

Robert Michał Boratyński
Streszczenie rozprawy doktorskiej
„Charakterystyka i właściwości fizyko-chemiczne nietypowych
endonukleaz restrykcyjnych klasy IIS”

Promotor : dr hab. Piotr Skowron, prof. UG

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Żylicz-Stachula

W Katedrze Biotechnologii Molekularnej pod kierownictwem prof. Piotra Skowrona prowadzone są badania poszukiwania nowych specyficzności restrykcyjnych, pochodzących z organizmów termofilnych. W wyniku analiz próbek pobranych ze środowisk geotermalnych w Egipcie wyizolowano szczep *Bacillus* sp. niosący nowo-odkryty system restrykcyjno-modyfikacyjny (R-M), który zgodnie z przyjętą nomenklaturą oznaczono BiiI. Analizowano właściwości fenotypowe szczepu oraz opracowano warunki jego hodowli. Szczep poddano analizie gatunkowej metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF. Analiza wykazała, że wyizolowany szczep należy do gatunku *Bacillus ilicheniformis*. Opracowano procedurę oczyszczania REazy BiiI metodami selektywnej precypitacji oraz chromatografii.

Korzystając z techniki sączenia molekularnego, wyznaczono wielkość REazy. Przy założeniu, że badane białko jest globularne i symetryczne wyznaczono ją na 59 kDa (kilodalton). Wynik ten potwierdzono pomiarem migracji w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w obecności wzorcowych białek. Określono optymalne warunki trawienia DNA dla enzymu. Warunki optymalne to: temperatura 47°C, pH = 9,0, a minimalne stężenie jonów Mg²⁺ wymaganych do pełnego trawienia substratu wynosi 0,1 mM. Określono także optymalne stężenie NaCl w buforze reakcyjnym na poziomie 10 mM. Wyznaczony wzór restrykcji DNA bakteriofaga lambda (λ) oraz T7 okazał się być identyczny jak w przypadku enzymu BsaI. Identyczny sposób cięcia DNA potwierdzono sekwencjonowaniem. Odkryty enzym jest zatem izoschizomerem BsaI. Enzym charakteryzuje się aktywnością o niższym optimum temperaturowym niż optimum wzrostu szczepu z którego pochodzi. Sugeruje to, iż badany system R-M mógł zostać pozyskany przez *Bacillus ilicheniformis* na drodze horyzontalnego transferu genów z innego gatunku/szczepu.

W drugiej części pracy analizowano funkcjonalnie nietypową REaz-MTazę TspDTI, stanowiącą system R-M pochodzący z termofilnej bakterii *Thermus* sp. DT (Skowron i wsp., 2003). Badano znaczenie rejonów TRD2 oraz ang. *coiled coil* w rozpoznawaniu sekwencji

ciętego DNA przez enzym TspDTI. Analizowano również znaczenie motywu NPPW na aktywność metylotransferazy (MTazy). Charakterystycznymi cechami tego enzymu są: termostabilność, obecne na jednym polipeptydzie dwie aktywności enzymatyczne - restrykcyjna i metylująca oraz niecałkowite trawienie substratowego DNA. Wykonano szereg mutacji ukierunkowanych. Badano aktywność uzyskanych wariantów mutacyjnych w lizatach bakteryjnych. Hodowle prowadzono w szczepie ekspresyjnym *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3). Ekspresję białek prowadzono pod kontrolą promotora P_R bakteriofaga λ i indukowano termicznie. Oczyszczono warianty enzymu wykazujące aktywność restrykcyjną. Porównywano właściwości fizyko–chemiczne jednego z wariantów mutacyjnych z natywnym enzymem TspDTI.

Wykazano, że usunięcie samego rejonu TRD wywołuje całkowity brak rozpoznawania sekwencji ciętego DNA przez enzym. Również usunięcie rejonu ang. *coiled coil* wywołuje taki skutek. Zmiana jednej tylko reszty aminokwasowej (aa) w motywie NPPW spowodowała całkowity spadek aktywności metylującej enzymu a także zmniejszenie aktywności REazy o 14%. Porównano również właściwości fizyko–chemiczne TspDTI oraz wariantu zmienionego. Wyniki pokazują, że mutacja nie spowodowała w znacznym stopniu zmian w optimum reakcyjnym temperatury oraz pH w porównaniu z enzymem niezmienionym. Konkludując, udało się rozdzielić dwie sprzężone aktywności enzymatyczne w obrębie białka TspDTI, uzyskując wariant będący funkcjonalnym odpowiednikiem klasycznych REaz Typu II, gdzie osobne enzymy kodują REazę i MTazę.