Biochemiczna i funkcjonalna charakterystyka polimerazy DNA kodowanej przez bakteriofaga vB_EfaS-271

mgr Karolina Zdrojewska

Większość polimeraz DNA traci wydajność katalityczną wraz ze spadkiem temperatury poniżej 20°C. Stanowi to fundamentalne ograniczenie dla metod diagnostyki izotermalnej, zwłaszcza przeznaczonych do zastosowań terenowych, które powinny funkcjonować bez aktywnego ogrzewania. Niniejsza praca rozpoczęła się od odkrycia w genomie bakteriofaga vB_EfaS-271, wyizolowanego ze ścieków w Gdańsku, genu kodującego nieopisaną wcześniej polimerazę DNA z rodziny B, nazwaną Efa. Enzym ten wykazał wyjątkowo wysoką aktywność w niskich temperaturach. Testy wydłużania startera potwierdziły wydajną syntezę DNA w zakresie od -5 do 50°C. Bezpośrednie porównania przeprowadzone w temperaturze -10°C wykazały, że Efa syntetyzuje produkt pełnej długości. Natomiast polimerazy T4, T7 oraz Pol I z E. coli pozostają praktycznie nieaktywne. Wyniki te doprowadziły do postawienia istotnego pytania mechanistycznego: jakie adaptacje molekularne umożliwiają polimerazie Efa prowadzenie syntezy DNA w warunkach, w których większość polimeraz przestaje funkcjonować?

Pierwszych wskazówek dostarczyły analiza sekwencji aminokwasowej oraz predykcja struktury białka. Efa posiada typowy dla polimeraz z rodziny B rdzeń katalityczny obejmujący domeny dłoni, palców, kciuka oraz domenę egzonukleazową 3'→5'. Jednocześnie zawiera dodatkową domenę N-końcową (reszty 27-124), tworzącą fałd OB (oligonucleotide-binding fold), który jest motywem strukturalnym charakterystycznym dla białek wiążących jednoniciowe DNA. Przykładami takich białek są bakteryjne białka SSB (single-stranded DNA-binding proteins) czy eukariotyczne białka RPA (replication protein A). W celu określenia funkcji tej domeny skonstruowano wariant delecyjny Efa ΔN, pozbawiony regionu N-końcowego. W temperaturze 10°C polimeraza typu dzikiego wbudowywała nukleotydy w warunkach pojedynczego cyklu katalitycznego (single-turnover) ze stałą szybkości obserwowanej wynoszącej 27,3 s-1, podczas gdy aktywność wariantu Efa ΔN była ponad 500-krotnie niższa (0,05 s-1). Różnice te były szczególnie widoczne podczas syntezy na matrycach zawierających struktury typu spinki do włosów. Polimeraza typu dzikiego skutecznie wydłużała starter przez obszary o strukturze drugorzędowej, wytwarzając produkt pełnej długości, natomiast wariant delecyjny zatrzymywał syntezę w miejscu rozpoczęcia struktury spinki do włosów.

Krystalografia rentgenowska pozwoliła wyjaśnić strukturalne podstawy tej adaptacji do niskich temperatur. Strukturę apoenzymu wyznaczono z rozdzielczością 2,3 Å, ujawniając obecność N-końcowego fałdu OB położonego nad rdzeniem polimerazy. Analiza kompleksów trójskładnikowych z matrycą starterową wykazała występowanie dwóch odmiennych stanów konformacyjnych. W pierwszym z nich domena OB oddziałuje z sześcionukleotydowym jednoniciowym końcem 5′ poprzez kontakty z udziałem reszt K53, Y74, R79 i F105. W drugim stanie, obserwowanym przy czteronukleotydowym końcu jednoniciowym, domena odchyla się o około 4 Å i obraca o 22°. Zmiany konformacyjne bezpośrednio przekładają się na właściwości kinetyczne enzymu. W obecności długich jednoniciowych końców polimeraza typu dzikiego charakteryzowała się szybkim wbudowywaniem pojedynczego nukleotydu, natomiast skrócenie końca do czterech nukleotydów powodowało ~130-krotny spadek wartości kobs, upodabniając zachowanie enzymu do obserwowanego dla wariantu Efa ΔN. Analiza Arrheniusa wykazała ponadto, że związanie domeny N-końcowej z jednoniciowym DNA wiąże się z inną pozorną zależnością temperaturową obserwowanej szybkości reakcji w badanych warunkach.

Podsumowując, uzyskane wyniki wspierają model, w którym Efa, według naszej wiedzy, jest pierwszą pochodzącą od bakteriofaga zimnoaktywną polimerazą DNA z rodziny B scharakteryzowaną na poziomie strukturalnym. Wykazano, że jej N-końcowy fałd OB pełni funkcję zintegrowanego modułu przypominającego białka SSB, stabilizując jednoniciowe DNA oraz przyspieszając przyłączanie nukleotydów w niskich temperaturach. Architektura ta, łącząca klasyczny rdzeń polimerazy z dodatkową domeną wiążącą DNA, która w sposób dynamiczny oddziałuje z matrycą zależnie od długości jednoniciowego końca, stanowi naturalny model dla projektowania wielodomenowych polimeraz o pożądanych właściwościach temperaturowych. Unikalne cechy polimerazy Efa czynią ją obiecującą platformą do opracowania niskotemperaturowych metod amplifikacji izotermalnej zdolnych do działania w temperaturze otoczenia bez specjalistycznych urządzeń grzewczych, co może istotnie zwiększyć dostępność diagnostyki molekularnej w warunkach ograniczonych zasobów.

Dokument zanonimizowany za pomocą UG DLP Anonimizator, 2026-10-08 12:13:47