

REazo-MTaza TaqII jest białkiem izolowanym z termofilnych bakterii *T. aquaticus* YT-1 (TaqIIwt) i należy do systemu RM Typu II, pełniącego między innymi funkcję prostego układu immunologicznego tych mikroorganizmów. W 2003 roku TaqII zakwalifikowano do enzymów nowoodkrytej rodziny *Thermus* sp. (Skowron i wsp., 2003). Przedstawiciele tej rodziny stanowią przykład REaz znajdujących się na pograniczu 3 pod-Typów: IIS/IIC oraz IIG. Ponadto rodzina białek *Thermus* sp. wykazuje pewne podobieństwo do REaz Typu I oraz Typu III. Białka rodziny *Thermus* sp. stanowią wyjątkową grupę enzymów, gdyż pomimo różnic w sekwencji rozpoznawanej ujawniają szereg podobieństw na poziomie sekwencji aminokwasowej (co jest unikatowe wśród REaz rozpoznających różne sekwencje DNA).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy dostarczyły fundamentalnej wiedzy w zakresie właściwości biochemicznych rekombinantowej REazy TaqIIwt. Zweryfikowano jej specyficzność enzymatyczną oraz zaproponowano warunki, które umożliwiają kontrolowaną zmianę aktywności w zależności od zastosowanych warunków buforu reakcyjnego i kofaktora *S*-adenozyl-*L*-metioniny (SAM) lub jego analogów: *S*-adenozyl-*L*-homocysteiny (SAH) lub sinefunginy (SIN).

Dodatkowo zoptymalizowano procedurę nadprodukcji toksycznego (a zatem problematycznego w klonowaniu i ekspresji) dla rekombinantowego gospodarza białka TaqII w mezofilnych bakteriach *E. coli*. W tym celu zaprojektowano i chemicznie zsyntetyzowano nowy, radykalnie zmodyfikowany, gen *taqIIRMsyn* o: (i) zmienionej sekwencji nukleotydowej (nt) (zmiany w obrębie kodonów synonimicznych bez ich ujawnienia w sekwencji aminokwasowej), (ii) obniżonej zawartości par zasad GC, (iii) obniżeniu stabilności dupleksów w/w genu z mRNA oraz (iv) sekwencji umożliwiającej częściową relaksację II-rzędowej struktury matrycowego mRNA. Optymalizację sekwencji genu przeprowadzono w celu:

- eliminacji stabilnych struktur drugorzędowych mRNA mogących utrudniać translację TaqIIwt,
- optymalizacji wykorzystywanych kodonów pod kątem *E. coli*,
- zwiększenia ekspresji genu *taqIIRMsyn* w bakteriach mezofilnych, a tym samym zwiększenia poziomu nadprodukcji rekombinantowego białka.

Ostatecznie opracowano optymalną procedurę izolowania biosyntetyzowanego białka do stanu homogenności stosując ogrzewanie surowego lizatu w 65°C, techniki wybiórczego wytrącania kwasów nukleinowych, precypitacji TaqII^{syn} (NH₄)₂SO₄, chromatografię jonowymienną oraz filtrację żelową.