

“Charakterystyka molekularna polimerazy DNA faga Tt72 bakterii *Thermus thermophilus* MAT72”
mgr Sebastian Dorawa

W niniejszej pracy przedstawiono strukturalną oraz funkcjonalną charakterystykę polimerazy DNA faga ν B_Tt72 (*Myoviridae*), który infekuje termofilną bakterię *Thermus thermophilus* MAT72. Enzym wykazuje bardzo niski poziom podobieństwa (<30%) do białek z rodziny A polimeraz DNA, z wyjątkiem dwóch niescharakteryzowanych polimeraz DNA fagów *Thermus thermophilus*: ϕ YS40 (91,3%) i ϕ TMA (90,6%). Gen *polA* Tt72 koduje białko o masie cząsteczkowej 80,490 kDa (703 aa). Analiza *in silico* wykazała, że enzym posiada domenę nukleotydylotransferazy oraz domenę o aktywności egzonukleazy 3'→5'. Przedmiotowe białko zostało oczyszczone do stanu jednorodności elektroforetycznej oraz katalitycznej za pomocą trzyetapowego procesu oczyszczania, a następnie poddane charakterystyce biochemicznej. Optymalną aktywność polimerazy DNA Tt72 stwierdzono w 55°C, pH 8,5, 25 mM KCl i 0,5 mM Mg²⁺. Pomimo pochodzenia białka z termofilnego źródła, badany enzym wykazuje umiarkowaną stabilność termiczną. Powyżej 60°C następuje szybka utrata aktywności (brak aktywności powyżej 75°C). Dodatek trehalozy, betainy czy *N*-tlenku trimetyloaminy (TMAO), chronił enzym przed inaktywacją termiczną w 75°C. Analiza krzywej termicznej polimerazy DNA Tt72 wykazała $T_m=74,6^\circ\text{C}$. Ukierunkowana mutageneza ujawniła, że wysoce konserwatywne reszty D¹⁵, E¹⁷, D⁷⁸, D¹⁸⁰ i D¹⁸⁴ w domenie egzonukleazy 3'→5' oraz D³⁸⁴ i D⁶¹⁵ w domenie nukleotydylotransferazy mają kluczowe znaczenie dla aktywności enzymu.