

## 1. Streszczenie

Zasadniczy postęp w badaniach w zakresie biochemii, biologii molekularnej i genetyki został dokonany przy wykorzystaniu bakterii izolowanych ze środowisk naturalnych, w tym ekstremalnych, oraz szczepów laboratoryjnych. Nowe technologie sekwencjonowania DNA i genomiki umożliwiły poznanie sekwencji m.in. genomu człowieka oraz kilkuset gatunków mikroorganizmów. Badania te służą m.in.: (i) poznaniu filogenetycznej i taksonomicznej różnorodności mikroorganizmów w biosferze, gdzie większość stanowią nieznanne gatunki bakterii; (ii) identyfikacji w bazach metagenomowych sekwencji, operonów i genów, mogących prowadzić do opracowania leków, białek, enzymów oraz bioproduktów biotechnologicznych; (iii) ulepszaniu technik analizy DNA oraz sekwencjonowania i składania genomów i metagenomów. Celem pracy było stworzenie narzędzi służących ulepszeniu badań genomowych.

Bakteryjne termostabilne endonukleazy restrykcyjne (REazy) Typu IIS są doskonałymi narzędziami do manipulacji genetycznych ze względu na zdolność cięcia substratowego DNA poza obrębem sekwencji rozpoznawanej oraz stabilność termiczną. Środowiska naturalne stanowią bogate źródło enzymów o nowych właściwościach i specyficznościach substratowych. W przedstawionej pracy badano próbki gleb i biofilmów pochodzące z rejonów geotermalnych Islandii, izolując termofilną bakterię *Geobacillus* sp., biosyntetyzującą REazę R.GeoICI. Analizą biochemiczną R.GeoICI ustalono sekwencję rozpoznawania i miejsca cięcia DNA, klasyfikując ją do Typu IIS. W genomie *Geobacillus* sp. wykryto również gen kodujący metylotransferazę (MTazę), zbliżoną do REazo-MTazy RM.TspGWI z oddalonego filogenetycznie gatunku *Thermus* sp.. Prawdopodobnie jest to wynik horyzontalnego transferu genów.

Zespół prof. Piotra Skowrona odkrył dwie prototypowe REazo-MTazy oraz zdefiniował nową rodzinę REazo-MTaz *Thermus*, należących jednocześnie do Typów: IIS, IIC oraz IIG oraz wykazujących podobieństwo do Typu I i III. Charakteryzują się one homologią sekwencji aminokwasowych (aa), pomimo odmiennej sekwencji rozpoznawanej w DNA oraz dwufunkcjonalnością: domeny REazy i MTazy są ulokowane na jednym polipeptydzie. Ich aktywność enzymatyczna jest regulowana przez kofaktor/efektor allosteryczny SAM i jego analogi.

RM.TsoI należy do rodziny REazo-MTaz *Thermus*, a kodujący ją gen sklonowano przy współpracy zespołów: prof. Piotra Skowrona oraz prof. Lubysa Arvidas. Wyjątkowo dla rodziny REazo-MTaz *Thermus*, RM.TsoI nie wykazuje znaczących zmian specyficzności enzymatycznej pod wpływem SAM i jego analogów. Zaprojektowano i zsyntetyzowano nowy analog strukturalny SAM – S-adenozyl-L-cysteinę (SAC), który indukcyjnie RM.TsoI do zmiany specyficzności w

kierunku częstego cięcia substratowego DNA. Pozwala to na zakwalifikowanie RM.TsoI/SAC do nielicznej grupy REaz ultraczęsto tnących, bezcennych w tworzeniu bibliotek genomowych.

Kolejnym obiektem badawczym była rekombinantowa REazo-MTaza syn-RM.TaqII, uzyskana w wyniku ekspresji syntetycznego genu *syn-taqIIRM*, pochodząca z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*). Określono parametry fizykochemiczne enzymu RM.TaqII, nadprodukowanego w bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*), na bazie syntetycznego genu *syn-taqIIRM*. Tak zoptymalizowane metody analiz fizykochemicznych posłużą jako standard do badań nad strukturą przestrzenną enzymów rodziny REazo-MTaz *Thermus* oraz mechanizmem indukowanych chemicznie zmian specyficzności substratowej.