej aktywność katalityczną skonstruowano podwójne mutanty, które zawsze zawierały mutację inaktywującą domenę egzonukleazy, D78A oraz kolejne podstawienia aminokwasowe w przewidzianych na podstawie struktury siedmiu konserwowanych motywach. Skonstruowano 21 takich mutantów.

Ze względu na bardzo dużą liczbę analizowanych wariantów polimerazy za najważniejsze Wyniki dotyczące domeny katalitycznej uznałabym:

1. Wykazanie, że wprowadzone mutacje w domenie polimerazy nie powodują znaczących zmian w strukturze białka, co potwierdzono badając stabilność termiczną zmutowanych wariantów polimerazy.



2. Wykazanie, że niektóre ze zmutowanych wariantów polimerazy miały w sposób istotny obniżone wiązanie do DNA (K_D) i często obniżoną aktywność katalityczną, co mogło wskazywać, że te reszty pełnią istotną rolę w wiązaniu polimerazy do dsDNA. .
3. Wytypowanie reszt aminokwasowych D384, D615, S616, które tworzą centrum katalityczne polimerazy Tt72 i wykazanie, że zamiana do Alaniny prawie całkowicie hamuje aktywność polimerazy w przypadku wariantów D384A i D615A, natomiast aktywność katalityczna wariantu S616A jest tylko nieznacznie obniżona.

W Tabeli 34 brakuje danych dla wariantu polimerazy D78A, czyli wariantu referencyjnego.

W pracy Doktorskiej pokazano jeszcze, że polimeraz DNA Tt72 posiada zdolność procesowania lepkich końców w DNA powstałych w skutek np. działania enzymów restrykcyjnych. Wypełnia końce 5' oraz usuwa kohezyjne końce od strony 3', co prowadzi do otrzymania tępych końców DNA. Posiada także zdolność usuwania jednonukleotydowych nawisów (dA) z końców 3' produktów reakcji PCR.

Dyskusja jest chyba najlepiej napisanym rozdziałem w pracy. W sposób bardzo klarowny podsumowuje wyniki uzyskane w pracy. W Dyskusji dużo miejsca poświęcono na omówienie wyników dotyczących ról, jakie mogą pełnić reszty aminokwasowe w domenie egzonukleazy czy polimerazy, które były przedmiotem analizy w pracy i były wytypowane poprzez poszukiwanie analogii pomiędzy wygenerowanym modelem polimerazy Tt72 a strukturą fragmentu Klenow DNA I z *E. coli*. Tutaj zabrakło mi odniesienia, która konkretnie struktura polimerazy I DNA z *E. coli* była tą referencyjną strukturą, na którą powołuje się Doktorant w Dyskusji. W Dyskusji opisana jest nie tylko budowa polimeraz z rodziny A, ale także mechanizm działania polimerazy w oparciu o bogaty przegląd literaturowy.

W czasie czytania tej pracy nasunęło mi się kilka pytań, które chciałaby zadać Doktorantowi.

- 1 Jakie czynniki determinują wierność replikacji DNA?***
- 2 O czym może świadczyć obniżone powinowactwo badanych mutantów polimerazy do DNA?***
- 3 Czy polimeraza DNA Tt72 może mieć zastosowanie aplikacyjne?***
- 4 Czy planowane są dalsze prace nad polimerazami ϕ YS40 oraz ϕ TMA?***

Oceniając tę pracę chciałabym podkreślić, że Doktorant posłużył się szerokim wachlarzem metod biofizycznych jak również metodami czysto biochemicznymi i mikrobiologicznymi do opisanie właściwości fizykochemicznych i molekularnych badanej polimerazy. Duża część wyników została opublikowana w 2022 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* gdzie Doktorant był pierwszym autorem. Uważam, że wyniki zamieszczone w pracy doktorskiej są bardzo ciekawe i w sposób istotny poszerzają naszą wiedzę na temat polimeraz z rodziny A. Mgr Sebastian Dorawa wykazał się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością prowadzenia pracy badawczej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji **rozprawa doktorska spełnia** wymogi określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. Zm.) w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1669 z późn. Zm.).



Anna Bębenek

