

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Darii Krefft

TthHB27I jest REazo-MTazą naturalnie występującą w komórkach bakterii termofilnej *Thermus thermophilus* HB27 (*T. thermophilus* HB27). Należy ona do odkrytej w 2003 roku rodziny termostabilnych enzymów *Thermus* (Skowron i wsp., 2003), która skupia REazo-MTazy Typu II, wykazujące podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej (aa) oraz lokalizacją domen odpowiedzialnych za aktywność zarówno REazy i MTazy w jednym polipeptydzie. Enzymy należące do tej rodziny posiadają cechy charakterystyczne dla 3 podtypów: IIC, IIG oraz IIS, a dodatkowo wykazują podobieństwa do REaz Typu I i Typu III.

W ramach niniejszej pracy opracowany został protokół izolacji aktywnej REazo-MTazy TthHB27I ze szczepu *T. thermophilus* HB27. Ze względu na bardzo niską zawartość enzymu w komórkach gospodarza natywnego, dokonano optymalizacji nadprodukcji pożądanego białka poprzez klonowanie i ekspresję dwóch wersji genu *tthHB27IRM* w komórkach *E. coli*. W pierwszym przypadku nadprodukcji aktywnego biologicznie enzymu dokonano poprzez koekspresję natywnego genu *wt-tthHB27IRM* wraz z genami kodującymi białka chaperonowe. W kolejnym podejściu zastosowano gen *syn-tthHB27IRM* zoptymalizowany pod kątem ekspresji w komórkach *E. coli*, uzyskany na drodze syntezy chemicznej. Optymalizacji genu dokonano poprzez dostosowanie wykorzystywanych kodonów pod kątem preferencji *E. coli* oraz redukcję możliwych struktur drugorzędowych mRNA, które mogły mieć wpływ na przebieg transkrypcji i w konsekwencji translacji białka. Do izolacji rekombinowanego enzymu wykorzystano ustalony protokół oczyszczania białka natywnego, wprowadzając niewielkie modyfikacje.

Doświadczenia przeprowadzone na oczyszczonym preparacie enzymatycznym dostarczyły licznych informacji na temat właściwości biochemicznych i fizykochemicznych REazo-MTazy TthHB27I, o którym dotychczas wiedziano jedynie, że jest izoschizomerem REazo-MTazy Tth111III. Potwierdzono sekwencję rozpoznawaną przez enzym i określono dokładne miejsce przecinania nici DNA przez TthHB27I. Ustalono warunki reakcji konieczne do uzyskania aktywności REazy i MTazy, a także sprawdzono wpływ kofaktora SAM i jego analogów na aktywność REazy. Dodatkowo sprawdzono stabilność termodynamiczną białka za pomocą trzech technik: CD, DSC oraz DSF.