

Streszczenie

Wpływ mutacji Y257A w domenie egzonukleazy na wierność replikacji polimerazy faga RB69

Replikacyjna polimeraza DNA faga RB69 charakteryzuje się wysoką wiernością replikacji. Należy ona do rodziny B polimeraz DNA, tej samej do której należą eukariotyczne polimerazy replikacyjne, Pol α , δ oraz ε . Analiza struktur krystalicznych otrzymanych dla polimerazy RB69 wykazała istnienie pętli β w obrębie domeny egzonukleazy, zaangażowanej w proces przekazywania końca startera DNA do centrum aktywnego tej domeny. W niniejszej pracy zbadano rolę Tyr257 w pętli β w powyższym procesie, a tym samym jej wpływ na kształtowanie wierności replikacji. W tym celu Tyr257 zamieniono na Alaninę, a wierność replikacji otrzymanego mutantu zbadano wykorzystując testy mutagenyzy typu rewersji oraz mutagenyzy wyprzedzającej, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Mutant Y257A polimerazy RB69 wykazuje nieznacznie obniżoną wierność replikacji, a rodzaje wprowadzonych mutacji są podobne do tych zaobserwowanych u polimerazy dzikiej. Tyr257 nie pełni więc istotnej roli w pętli β , a tym samym nie jest zaangażowana w przekazywanie startera do domeny egzonukleazy.

Słowa kluczowe: polimerazy DNA, fag RB69, wierność replikacji, pętla β

Summary

Replication fidelity of RB69 Y257A DNA polymerase mutant

Multiple researches show that phage RB69 replicative DNA polymerase achieves very high replication fidelity. RB69 polymerase is a member of a B family, which also includes eucariotic replicative polymerases such as Pol α , δ and ε . Analysis of the crystal structures of the RB69 polymerase revealed the presence of a β loop within the exonuclease domain. This loop is thought to be involved in primer switching to the exonuclease active center. Here we examine the role of a Y257 residue in primer switching and its influence on replication fidelity. In our work Y257 residue located on the β loop has been changed to Alanine. Y257A mutant replication fidelity was then examined in forward and reverse mutagenesis tests, *in vivo* and *in vitro*. The Y275A mutant shows slightly decreased replication fidelity. The types of mutations are very similar to those made by a wild type polymerase. Our results lead to the conclusion that Y257 residue doesn't play an important role within the β loop and its not involved in primer switching to the exonuclease domain.

Key words: DNA polymerase, phage RB69, replication fidelity, β loop