

AUTOREFERAT

Strukturalne podstawy replikacji i naprawy ludzkiego mitochondrialnego DNA

Dr Michał Roman Szymański

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu
Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2019

1. Imię i Nazwisko: **Michał Roman Szymański**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

Doktorat (PhD) w biochemii i biologii molekularnej (z wyróżnieniem) 08/2007 - 12/2011

Molecular Biophysics Educational Track

Biochemistry and Molecular Biology Department, University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone

Promotor: Prof. Wlodek M. Bujalowski, Ph.D.

Tytuł rozprawy: Inicjowane przez helikazę formowanie kompleksów makromolekularnych zaangażowanych w replikację i naprawę DNA.

Bachelor of Science w naukach biomedycznych i biofizycznych (z wyróżnieniem) 01/2002 - 05/2007

Druga specjalizacja: Chemia ogólna

Biology and Biochemistry Department, University of Houston, Houston, Teksas, Stany Zjednoczone

Opiekun naukowy: Prof. H.J. Yeo, Ph.D.

Tytuł rozprawy: Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna białka błonowego HMW1B z *Haemophilus influenzae*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

Adiunkt / Kierownik Pracowni Biologii Strukturalnej 10/2017 – obecnie

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Gdańsk, Polska

Research Scientist 02/2016 – 09/2017

Grupa kierowana przez: Prof. Whitney Y. Yin, MD., Ph.D.

Pharmacology and Toxicology Department

University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone

Staż podoktorski (Jeane B. Kempner Postdoctoral Fellowship#) 05/2013 – 01/2017

Grupa kierowana przez: Prof. Whitney Y. Yin, MD., Ph.D.

Pharmacology and Toxicology Department

University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone

Stypendium naukowo-badawcze od Jeane B. Kempner Foundation

Staż podoktorski (Jeane B. Kempner Postdoctoral Fellowship#) 01/2012 – 04/2013

Grupa kierowana przez: Prof. Wlodek M. Bujalowski, Ph.D.

Biochemistry and Molecular Biology Department

University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone

Stypendium naukowo-badawcze od Jeane B. Kempner Foundation

Asystent naukowy / doktorant (Graduate Student) 08/2007 - 12/2011

Grupa kierowana przez: Prof. Wlodek M. Bujalowski, Ph.D.

Biochemistry and Molecular Biology Department

University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone

Asystent naukowy (Welch Research Assistant*)**01/2005 - 05/2007**

Grupa kierowana przez: Prof. H.J. Yeo, Ph.D.

Biology and Biochemistry Department

University of Houston, Houston, Teksas, Stany Zjednoczone

* *Stypendium naukowo-badawcze od Robert A. Welch Foundation***Asystent naukowy (Research Assistant[§])****01/2004 - 12/2004**

Polyorganix Inc.,

Firma chemiczno – biotechnologiczna

Houston, Teksas, Stany Zjednoczone

§ *Pozycja w ramach program Cooperative Education Program (COOP) na University of Houston, promującego staże studenckie w firmach biotechnologicznych.*

4. Wskazanie osiągnięcia¹ wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Strukturalne podstawy replikacji i naprawy ludzkiego mitochondrialnego DNA

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

i) Szymanski, M.R., Yu, A., Gmyrek, A.M., White, M.A., Molineux, I.J., Lee, J.C., Yin W.Y. (2017). A novel domain in human EXOG converts apoptotic endonuclease to DNA- repair exonuclease. ***Nature Communications***. 8:14959.

Artykuł rekomendowany przez F1000.

IF₂₀₁₇: 12.4; MNiSW₂₀₁₆: 45; Cytowania (WoS): 2; Cytowania (Google Scholar): 3

ii) Li, M., Mislak, A.C., Foli, Y., Agbosu, E., Bose, V., Bhandari, S., **Szymanski, M.R.**, Shumate, C.K., Yin, W., Anderson, K.S., Paintsil, E. (2016). DNA Polymerase-γ R953C Mutant Linked to ART-Associated Mitochondrial Toxicity. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***. 60(9):5608-11.

IF₂₀₁₆: 4.3; MNiSW₂₀₁₆: 40; Cytowania (WoS): 2; Cytowania (Google Scholar): 2

iii) Sohl, C.D*., **Szymanski, M.R*.**, Mislak, A.C., Shumate, K.C., Amiralaei, S., Schinazi, F.R., Anderson K.S., Yin W.Y. (2015). Probing the Structural and Molecular Basis of Nucleotide Selectivity by Human Mitochondrial DNA Polymerase γ. ***Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America***. 112(28):8596-601.

*** równy wkład**

IF₂₀₁₅: 9.4; MNiSW₂₀₁₅: 45; Cytowania (WoS): 9; Cytowania (Google Scholar): 10

iv) Szymanski, M.R., Kuznetsov, V.B., Shumate, C., Meng, Q., Lee, Y-S., Patel, G., Patel, S.S., Yin W.Y. (2015). Structural basis for processivity and antiviral drug toxicity in human mitochondrial DNA replicase. ***EMBO J***. 34(14):1959-70.

IF₂₀₁₅: 9.6; MNiSW₂₀₁₅: 45; Cytowania (WoS): 14; Cytowania (Google Scholar): 20

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Mitochondria są kluczowe dla fizjologii organizmów eukariotycznych. Podstawowa funkcja mitochondriów to produkcja energii w postaci ATP. Mitochondria uczestniczą także w wielu podstawowych funkcjach komórkowych, takich jak homeostaza wapnia i żelaza, biosynteza hemu, pirymidyn i steroidów, β -oksydacja kwasów tłuszczowych oraz apoptoza (Orrenius, Gogvadze and Zhivotovsky 2007, Ott et al. 2007). Wszystkie te aktywności skorelowane są z integralnością mitochondrialnego DNA (mtDNA) w związku z tym utrzymanie integralności genomu mitochondrialnego jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek. Istnieje wiele białek zaangażowanych w replikację i naprawę mtDNA, ale w komórkach ludzkich tylko dwa: replikacyjna polimeraza DNA gamma (Pol γ) i wewnętrzzbłonowa 5'-egzo / endonukleaza (EXOG), występują wyłącznie w mitochondriach (Akhmedov and Marin-Garcia 2015, Alexeyev et al. 2013, Kazak, Reyes and Holt 2012). Podczas gdy Pol γ bierze udział zarówno w replikacji, jak i w naprawie mtDNA, EXOG ma kluczowe znaczenie dla naprawy ludzkiego mitochondrialnego genomu. Podwójna rola Pol γ w replikacji i naprawie mtDNA jest niezbędna, a inaktywacja genu POLG, kodującego Pol γ jest letalna w okresie embrionalnym, co podkreśla jej znaczenie w utrzymaniu żywotności mitochondriów, a co za tym idzie, komórek (Hance, Ekstrand and Trifunovic 2005). Do tej pory zidentyfikowano ponad 300 punktowych mutacji w Pol γ które są związane z chorobami mitochondrialnymi. Mutacje w Pol γ są również najczęstszą przyczyną dziedzicznych zaburzeń mitochondrialnych (Copeland 2012, Copeland and Longley 2014, Stumpf, Saneto and Copeland 2013). Funkcja wewnętrzzbłonnej 5'-egzo / endonukleazy, EXOG, okazuje się podobnie kluczowa do prawidłowego funkcjonowania komórek, ponieważ inaktywacja (ang. *knock-out*; *KO*) tego genu u myszy jest również letalna w okresie embrionalnym (Szczeny, B. i Szymanski, M.R., dane nie opublikowane). Badania wykazały, że obniżenie poziomu ekspresji (ang. *depletion*) EXOG powoduje akumulację nienaprawionych produktów pośrednich (ang. *unrepaired intermediates*) w mtDNA, powodujących dysfunkcję mitochondriów. Co więcej, badania wykazały, że w przeciwieństwie do nukleaz FEN1 i DNA2, obecność EXOG w mitochondriach ma kluczowe znaczenie dla żywotności komórek (Tann et al. 2011). Te odkrycia rozszerzyły naszą wiedzę na temat udziału Pol γ i EXOG w metabolizmie mtDNA, jednak mechanizm działania tych białek w procesie replikacji i naprawy mtDNA jest wciąż niejasny.

Głównym celem prac przedstawionych jako osiągnięcie w moim przewodzie habilitacyjnym jest charakterystyka funkcjonalna i strukturalna białek Pol γ i EXOG, odpowiedzialnych za replikację oraz naprawę mitochondrialnego DNA u ludzi. Przeprowadzone badania ukierunkowane były na poznanie zasad działania tych enzymów w celu zrozumienia molekularnego mechanizmu naprawy i replikacji ludzkiego mtDNA jak również przyczyn toksyczności leków antywirusowych i mutacji w ludzkim mtDNA, związanych z szeroko pojętymi chorobami mitochondrialnymi oraz normalnym procesem starzenia. Prezentowane prace opierają się na wykorzystaniu technik biochemii, biofizyki oraz biologii strukturalnej.

Structural basis for processivity and antiviral drug toxicity in human mitochondrial DNA replicase. Szymanski, M.R., Kuznetsov, V.B., Shumate, C., Meng, Q., Lee, Y-S., Patel, G., Patel, S.S., Yin W.Y. (2015). *EMBO J.* 34(14):1959-70.

W przeciwieństwie do znajdujących się w jądrze komórkowym polimeraz o wyspecjalizowanych funkcjach (replikacja albo naprawa DNA), w mitochondriach Pol γ jest odpowiedzialna zarówno za replikację, jak i naprawę mtDNA. Pol γ należy do rodziny A polimeraz DNA, a ludzki holoenzym Pol γ

składa się z podjednostki katalitycznej Pol γ A i dimerycznej podjednostki pomocniczej Pol γ B. Pol γ A posiada wszystkie miejsca aktywne holoenzymu: polimerazę (*pol*) do syntezy DNA, 3'-5' egzonukleazę (*exo*) do korekty oraz liazę 5'dRP (5' dezoksyrybofosforanu) do wycinania uszkodzonego nukleotydu (Johnson et al. 2000, Lim, Longley and Copeland 1999). Pol γ B nie posiada aktywności enzymatycznej, ale reguluje wszystkie aktywności Pol γ A w holoenzymie (Gellon et al. 2008, Johnson et al. 2000, Longley et al. 1998a) zwiększając jego procesywność i powinowactwo do DNA, a także przyspieszając szybkość reakcji syntezy (Johnson et al. 2000, Lee et al. 2010). Pol γ B zwiększa również aktywność liazy 5'dRP i redukuje aktywność egzonukleazy (Pinz and Bogenhagen 2006). Miejsca aktywne odpowiedzialne za *pol* i *exo* są od siebie oddalone o 35 Å, natomiast miejsce aktywne liazy 5'dRP nie zostało dotąd strukturalnie opisane, a jej aktywność w Pol γ , wykazywana w eksperymentach biochemicznych, jest śladowa. Nasuwa się więc pytanie w jaki sposób te wszystkie aktywności holoenzymu Pol γ są regulowane przez Pol γ B?

Częstotliwość wstawiania błędnych nukleotydów podczas replikacji DNA katalizowanej przez Pol γ wynosi 10^{-5} , co jest porównywalne z innymi polimerazami DNA o wysokiej dokładności (Lee and Johnson 2006, Longley et al. 2001). Pol γ wykazuje jednak niższą zdolność rozróżniania i wycinania błędów przy użyciu domeny egzonukleazowej niż jej jądrowe odpowiedniki. Ma to szczególne znaczenie przy usuwaniu błędów powstających podczas leczenia antyretrowirusowego przy użyciu nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (ang. *Nucleoside analog Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTI*). Dotyczy to w szczególności dideoksynukleotydów, które hamują poprawne działanie polimerazy Pol γ (Johnson and Johnson 2001, Johnson et al. 2001, Lee, Hanes and Johnson 2003). To prowadzi do występowania od umiarkowanych do zagrażających życiu efektów ubocznych (Koczor and Lewis 2010, McKenzie et al. 1995). Jakie są strukturalne podstawy braku różnicowania NRTI przez Pol γ ?

Mutacje w katalitycznej podjednostce Pol γ A prowadzą do powstania szerokiego spektrum zespołów genetycznych, takich jak postępująca zewnętrzna oftalmoplegia, miopatia, padaczka, hipotonia noworodkowa, encefalopatia i zespół Alpersa (Chan and Copeland 2009, Graziewicz et al. 2004, Zeviani and Taroni 1994). W badaniach na zwierzętach homozygotyczne myszy z uszkodzoną domeną egzonukleazy w Pol γ A wykazują zwiększoną akumulację mutacji punktowych i delecyjnych w mtDNA, jak również charakteryzują się zmniejszoną długością życia i przedwczesnym starzeniem (Trifunovic et al. 2004). Poznanie struktury apoenzymu Pol γ okazało się niewystarczające do wyjaśnienia dlaczego mutacje powodują powstanie fenotypu chorobowego i w jaki sposób mają one wpływ na funkcje holoenzymu w procesie replikacji lub naprawy mtDNA (Lee, Kennedy and Yin 2009). Założyliśmy, że DNA i nukleotydy wywołują zmiany konformacyjne, które zmieniają znacząco strukturę Pol γ . Dlatego aby lepiej poznać molekularny mechanizm procesu replikacji i naprawy mtDNA oraz zrationalizować fenotypy mutantów Pol γ związanych z chorobami mitochondrialnymi, postawiliśmy sobie za zadanie rozwiązanie struktury holoenzymu „uchwyconego” w procesie replikacji mtDNA.

W celu krystalizacji kompleksu replikującego mtDNA zoptymalizowaliśmy nadprodukcję katalitycznej podjednostki Pol γ A w komórkach owadzych z zastosowaniem bakulowirusowego systemu ekspresji, jednostkę pomocniczą polimerazy, Pol γ B, nadprodukowaliśmy natomiast w *Escherichia coli*. Oba białka oczyszczano równolegle poprzez następujące po sobie chromatografie powinowactwa zakończone sączeniem molekularnym. Oczyszczone w ten sposób Pol γ A i Pol γ B połączyliśmy i holoenzym Pol γ i wyizolowaliśmy przez ponowne sączenie molekularne. Następnie kompleks został zagęszczony i bezpośrednio użyty do krystalizacji. Biorąc pod uwagę opublikowane doniesienia, a także przypuszczalną wielkość holoenzymu przetestowaliśmy różne długości substratów DNA (starter/matryca, ang. *primer/template*) o długości pomiędzy 34 a 20 nt. Ostatecznie substrat o długości 24/28 nt (starter/matryca) okazał się być najlepszy do otrzymania kryształów. Dodatkowo, by uniknąć

stymulacji reakcji replikacji, istotne było użycie CaCl_2 zamiast MgCl_2 . W celu zachowania dupleksu DNA wykorzystaliśmy mutantą Pol γ A, który nie wykazuje aktywności egzonukleazy. Opublikowaliśmy dwie struktury: holoenzymu w kompleksie z DNA, CaCl_2 dCTP oraz holoenzymu w kompleksie z DNA, CaCl_2 i lekiem przeciwwirusowym pierwszej generacji Zalcytabiną. Struktur nie można było rozwiązać za pomocą metod podstawienia molekularnego (ang. *Molecular Replacement, MR*) używając struktury apoenzymu jako modelu. Metoda wysycenia kryształów w roztworach zawierających jony metali ciężkich również okazała się bezproduktywna. Dopiero znakowanie selenometioniną zarówno podjednostki Pol γ A, jak i Pol γ B pozwoliło uzyskać mapy gęstości elektronowej wysokiej jakości pozwalających na budowę modeli przestrzennych regionów, które uległy strukturalnym zmianom indukowanym przez wiązanie nukleotydu, Zalcytabinę i DNA. Rozwiązane przez nas struktury są pierwszymi, które pokazują wielopodjednostkową replikazę DNA uchwyconą podczas procesu syntezy DNA. Ilustrują one, w jaki sposób dwie podjednostki ludzkiej mitochondrialnej polimerazy γ koordynują funkcje w holoenzymie, aby osiągnąć wysoką procesywność i regulację aktywności polimerazy *vis-à-vis* aktywności egzonukleazy. Rozwiązane przez nas struktury sugerują również mechanizm komunikacji pomiędzy domeną polimerazową a domeną egzonukleazową w holoenzymie. Analiza strukturalna sugeruje, że silnie konserwowany w polimerazach mitochondrialnych region, składający się z aminokwasów 835-858 tworzący strukturalny motyw β -spinki, może fizycznie i funkcjonalnie służyć jako punkt kontrolny dla prawidłowego działania enzymu. Mutacje reszt aminokwasowych R852 i R853, znajdujących się w tym regionie drastycznie zmniejszają aktywność polimerazy i występują u pacjentów z chorobami mitochondrialnymi (Davidzon et al. 2006, González-Vioque et al. 2006, Kasiviswanathan et al. 2009, Vasta et al. 2012). Otrzymane przez nas struktury zapewniają mechanistyczny wgląd w przyczyny chorób związanych z mutacjami w Pol γ . Struktura replikującego kompleksu Pol γ pozwala nam również mapować mutacje występujące u pacjentów i korelować je ze zmianami funkcji enzymu. Ma to znaczenie diagnostyczne, ponieważ może odpowiedzieć na pytanie czy mutacje o konkretnym fenotypie, na przykład takie których efekty manifestują się w młodym wieku, zlokalizowane są w konkretnych regionach struktury holoenzymu. W związku z czym, na podstawie otrzymanych struktur można przewidywać potencjał i fenotyp chorobowy nowych mutacji w Pol γ . Obecnie we współpracy z klinicystami dokonujemy tego rodzaju analiz. Dodatkowo, opisywane przez nas struktury pokazują, że Pol γ wiąże inhibitor Zalcytabinę i natywny substrat w prawie identyczny sposób, tłumacząc na poziomie molekularnym podatność tej polimerazy na hamowanie przez leki antywirusowe (NRTIs).

Probing the Structural and Molecular Basis of Nucleotide Selectivity by Human Mitochondrial DNA Polymerase γ . Sohl, C.D*., Szymanski, M.R*., Mislak, A.C., Shumate, K.C., Amiralaie, S., Schinazi, F.R., Anderson K.S., Yin W.Y. (2015). *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(28):8596-601.

* równy wkład

Wprowadzona w roku 1996 skojarzona terapia przeciwretrowirusowa, HAART (ang. *Highly Active Antiretroviral Therapy*), skutecznie hamuje replikację HIV-1 (ang. *Human Immunodeficiency Virus, type 1*) i poprawia przeżywalność oraz jakość życia pacjentów zakażonych wirusem HIV. HAART polega na równoczesnym stosowaniu trzech leków antyretrowirusowych, najczęściej dwóch nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NRTI) i jednego inhibitora proteazy. Takie połączenie wykazuje bardzo wysoką skuteczność, stanowiąc przełom w leczeniu osób zakażonych HIV. Aby być skutecznym, leczenie antyretrowirusowe musi być kontynuowane przez całe życie, co skutkuje kumulacją efektów ubocznych i powikłań związanych z toksycznością leków antyretrowirusowych ograniczając powodzenie leczenia (Vidal et al. 2011). Przykłady powikłań to potencjalnie śmiertelna

kwasicą mleczanową, neuropatią, zespół lipodystrofii, kardiomiopatia, pancytopenia (Brinkman et al. 1998, Moyle 2000, Moyle et al. 2002). Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI) to jeden z komponentów HAART, który zastosowano najwcześniej w terapii osób zakażonych HIV. NRTI to analogi naturalnych nukleozydów, ale brakuje im grupy 3'OH, która jest konieczna do wytworzenia wiązań fosfodiesterowych pomiędzy nukleotydamy w syntezowanym łańcuchu DNA. Dzięki temu NRTI hamują działanie odwrotnej transkryptazy HIV (HIV-RT, ang. *Reverse transcriptase*), która przepisuje materiał genetyczny wirusa (RNA) na DNA, by po integracji z genomem komórki ludzkiej umożliwić produkcję kolejnych cząsteczek wirusa i jego namnażanie. Jednak, NRTI hamują nie tylko wirusową odwrotną transkryptazę, HIV-RT, ale mogą także hamować niektóre polimerazy DNA w komórkach ludzkich (Copeland, Chen i Wang 1992). Przykładowo, NRTI hamują działanie polimerazy DNA α i β , ale najbardziej wrażliwa na nie jest opisana wyżej mitochondrialna Pol γ (Kohler and Lewis 2007, Sohl et al. 2015). Hamowanie Pol γ odpowiedzialnej za replikację mtDNA prowadzi do obniżenia poziomu mtDNA, powoduje jego uszkodzenia oraz stres oksydacyjny, przyczyniając się do omówionych wcześniej efektów ubocznych związanych ze stosowaniem NRTI (Chan and Copeland 2009, Chan et al. 2007, Kline et al. 2009). Co interesujące, niepożądane działanie NRTI, wynikające z blokowania aktywności ludzkiej mitochondrialnej Pol γ , nie jest dokładnie skorelowane ze skutecznością tych leków przeciwko HIV. Na przykład, NRTI emtrycytabina [(-) - 2,3'-dideoksy-5-fluoro-3'-tiorytydyna, (-)-FTC] i jej enancjomer (+)-FTC są tak samo wydajne w hamowaniu działania HIV-RT. Jednocześnie, (+)-FTC jest znacznie bardziej toksyczna niż (-)-FTC. Dlatego bazując na naszych odkryciach omówionych w poprzednim rozdziale, zadaliśmy pytanie czy łącząc metody strukturalne z analizą biochemiczną i kinetyczną możemy zrozumieć mechanistyczne podstawy działania i różnice pomiędzy Pol γ i HIV-RT. Założyliśmy, że identyfikacja różnic strukturalnych pomiędzy zamierzonym celem terapii, czyli HIV-RT a niepożądanym celem czyli Pol γ może dostarczyć istotnych informacji przydatnych do projektowania bardziej specyficznych leków o niższej toksyczności.

W niniejszej pracy przedstawiliśmy kluczowe różnice w oddziaływaniu NRTI z Pol γ i HIV-RT. Dzięki użyciu metod strukturalnych, badań kinetycznych oraz ukierunkowanej mutagenety, pokazaliśmy, że Pol γ i HIV-RT wykorzystują różne mechanizmy wiązania substratu i inhibitora. Reszta aminokwasowa I948 w Pol γ A, który nie odgrywa znaczącej roli w wiązaniu i inkorporacji substratu, ma istotne znaczenie dla selektywności wiązania (-)-FTC, podczas gdy homologiczna reszta R72 w HIV-RT jest ważna zarówno dla wiązania inhibitora, jak i substratu. Te wnioski mają fundamentalne znaczenie w projektowaniu leków: pokazaliśmy, że modyfikacja 5-F w (-)-FTC oddziałuje z resztą aminokwasową niezbędną do prawidłowej aktywności HIV-RT, jednocześnie poprzez zwadę steryczną jest „odpychana” przez homologiczną resztę aminokwasową w Pol γ . Nasza praca, po raz pierwszy, opisuje mechanizm zróżnicowanej selektywności (-)-FTC i zapewnia strukturalne podstawy do opracowania nowych, pilnie potrzebnych NRTI o podwyższonej selektywności i niższej toksyczności. Warto również podkreślić, że ten kierunek badawczy jest nadal realizowany przez mój zespół we współpracy z laboratorium Prof. Whitney Yin, z UTMB, Stany Zjednoczone.

DNA Polymerase- γ R953C Mutant Linked to ART-Associated Mitochondrial Toxicity. Li, M., Mislak, A.C., Foli, Y., Agbosu, E., Bose, V., Bhandari, S., **Szymanski, M.R.**, Shumate, C.K., Yin, W., Anderson, K.S., Painsil, E. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016 Aug 22;60(9):5608-11.

Omówione powyżej prace opisują zarówno podatność Pol γ na działanie NRTI oraz skutki uboczne związane ze stosowaniem HAART. Co ciekawe, nie wszyscy pacjenci poddani temu samemu schematowi leczenia, odczuwają skutki uboczne w równym stopniu, co sugeruje, że toksyczność może być spowodowana genetycznie uwarunkowanymi predyspozycjami lub innymi warunkami

środowiskowymi (Naviaux et al. 1999). Mutacyjne warianty genu POLG mogą wpływać na funkcję Pol γ , a tym samym na farmakokinetykę niektórych leków w związku z czym zasugerowano, że zmiany w toksyczności związanej z HAART mogą wynikać częściowo z polimorfizmów obserwowanych w genie POLG (Carr and Cooper 2000, Feng et al. 2001, Johnson et al. 2001). Innymi słowy, genetyczne uwarunkowania pacjenta wpływają na korzystne lub niekorzystne efekty określonej terapii (Dalal, Shankarkumar and Ghosh 2015, Vidal et al. 2011). Aby zrozumieć rolę wariantów Pol γ w toksyczności związanej z HAART, wykonaliśmy retrospektywną analizę danych i próbek pobranych podczas badań HAART-zależnej toksyczności mitochondrialnej. W wyniku analizy zidentyfikowaliśmy pacjenta, u którego objawy toksyczności mitochondrialnej pojawiły się po 10 latach stosowania kuracji zawierającej inhibitor Lamiwudynę (3TC). Odkryliśmy u niego heterozygotyczną mutację C2857T \rightarrow R953C w eksonie 18, w wyniku której reszta aminokwasowa R953 w Pol γ zmieniona jest na cysteinę. Biorąc pod uwagę, że R953 znajduje się w centrum aktywnym Pol γ i jest wysoce konserwowany, mutacje w tym obszarze mogą prowadzić do utraty mtDNA i są związane z chorobami mitochondrialnymi. W niniejszej publikacji wykazaliśmy, że pacjent z mutacją R953C miał znacznie niższą liczbę kopii mtDNA w porównaniu z grupą kontrolną. Co ciekawe, pokazaliśmy, że powinowactwo mutantu R953C do DNA nie różni się znacząco od powinowactwa dzikiej formy białka i jest zgodne z niskim nanomolowym powinowactwem opisanym uprzednio dla Pol γ (Lim et al. 2003, Sohl et al. 2013). Aby zrozumieć, w jaki sposób mutacja R953C przyczynia się do toksyczności indukowanej przez HAART, zbadaliśmy inkorporacje naturalnego nukleotydu (dCTP) w porównaniu do inkorporacji aktywnej trójfosforanowej formy inhibitora 3TC. W serii pomiarów kinetycznych pokazaliśmy, że mutant Pol γ R953C ma zmniejszoną zdolność do wiązania dCTP (8-krotnie) i zmniejszoną zdolność odróżnienia leku od substratu (4-krotnie). Aby wyjaśnić zmniejszoną zdolność mutantu Pol γ R953C do rozróżniania między (-)-3TC i dCTP opracowaliśmy model strukturalny oraz rozwiązaliśmy strukturę krystaliczną mutantu R953C Pol γ w kompleksie z DNA i dCTP. Zarówno w modelu, jak i w strukturze krystalicznej reszta R953 znajduje się w O-helisie, która tworzy miejsce wiązania dNTP w czasie syntezy DNA. Ponieważ oddziaływania R953 z resztami E1056 i Y986, mogą stabilizować O-helisę i wpływać na aktywność polimerazy, mutacja R953C w Pol γ może zakłócać sieć oddziaływań, powodując niewielkie przesunięcie O-helisy, zmniejszając tym samym powinowactwo do nukleotydu oraz powodując utratę zdolności odróżnienia leku od substratu. Zależności te mogą wyjaśnić związek między mutacją Pol γ R953C a toksycznością wywołaną przez HAART. Na podstawie naszych wyników oraz wcześniej opublikowanych danych postawiliśmy hipotezę, że mutacje i/lub polimorfizmy Pol γ mogą predysponować pacjentów do indukowanej przez HAART toksyczności mitochondrialnej. Zasugerowaliśmy, że biorąc pod uwagę szybko malejące koszty testowania genotypowego oraz szybki rozwój farmakogenetyki wskazane jest indywidualne podejście do pacjenta umożliwiające maksymalizację efektu terapeutycznego i minimalizację skutków ubocznych wynikających z podawania NRTI.

A novel domain in human EXOG converts apoptotic endonuclease to DNA- repair exonuclease. Szymanski, M.R., Yu, A., Gmyrek, A.M., White, M.A., Molineux, I.J., Lee, J.C., Yin W.Y. *Nature Communications*. 2017 May 3;8:14959.

Artykuł rekomendowany i umieszczony na portal Faculty1000

Dopiero stosunkowo niedawno stało się jasne, że naprawa przez wycinanie zasady (ang. *DNA Base Excision Repair pathway, BER*) jest dominującą ścieżką naprawy DNA w mitochondriach (Driggers, LeDoux and Wilson 1993, Larsen, Rasmussen and Rasmussen 2005, Mandavilli, Santos and Van Houten 2002). Jednak większość naszej wiedzy na temat mitochondrialnej naprawy BER (mtBER) opiera się na obserwacjach pochodzących z BER w jądrze komórkowym. Mimo, że mitochondrialna BER jest znacznie

mniej poznana, są przypuszczenia, że zachodzi w inny sposób niż BER w jądrze (Krokan and Bjørås 2013, Larsen et al. 2005). Główną przyczyną tych przypuszczeń jest fakt, że w mitochondriach nie ma wyspecjalizowanej polimerazy odpowiedzialnej za naprawę mitochondrialnego DNA, a replikaza, Pol γ , pełni dwie funkcje - jest niezbędna dla replikacji i naprawy mtDNA (Longley et al. 1998a, Longley et al. 1998b). Niesie to za sobą wiele konsekwencji, przykładowo, Pol γ ma słabą aktywność liazy dRP i jest mało prawdopodobne, aby poradziła sobie ze zwiększoną liczbą miejsc pozbawionych zasad (ang. *Abasic sites, AP*) bez pomocy innych enzymów (Pinz and Bogenhagen 2000, Stierum, Dianov and Bohr 1999). Dodatkowo, Pol γ jest mało skuteczna przy wypełnianiu brakujących pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide gap filling*) oraz nie posiada aktywności rozplatania nici DNA (ang. *strand displacement*), czyli wszystkich funkcji niezbędnych do przeprowadzenia kanonicznej naprawy BER (He et al. 2013). Pomimo tych ograniczeń ludzkie mitochondria doskonale radzą sobie z naprawą DNA. Jest możliwe między innymi dzięki obecności wewnątrz błonowej 5'-egzo / endonukleazy EXOG (Tann et al. 2011). EXOG występuje wyłącznie w mitochondriach. Jej brak powoduje akumulację uszkodzeń w mitochondrialnym DNA, ale nie w jądrowym DNA, zwiększa stres oksydacyjny oraz prowadzi do dysfunkcji mitochondrów (Tann et al. 2011). Ektopiczna ekspresja genu kodującego EXOG zwiększa odporność proliferujących mioblastów na stres oksydacyjny (Szczesny et al. 2013). Co ważne, EXOG występuje w kompleksie z innymi mitochondrialnymi enzymami naprawczymi szlaku BER: APE1, Pol γ i Ligazą III, zwanym po angielsku „mitochondrial repairosome”. Wykazano też, że oddziaływania pomiędzy białkami w obrębie „kompleksu naprawczego są wzmacniane przez stres oksydacyjny (Szczesny et al. 2014).

Sekwencja aminokwasowa EXOG sugeruje, że należy ona do $\beta\beta\alpha$ -Me rodziny nukleaz, która zawiera grupę niespecyficznych endonukleaz, np. EndoG (Cymerman et al. 2008). Niespecyficzna aktywność EndoG umożliwia funkcjonowanie tego enzymu w procesie apoptozy wymagającym trawienia jednoniciowego DNA (ssDNA), dwuniciowego DNA (dsDNA) oraz RNA, jest jednak niekompatybilna z precyzyjną aktywnością egzonukleazy, wymaganej do modyfikacji 5' końca DNA w procesie naprawy BER. EXOG jest paralogiem EndoG posiadającym zarówno aktywność endonukleazy jak też 5'-egzonukleazy. Niewiele jednak wiadomo na temat regulacji tych aktywności.

Ponadto, pomimo wykazania, że EXOG pełni rolę kluczowej 5'-egzonukleazy w procesie mtBER, jak dotąd mechanizm jej działania jest słabo poznany. Badania utrudniały problemy w uzyskaniu odpowiednich ilości dobrze sfałdowanego i aktywnego enzymu. EXOG jest białkiem błonowym, które lokuje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej dzięki N-końcowej domenie transbłonowej (Cymerman et al. 2008). Dlatego, w celu izolacji EXOG usunęliśmy zarówno aminokwasy odpowiedzialne za jego umiejscowienie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jak też przewidywany region nieuporządkowany na N-końcu sekwencji białka (Δ N58-EXOG). Następnie, w oparciu o wcześniejsze doniesienia opracowaliśmy wydajną metodę oczyszczania EXOG z ciał inkluzyjnych (Kieper et al. 2010), która umożliwiła otrzymanie poprawnie sfałdowanego, aktywnego białka.

Aby uzyskać wgląd w mechanizm działania EXOG w procesie mtBER, rozwiązaliśmy strukturę krystaliczną EXOG w obecności jonów Mg^{2+} z rozdzielczością 1,81 Å. Struktura apoenzymu EXOG pokazuje, że jest to symetryczny homodimer zbudowany z domeny katalitycznej, przypominającej strukturę apoptotycznej endonukleazy EndoG oraz C-końcowej domeny „skrzydłowej” (ang. *wing domain*) zbudowanej z trzech α -helis (ang. *three helix bundle*). Miejsce aktywne znajduje się w pozytywnie naładowanej szczelinie powstałej pomiędzy domenami i zawiera katalityczną resztę H140 oraz jon Mg^{2+} skoordynowany w geometrii oktaedrycznej przez pięć cząsteczek wody i δ -N reszty N171. Aby potwierdzić obecność metalu w miejscu aktywnym, rozwiązaliśmy drugą strukturę EXOG w obecności jonu Mn^{2+} (rozdzielczość pomiaru 2,6 Å). Następnie badając aktywność enzymatyczną EXOG wykazaliśmy, że EXOG wycina dinukleotydy z końca 5' (Cymerman et al. 2008, Tann et al. 2011).

Aktywność ta odróżnia EXOG od typowych egzonukleaz, które hydrolizują wiązanie fosfodiesterowe między pierwszym i drugim nukleotydem (produkując mononukleotydy). Stosując metody kinetyczne wykazaliśmy również, że w dimerze EXOG, w danym momencie aktywne jest tylko jedno miejsce wiązania substratu, a dysocjacja produktu reakcji jest bardzo wolnym procesem. Aby określić, czy oba monomery dimeru EXOG mają zdolność wiązania DNA użyliśmy mutanta z nieaktywną nukleazą (EXOG-H140A). Przy użyciu izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) pokazaliśmy, że dimer EXOG może wiązać dwie cząsteczki DNA z różnym powinowactwem, co sugeruje, że w określonych stężeniach DNA i EXOG tylko jeden monomer EXOG może być związany z DNA. Tłumaczy to aktywność tylko jednego miejsca wiązania obserwowaną w doświadczeniach kinetycznych.

Aby uzyskać strukturalny wgląd we właściwości enzymatyczne EXOG, wariant enzymu z nieaktywną nukleazą (EXOG-H140A) został użyty do kokryształizacji z dwuniciowym DNA o długości 10 par zasad. Strukturę kompleksu EXOG-dsDNA w obecności jonu Mg^{2+} rozwiązaliśmy z rozdzielczością 1,85 Å poprzez metodę podstawienia molekularnego za pomocą struktury apoenzymu EXOG jako modelu. Aby zweryfikować obecność i wiąż jonu metalu w miejscu aktywnym rozwiązaliśmy kolejną strukturę kompleksu EXOG-dsDNA- Mn^{2+} (rozdzielczość pomiaru 2,6 Å). Jon Mg^{2+} , koordynowany przez pięć cząsteczek wody oraz δ -N N171 w strukturze EXOG- Mg^{2+} , w kompleksie EXOG-dsDNA- Mg^{2+} jest nadal w koordynacji oktaedrycznej, ale z trzema cząsteczkami wody, δ -N N171 i dwoma atomami tlenu wiązania fosfodiesterowego pomiędzy drugim i trzecim nukleotydem substratu DNA. Struktura kompleksu EXOG-dsDNA- Mg^{2+} pokazuje, że wiązanie z DNA nie zmienia struktury rdzenia enzymu, jednakże dwie domeny skrzydłowe przyjmują inną konformację, co skutkuje tym, że jedno miejsce aktywne w kompleksie z DNA podlega zmianie konformacji z „zamkniętej” na „otwartą”. W konsekwencji, po związaniu DNA, dwa miejsca aktywne różnią się konformacyjnie - jedno jest „zamknięte” a drugie „otwartą”. Dodatkowo domena skrzydłowa w otwartej jest mniej uporządkowana niż w strukturze apoenzymu. To może mieć krytyczne znaczenie dla oddziaływania enzymu z innymi białkami biorącymi udział w mtBER. Analiza struktury EXOG-dsDNA pokazała, że wiązanie DNA przy udziale domeny skrzydłowej zapewnia precyzyjne pozycjonowanie substratu DNA do nacięcia pomiędzy 2 i 3 nukleotydem. Ten mechanizm umożliwił EXOG cięcie DNA co dwa nukleotydy. Dodatkowo analiza struktury EXOG w kompleksie z DNA pokazała, że aminokwasy znajdujące się w domenie skrzydłowej oddziałują z atomem fosforu na końcu 5' stabilizując oddziaływanie z DNA, co prowadzi do wolnego uwalniania produktu reakcji. Obserwacje te zweryfikowaliśmy poprzez zastosowanie mutantów punktowych oraz mutanta delecyjnego domeny skrzydłowej (EXOG- Δ C68). Wykazaliśmy, że mutacja EXOG- Δ C68 eliminuje reszty zaangażowane w wiązanie 5'-P zarówno substratu, jak i produktu. Ponadto, w zmutowanym białku miejsce aktywne jest całkowicie otwarte, a enzym traci zdolność do kontrolowanej hydrolizy DNA, co dwa nukleotydy, jak i specyficzność wobec substratu BER. Co ciekawe, aktywność endonukleazy w EXOG- Δ C68 wzrasta ośmiokrotnie w porównaniu z natywnym enzymem i jest zbliżona do aktywności niespecyficznej nukleazy EndoG. Opisane w niniejszej publikacji wyniki sugerują, że pojawienie się domeny skrzydłowej w EXOG przekształciło niespecyficzną nukleazę w egzonukleazę specyficzną dla substratu mtBER.

W kanonicznym procesie BER funkcje białek naprawczych mogą być zatrzymane przez tworzenie wiązań kowalencyjnych z utlenionymi resztami rybozy na 5' końcu uszkodzonego kwasu nukleinowego. Ponieważ w EXOG miejsce aktywne jest odległe od 5' końca a do nacięcia substratu DNA dochodzi pomiędzy 2 i 3 nukleotydem, zasugerowaliśmy, że EXOG może przetwarzać uszkodzony koniec 5' niezależnie od struktury chemicznej, omijając potencjalną blokadę szlaku naprawy DNA. Na podstawie naszych wyników zaproponowaliśmy nowy model procesu BER umożliwiający naprawę mitochondrialnego DNA poprzez kontrolowany mechanizm „cięcia i wypełniania” (ang. *cut-and-fill*),

który generuje optymalny substrat dla Pol γ bez potrzeby rozplatania nici DNA (ang. *strand displacement*).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo badawczych:

a) badania przeprowadzone przed doktoratem w czasie studiów na Biology and Biochemistry Department, University of Houston, Teksas, Stany Zjednoczone:

Tematyka badań: Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna białek błonowych.

Głównym celem projektu było oczyszczenie i krystalizacja białka błonowego HMW1B wielkocząsteczkowej adhezyny z bakterii *Haemophilus influenzae*, patogenu układu oddechowego u ludzi. Charakterystyka funkcjonalna oraz określenie struktury HMW1B przy użyciu krystalografii rentgenowskiej miało na celu zrozumienie, w jaki sposób patogen oddziałuje z gospodarzem, co w przyszłości mogłoby prowadzić do opracowania nowych leków. Otrzymane przeze mnie kryształy HMW1B rozpraszają promieniowanie Rentgenowskie do rozdzielczości 2.8 Å (analiza dyfrakcyjna została przeprowadzona w Argonne National Laboratory Chicago, Stany Zjednoczone). Zachęcające wyniki wstępnych badań strukturalnych ukierunkowały dalsze prace nad oczyszczaniem wariantu białka HMW1B znakowanego selenometioniną i dogłębną analizę strukturalną. Wyniki prowadzonych badań pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmu wiązania białek HMW1A i HMW1B do siebie i zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Biological Chemistry*:

Duret, G., **Szymanski, M.**, Choi, K.J., Yeo, H.J., and Delcour, A.H. (2008). The TpsB translocator HMW1B of *Haemophilus influenzae* forms a large conductance channel. *Journal of Biological Chemistry*. 283, 15771-15778.

b) badania przeprowadzone w czasie studiów doktoranckich na Biochemistry and Molecular Biology Department, University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone:

Tematyka badań: Inicjowane przez helikazę tworzenie się kompleksów makromolekularnych zaangażowanych w replikację i naprawę DNA.

Wszystkie organizmy zawierają złożone, wielobiałkowe, kompleksy molekularne które pełnią różne funkcje niezbędne do życia. Większość procesów komórkowych wymaga skomplikowanej czasowej i przestrzennej koordynacji wzajemnego wiązania i dysocjacji wielu białek, kofaktorów i kwasów nukleinowych. Helikazy są integralną częścią wielobiałkowych kompleksów molekularnych i odgrywają kluczową rolę w procesie ich tworzenia. Zrozumienie tych złożonych procesów jest kluczowe dla poznania podstawowych mechanizmów reakcji biologicznych, co następnie może prowadzić do zrozumienia mechanizmów patogenyzy chorób u ludzi. Celem projektu było zrozumienie zainicjowanego przez helikazę tworzenia kompleksów makromolekularnych zaangażowanych w replikację i naprawę DNA. Badaliśmy molekularne podstawy interakcji między białkami biorącymi udział w tworzeniu pre-primosomu, kompleksu pozwalającego na ponowną inicjację zatrzymanego procesu replikacji u bakterii *Escherichia coli*. W czasie realizacji projektu zastosowaliśmy między innymi ilościowe metody termodynamiczne w celu badania oddziaływania helikazy PriA z jedno- i dwuniciowym DNA oraz z DNA z uszkodzeniem typu „gap” (ang. *gapped DNA* substrate). Ponadto zdefiniowaliśmy położenie miejsc wiązania ATP, ADP i DNA w obrębie N-końcowej domeny białka PriA oraz odkryliśmy allosteryczne interakcje pomiędzy tymi miejscami. Wykorzystaliśmy metody

biochemiczne i biofizyczne do określenia stałej wiązania i stechiometrii kompleksu białka PriB z DNA. Ponadto badaliśmy energetykę oddziaływań między helikazą PriA i białkiem PriB. Badania te obejmowały zastosowanie metod pomiaru anizotropii fluorescencji, ultrawiorowania analitycznego, FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), kalorymetrii izotermicznej (ITC), sieciowania UV i biochemicznych testów aktywności helikazy. W czasie studiów doktorskich w tym temacie opublikowałem 10 recenzowanych publikacji i przygotowałem 19 doniesień konferencyjnych opisujących wyniki prowadzonych badań, które pozwoliły lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy tworzenia tych kluczowych dla funkcjonowania komórki kompleksów makromolekularnych:

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., Bujalowski, W. (2013). The *Escherichia Coli* Primosomal DnaT Protein Exists in Solution as a Monomer – Trimer Equilibrium System. *Biochemistry*. 52, 1845-57.

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., Bujalowski, W. (2013). Energetics of the *Escherichia Coli* DnaT Protein Trimerization Reaction. *Biochemistry*. 52, 1858-73.

Szymanski, M.R., Bujalowski, P.J., Jezewska, M.J., Gmyrek, A.M., and Bujalowski, W. (2011). The N-terminal domain of the *Escherichia coli* PriA helicase contains both the DNA- and nucleotide-binding sites. Energetics of domain-DNA interactions and allosteric effect of the nucleotide cofactors. *Biochemistry*. 50, 9167-9183.

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2011). Binding of Two PriA-PriB Complexes to the Primosome Assembly Site Initiates Primosome Formation. *Journal of Molecular Biology*. 411, 123-142.

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2010). The *Escherichia coli* PriA helicase-double-stranded DNA complex: location of the strong DNA-binding subsite on the helicase domain of the protein and the affinity control by the two nucleotide-binding sites of the enzyme. *Journal of Molecular Biology*. 402, 344-362.

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2010). Interactions of the *Escherichia coli* primosomal PriB protein with the single-stranded DNA. Stoichiometries, intrinsic affinities, cooperativities, and base specificities. *Journal of Molecular Biology*. 398, 8-25.

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2010). The *Escherichia coli* PriA helicase specifically recognizes gapped DNA substrates: effect of the two nucleotide-binding sites of the enzyme on the recognition process. *Journal of Biological Chemistry*. 285, 9683-9696.

Roychowdhury, A., **Szymanski, M.R.**, Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2009). Interactions of the *Escherichia coli* DnaB-DnaC protein complex with nucleotide cofactors. 1. Allosteric conformational transitions of the complex. *Biochemistry*. 48, 6712-6729.

Roychowdhury, A., **Szymanski, M.R.**, Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2009). Mechanism of NTP hydrolysis by the *Escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein. 2. Nucleotide and nucleic acid specificities. *Biochemistry*. 48, 6730-6746.

Roychowdhury, A., **Szymanski, M.R.**, Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2009). *Escherichia coli* DnaB helicase-DnaC protein complex: allosteric effects of the nucleotides on the nucleic acid binding and the kinetic mechanism of NTP hydrolysis. 3. **Biochemistry**. 48, 6747-6763.

Dodatkowo, oprócz opisanego powyżej głównego projektu w czasie studiów doktoranckich zainicjowałem i realizowałem kilka projektów we współpracy z innymi grupami badawczymi z całego świata. Projekty te zostały opisuję poniżej:

Tematyka badań: Molekularne podstawy oddziaływań białek gospodarza z białkami wirusa. Podczas infekcji wirusowej antywirusowe białka gospodarza i białka wirusa infekującego oddziałują ze sobą, co umożliwia replikację wirusa prowadząc do patogenezы, a wielu przypadkach również do onkogenezy. Jednak w przypadku większości wirusów niewiele wiadomo na temat interakcji między białkami wirusowymi i komórkowymi. Zrozumienie molekularnych mechanizmów oddziaływań białek wirus-gospodarz pozwoli na zbadanie strategii wykorzystywanych przez wirusy do manipulowania komórkami gospodarza i może pomóc w odkryciu nowych celów do interwencji terapeutycznej.

i) Wirus Dengue należy do rodziny Flaviviridae i jest czynnikiem etiologicznym gorączki Dengue, choroby atakującej 100 milionów ludzi każdego roku. Mały genom RNA (10,7 kbp) tego wirusa o dodatniej polarności nici koduje tylko 10 białek: podjednostki kapsydu i otoczki oraz białka przedbłonowe, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5. Białka te ulegają proteolitycznemu cięciu przez wirusowe i komórkowe proteazy, dzięki czemu stają się aktywnymi jednostkami. Białko NS5 jest wirusową polimerazą zależną od RNA, która może katalizować syntezę RNA *de novo* (synteza ta nie wymaga startera, chociaż wymaga obecności kofaktora GTP). Interakcje z jednoniciowym RNA wystarczają do zainicjowania i dalszej syntezy kwasu nukleinowego oraz wpływają na funkcjonowanie enzymu. Nasza praca udokumentowała pierwszą ilościową analizę oddziaływań polimerazy Dengue z jednoniciowym i dwuniciowym RNA i DNA. Badania te stanowią podstawę do zrozumienia molekularnego mechanizmu działania NS5, co w przyszłości może przyczynić się do opracowania nowych celów interwencji terapeutycznej przeciwko temu wirusowi.

Szymanski, M.R., Jezewska, M.J., Bujalowski, P.J., Bussetta, C., Ye, M., Choi K.H., Bujalowski, W. (2011). Full-Length Dengue Virus RNA Dependent RNA Polymerase – RNA/ DNA Complexes. Stoichiometries and Energetics of Intrinsic Affinities, Cooperativities, Base and Conformational Specificities. **Journal of Biological Chemistry**. 286, 33095-33108.

ii) Wirus klasycznego pomoru świń (CSFV) powoduje poważne straty w hodowli trzody chlewnej, ponieważ jest wysoce chorobotwórczy i może powodować masową śmierć zwierząt. Wykazaliśmy, że pestwirusy, takie jak wirus klasycznego pomoru świń (CSFV) wykorzystują białko wirusowe Npro do blokowania odpowiedzi antywirusowej komórek gospodarza. Ustaliliśmy, że białko Npro zawiera na swoim C-końcu nie opisany wcześniej motyw sekwencyjny TRASH Cys-X21-Cys-X3-Cys (gdzie X jest dowolnym aminokwasem) wiążący jon metali. Przy użyciu spektrometrii mas oraz atomowej spektroskopii absorpcyjnej wykazaliśmy, że białko Npro koordynuje pojedynczy jon cynku. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń z zastosowaniem miejscowo specyficznej mutagenезы oraz analizы biochemicznej pokazały, że reszty cysteiny w motywie TRASH są wymagane do wiązania cynku i wpływają na stabilność białka. Indywidualne substytucje cystein w motywie TRASH znoszą oddziaływanie IRF3 (ang. *Interferon Regulatory Factor 3*) z białkiem Npro i powodują zahamowanie degradacji IRF3 w komórkach zakażonych CSFV. W ten sposób pokazaliśmy bezpośrednią funkcjonalną

zależność pomiędzy zdolnością białka Npro do koordynowania jonu cynku i jego zdolnością do zakłócania szlaku prowadzącego do odpowiedzi przeciwwirusowych, takich jak degradacja wirusowego RNA, hamowanie transkrypcji oraz translacji komórkowej a ostatecznie śmierć komórki. Praca opisująca wyniki naszych badań jest efektem współpracy międzynarodowej i została opublikowana w czasopiśmie *Journal of Molecular Biology*:

Szymanski, M.R., Fiebach, A.R., Tratschin, J.D., Gut, M., Ramanujam, V.M., Gottipati, K., Patel, P., Ye, M., Ruggli, N., and Choi, K.H. (2009). Zinc binding in pestivirus N(pro) is required for interferon regulatory factor 3 interaction and degradation. *Journal of Molecular Biology*. 391, 438-449.

iii) Wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV) jest czynnikiem etiologicznym odpowiedzialnym za ostrą, wysoce śmiertelną gorączkę krwotoczną u świń domowych. Mechanizm zaangażowany w infekcję komórki gospodarza nie został dokładnie poznany. Wirus afrykańskiego pomoru świń koduje wyspecjalizowane białko naprawcze, polimerazę X, które umożliwia naprawę uszkodzonego wirusowi DNA. Wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania polimerazy X ASFV z kwasem nukleinowym jest szczególnie ważne, ponieważ polimerazy naprawcze DNA muszą rozpoznawać specyficzną strukturę uszkodzonego kwasu nukleinowego. Kinetyczny i termodynamiczny mechanizm oddziaływań między polimerazą X a DNA został przez nas opisany w dwóch równoległych publikacjach w czasopiśmie *Biophysical Chemistry*:

Jezewska, M.J., **Szymanski, M.R.,** and Bujalowski, W. (2011). Interactions of the DNA polymerase X from African Swine Fever Virus with the ssDNA. Properties of the total DNA-binding site and the strong DNA-binding subsite. *Biophysical Chemistry*. 158, 26-37.

Jezewska, M.J., **Szymanski, M.R.,** and Bujalowski, W. (2011). Kinetic mechanism of the ssDNA recognition by the polymerase X from African Swine Fever Virus. Dynamics and energetics of intermediate formations. *Biophysical Chemistry*. 158, 9-20.

Tematyka badań: Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna białek zaangażowanych w replikację i naprawę DNA.

i) Działanie ludzkich białek replikacyjnych i ich udział w powstaniu nowotworów. Wierne propagowanie materiału genetycznego jest niezbędne do życia, więc replikacja DNA musi być ściśle regulowana, aby zapewnić najwyższą precyzję i dokładność tego procesu. Jednak proces ten jest stale zagrożony ze względu wpływ czynników środowiskowych i metabolizmu komórkowego, które indukują uszkodzenia DNA. U człowieka, polimeraza DNA β (pol β) odpowiada za integralność genomu dokonując napraw przez wycinanie zasady (ang. *Base Excision Repair, BER*). Polimeraza ta jest również niezbędna do replikacji DNA, rekombinacji i odporności na leki. Zaburzenie działania tego enzymu jest skorelowane z wieloma rodzajami nowotworów, w tym z rakiem okrężnicy i odbytu, rakiem żołądka i rakiem gruczołu krokowego. Dlatego niezbędne jest mechanistyczne zrozumienie głównej funkcji tego enzymu: oddziaływanie z DNA. W artykule opublikowanym w *Biophysical Chemistry* w 2011 roku, zbadaliśmy kinetyczny i termodynamiczny mechanizm interakcji pol β z DNA.

Jezewska, M.J., **Szymanski, M.R.,** and Bujalowski, W. (2011). The primary DNA binding subsite of the rat pol beta. Energetics of interactions of the 8-kDa domain of the enzyme with the ssDNA. *Biophysical Chemistry*. 156, 115-127.

ii) **Kinetyczny mechanizm działania bakteryjnych białek replikacyjnych.** RepA jest heksameryczną helikazą DNA niezbędną do replikacji niekonjugującego plazmidu o szerokim spektrum gospodarzy (ang. *broad-host range nonconjugative plasmid*) RSF1010, który nadaje bakteriom oporność na sulfonamidy i streptomycynę. Wykorzystując metodę zatrzymanego przepływu (ang. *stopped flow*), a także metody ultrawiwrowania analitycznego, badaliśmy kinetyczny mechanizm rozpoznawania jednoniciowego DNA przez kanał wewnętrzny heksameru RepA. Wykazaliśmy, że oddziaływanie RepA z jednoniciowym DNA zachodzi zgodnie z czteroetapowym mechanizmem. Na etapie rozpoznawania jednoniciowy DNA wiąże się w miejscu znajdującym się poza kanałem wewnętrznym helikazy RepA. Z kolei wiązanie DNA wewnątrz kanału jest skorelowane z dużymi zmianami konformacyjnymi struktury enzymu, co prowadzi do częściowego zamknięcia struktury nad wiązaniem DNA. Badania te pokazały, że wprowadzenie DNA do kanału wewnętrznego heksameru jest procesem wieloetapowym, w którym różne etapy reakcji zachodzą w bardzo różnych zakresach czasowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w następujących pracach:

Andreeva, I.E., **Szymanski, M.R.**, Jezewska, M.J., Galletto, R., and Bujalowski, W. (2009). Dynamics of the ssDNA recognition by the RepA hexameric helicase of plasmid RSF1010: analyses using fluorescence stopped-flow intensity and anisotropy methods. *Journal of Molecular Biology*. 388, 751-775.

Andreeva, I.E., Roychowdhury, A., **Szymanski, M.R.**, Jezewska, M.J., and Bujalowski, W. (2009). Mechanisms of interactions of the nucleotide cofactor with the RepA protein of plasmid RSF1010. Binding dynamics studied using the fluorescence stopped-flow method. *Biochemistry*. 48, 10620-10636.

c) aktualna praca i plany na przyszłość

W październiku 2017 r., po otrzymaniu dwóch grantów umożliwiających otwarcie samodzielnej grupy badawczej: POLONEZ Fellowship (NCN) oraz First TEAM (FNP), rozpocząłem prace na stanowisku Adiunkta / Kierownika Pracowni Biologii Strukturalnej na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Dodatkowo w grudniu 2018 r., jako jeden z trzech polskich naukowców, uzyskałem również prestiżowy Installation Grant przyznany mi przez Europejską Organizację Biologii Molekularnej (EMBO) na wsparcie działań mojego laboratorium. Obecnie kieruje czteroosobowym zespołem składającym się z dwóch asystentów oraz dwóch doktorantów. Badania mojej grupy skupiają się na poznaniu mechanizmów tworzenia oraz struktury i funkcji wielocząsteczkowych kompleksów makromolekularnych zaangażowanych w kluczowe procesy komórkowe. Głównymi metodami badawczymi są krystalografia rentgenowska i mikroskopia elektronowa oraz analizy biochemiczne i biofizyczne funkcjonalności i oddziaływań białek, kwasów nukleinowych i ich kompleksów. W projekcie First Team (FNP) pt. „Targeting mitochondrial DNA repair for novel anti-cancer therapies” (2018-2021) skupiamy się na badaniach struktury i funkcji mitochondrialnej nukleazy błonowej, EXOG. Badania prowadzone w tym projekcie mogą przyczynić się do opracowania inhibitorów specyficznie hamujących aktywność tego enzymu. Inhibicja EXOG w komórkach nowotworowych może zwiększyć liczbę mutacji w mitochondrialnym DNA, podnosząc ich wrażliwość na tradycyjną chemioterapie. Projekt jest realizowany przy współpracy z Prof. Bartoszem Szczęsnym z University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone.

W projekcie NCN pt. „Unraveling the molecular basis of DNA damage recognition and processing in human mitochondria” uzyskanym w ramach konkursu POLONEZ 2, naszym celem jest badanie

molekularnego mechanizmu rozpoznawania i cięcia uszkodzonego DNA przez nukleazę EXOG. Wyniki uzyskane dotychczas podczas realizacji tego projektu zostały wykorzystane w aplikacji o ERC Starting Grant 2019, złożony w październiku 2018 r.

Ponadto kontynuuję współpracę z grupą Prof. Andrew Fire ze Stanford University, California, Stany Zjednoczone, w projekcie mającym na celu poznanie sekwencji i właściwości strukturalnych matryc RNA replikowanych przez polimerazy transkrypcyjne. Kontynuuję również współpracę z grupą Prof. Marc Morais z University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone, dotyczącą mechanizmu działania białek, tzw. „molekularnych silników”, odpowiedzialnych za umieszczanie ujemnie naładowanego kwasu nukleinowego w zamkniętej przestrzeni kapsydu wirusów. Mechanizm działania tych białek polega na przekształcaniu energii chemicznej pochodzącej z hydrolizy ATP w ukierunkowany ruch mechaniczny wymagany do translokacji genomu do wnętrza wirionu. Do tej pory, aby uzyskać pseudoatomowy model kompleksu motorycznego i zrozumieć mechanizm działania „silników” pakujących genom, użyliśmy kombinacji technik ultrawiwowania w równowadze sedymentacyjnej, niskokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (ang. *Small-angle X-ray scattering, SAXS*), mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) i krystalografii rentgenowskiej oraz biochemii enzymatycznej. Kontynuujemy również współpracę z grupą Prof. Włodka Bujałowskiego, University of Texas Medical Branch w Galveston, Teksas, Stany Zjednoczone, w celu określenia struktury primosomu z *E. coli* za pomocą krystalografii rentgenowskiej i mikroskopii krioelektronowej.

Spis Literatury:

- Akhmedov, A. T. & J. Marin-Garcia (2015) Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal. *Mol Cell Biochem*, 409, 283-305.
- Alexeyev, M., I. Shokolenko, G. Wilson & S. LeDoux (2013) The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012641.
- Brinkman, K., H. J. ter Hofstede, D. M. Burger, J. A. Smeitink & P. P. Koopmans (1998) Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*, 12, 1735-44.
- Carr, A. & D. A. Cooper (2000) Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet*, 356, 1423-30.
- Chan, S. S. & W. C. Copeland (2009) DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 312-9.
- Chan, S. S., J. H. Santos, J. N. Meyer, B. S. Mandavilli, D. L. Cook, C. L. McCash, G. E. Kissling, A. Nyska, J. F. Foley, B. van Houten, W. C. Copeland, V. E. Walker, K. L. Witt & J. B. Bishop (2007) Mitochondrial toxicity in hearts of CD-1 mice following perinatal exposure to AZT, 3TC, or AZT/3TC in combination. *Environ Mol Mutagen*, 48, 190-200.
- Copeland, W. C. (2012) Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47, 64-74.
- Copeland, W. C. & M. J. Longley (2014) Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA Repair (Amst)*, 19, 190-8.
- Cymerman, I. A., I. Chung, B. M. Beckmann, J. M. Bujnicki & G. Meiss (2008) EXOG, a novel paralog of Endonuclease G in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 36, 1369-79.
- Dalal, B., A. Shankarkumar & K. Ghosh (2015) Individualization of antiretroviral therapy--pharmacogenomic aspect. *Indian J Med Res*, 142, 663-74.
- Davidzon, G., P. Greene, M. Mancuso, K. J. Klos, J. E. Ahlskog, M. Hirano & S. DiMauro (2006) Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann Neurol*, 59, 859-62.
- Driggers, W. J., S. P. LeDoux & G. L. Wilson (1993) Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells. *J Biol Chem*, 268, 22042-5.

- Feng, J. Y., A. A. Johnson, K. A. Johnson & K. S. Anderson (2001) Insights into the molecular mechanism of mitochondrial toxicity by AIDS drugs. *J Biol Chem*, 276, 23832-7.
- Gellon, L., D. R. Carson, J. P. Carson & B. Demple (2008) Intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in *Saccharomyces cerevisiae* Trf4 protein with a possible role in base excision DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, 7, 187-98.
- González-Vioque, E., A. Blázquez, D. Fernández-Moreira, B. Bornstein, J. Bautista, J. Arpa, C. Navarro, Y. Campos, M. A. Fernández-Moreno, R. Garesse, J. Arenas & M. A. Martín (2006) Association of novel POLG mutations and multiple mitochondrial DNA deletions with variable clinical phenotypes in a Spanish population. *Arch Neurol*, 63, 107-11.
- Graziewicz, M. A., M. J. Longley, R. J. Bienstock, M. Zeviani & W. C. Copeland (2004) Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 770-6.
- Hance, N., M. I. Ekstrand & A. Trifunovic (2005) Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet*, 14, 1775-83.
- He, Q., C. K. Shumate, M. A. White, I. J. Molineux & Y. W. Yin (2013) Exonuclease of human DNA polymerase gamma disengages its strand displacement function. *Mitochondrion*, 13, 592-601.
- Johnson, A. A. & K. A. Johnson (2001) Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, 276, 38097-107.
- Johnson, A. A., A. S. Ray, J. Hanes, Z. Suo, J. M. Colacino, K. S. Anderson & K. A. Johnson (2001) Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, 276, 40847-57.
- Johnson, A. A., Y. Tsai, S. W. Graves & K. A. Johnson (2000) Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization. *Biochemistry*, 39, 1702-8.
- Kasiswanathan, R., M. J. Longley, S. S. Chan & W. C. Copeland (2009) Disease mutations in the human mitochondrial DNA polymerase thumb subdomain impart severe defects in mitochondrial DNA replication. *J Biol Chem*, 284, 19501-10.
- Kazak, L., A. Reyes & I. J. Holt (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 659-71.
- Kieper, J., C. Lauber, O. Gimadutdinov, A. Urbańska, I. Cymerman, M. Ghosh, B. Szczesny & G. Meiss (2010) Production and characterization of recombinant protein preparations of Endonuclease G-homologs from yeast, *C. elegans* and humans. *Protein Expr Purif*, 73, 99-106.
- Kline, E. R., L. Bassit, B. I. Hernandez-Santiago, M. A. Detorio, B. Liang, D. J. Kleinhenz, E. R. Walp, S. Dikalov, D. P. Jones, R. F. Schinazi & R. L. Sutliff (2009) Long-term exposure to AZT, but not d4T, increases endothelial cell oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol*, 9, 1-12.
- Koczor, C. A. & W. Lewis (2010) Nucleoside reverse transcriptase inhibitor toxicity and mitochondrial DNA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6, 1493-504.
- Kohler, J. J. & W. Lewis (2007) A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen*, 48, 166-72.
- Krokan, H. E. & M. Bjørås (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012583.
- Larsen, N. B., M. Rasmussen & L. J. Rasmussen (2005) Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*, 5, 89-108.
- Lee, H., J. Hanes & K. A. Johnson (2003) Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry*, 42, 14711-9.
- Lee, H. R. & K. A. Johnson (2006) Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, 281, 36236-40.
- Lee, Y. S., K. A. Johnson, I. J. Molineux & Y. W. Yin (2010) A single mutation in human mitochondrial DNA polymerase Pol gammaA affects both polymerization and proofreading activities of only the holoenzyme. *J Biol Chem*, 285, 28105-16.
- Lee, Y. S., W. D. Kennedy & Y. W. Yin (2009) Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. *Cell*, 139, 312-24.

- Lim, S. E., M. J. Longley & W. C. Copeland (1999) The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem*, 274, 38197-203.
- Lim, S. E., M. V. Ponamarev, M. J. Longley & W. C. Copeland (2003) Structural determinants in human DNA polymerase gamma account for mitochondrial toxicity from nucleoside analogs. *J Mol Biol*, 329, 45-57.
- Longley, M. J., D. Nguyen, T. A. Kunkel & W. C. Copeland (2001) The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J Biol Chem*, 276, 38555-62.
- Longley, M. J., R. Prasad, D. K. Srivastava, S. H. Wilson & W. C. Copeland (1998a) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12244-8.
- Longley, M. J., P. A. Ropp, S. E. Lim & W. C. Copeland (1998b) Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase gamma: identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. *Biochemistry*, 37, 10529-39.
- Mandavilli, B. S., J. H. Santos & B. Van Houten (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*, 509, 127-51.
- McKenzie, R., M. W. Fried, R. Sallie, H. Conjeevaram, A. M. Di Bisceglie, Y. Park, B. Savarese, D. Kleiner, M. Tsokos, C. Luciano & et al. (1995) Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 333, 1099-105.
- Moyle, G. (2000) Clinical manifestations and management of antiretroviral nucleoside analog-related mitochondrial toxicity. *Clin Ther*, 22, 911-36; discussion 898.
- Moyle, G. J., D. Datta, S. Mandalia, J. Morlese, D. Asboe & B. G. Gazzard (2002) Hyperlactataemia and lactic acidosis during antiretroviral therapy: relevance, reproducibility and possible risk factors. *AIDS*, 16, 1341-9.
- Naviaux, R. K., D. Markusic, B. A. Barshop, W. L. Nyhan & R. H. Haas (1999) Sensitive assay for mitochondrial DNA polymerase gamma. *Clin Chem*, 45, 1725-33.
- Orrenius, S., V. Gogvadze & B. Zhivotovsky (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 143-83.
- Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius & B. Zhivotovsky (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12, 913-22.
- Pinz, K. G. & D. F. Bogenhagen (2000) Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase gamma and other family A DNA polymerases. *J Biol Chem*, 275, 12509-14.
- (2006) The influence of the DNA polymerase gamma accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit. *DNA Repair (Amst)*, 5, 121-8.
- Sohl, C. D., R. Kasiviswanathan, W. C. Copeland & K. S. Anderson (2013) Mutations in human DNA polymerase gamma confer unique mechanisms of catalytic deficiency that mirror the disease severity in mitochondrial disorder patients. *Hum Mol Genet*, 22, 1074-85.
- Sohl, C. D., M. R. Szymanski, A. C. Mislak, C. K. Shumate, S. Amiralaei, R. F. Schinazi, K. S. Anderson & Y. W. Yin (2015) Probing the structural and molecular basis of nucleotide selectivity by human mitochondrial DNA polymerase γ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 8596-601.
- Stierum, R. H., G. L. Dianov & V. A. Bohr (1999) Single-nucleotide patch base excision repair of uracil in DNA by mitochondrial protein extracts. *Nucleic Acids Res*, 27, 3712-9.
- Stumpf, J. D., R. P. Saneto & W. C. Copeland (2013) Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a011395.
- Szczesny, B., A. Brunyanski, G. Olah, S. Mitra & C. Szabo (2014) Opposing roles of mitochondrial and nuclear PARP1 in the regulation of mitochondrial and nuclear DNA integrity: implications for the regulation of mitochondrial function. *Nucleic Acids Res*, 42, 13161-73.
- Szczesny, B., G. Olah, D. K. Walker, E. Volpi, B. B. Rasmussen, C. Szabo & S. Mitra (2013) Deficiency in repair of the mitochondrial genome sensitizes proliferating myoblasts to oxidative damage. *PLoS One*, 8, e75201.

- Tann, A. W., I. Boldogh, G. Meiss, W. Qian, B. Van Houten, S. Mitra & B. Szczesny (2011) Apoptosis induced by persistent single-strand breaks in mitochondrial genome: critical role of EXOG (5'-EXO/endonuclease) in their repair. *J Biol Chem*, 286, 31975-83.
- Tigchelaar, W., A. M. De Jong, W. H. van Gilst, R. A. De Boer & H. H. Silljé (2016) In EXOG-depleted cardiomyocytes cell death is marked by a decreased mitochondrial reserve capacity of the electron transport chain. *Bioessays*, 38 Suppl 1, S136-45.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J. N. Spelbrink, A. T. Rovio, C. E. Bruder, Y. M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H. T. Jacobs & N. G. Larsson (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429, 417-23.
- Vasta, V., J. L. Merritt, 2nd, R. P. Saneto & S. H. Hahn (2012) Next-generation sequencing for mitochondrial diseases: a wide diagnostic spectrum. *Pediatr Int*, 54, 585-601.
- Vidal, F., P. Domingo, C. Viladés, J. Peraire, M. Arnedo, J. Alcamí, M. Leal, F. Villarroja & J. M. Gatell (2011) Pharmacogenetics of the lipodystrophy syndrome associated with HIV infection and combination antiretroviral therapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7, 1365-82.
- Zeviani, M. & F. Taroni (1994) Mitochondrial diseases. *Baillieres Clin Neurol*, 3, 315-34.

