

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Aliakseia Papkov pt.: „Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu katalitycznego oraz wiążącego kofaktor”.

Celem przedstawionej pracy jest zmiana specyficzności enzymatycznej bifunkcjonalnej endonukleazo-metylotransferazy TthHB27I. Enzym ten należy do endonukleaz restrykcyjnych podtypu IIS/IIG/IIC i jest jednym z białek rodziny *Thermus* sp. Zespół prof. Skowrona zdołał wykazać niespecyficzną aktywność substratową, nazywaną „affinity star” dwóch enzymów pochodzących z tej rodziny. Taki rodzaj aktywności substratowej może być spowodowany następującymi warunkami reakcji: zwiększenie pH, niska siła jonowa, obecność rozpuszczalników organicznych i jonów metali dwuwartościowych innych niż magnez, a także nadmiarem jednostek enzymatycznych. Zmiana aktywności restrykcyjnej oraz rozpoznawanie zrelaksowanej sekwencji może nastąpić w wyniku oddziaływania z kofaktorem SAM (S-adenozylometioniną) i jego analogiem – SIN (sinefunginą). W wyniku przeprowadzonej analizy sekwencji aminokwasowej enzymów z rodziny *Thermus* sp. zostały wyznaczone najbardziej ewolucyjnie konserwowane i posiadające kluczowe znaczenie dla aktywności motywy: motyw nukleolityczny PD-(D/E)XK, motyw wiążący SAM oraz motyw katalizujący metylację NPPW/Y. Na podstawie danych strukturalnych rodzina została podzielona na dwie podrodziny bardziej spokrewnionych między sobą enzymów: podrodzinę TspGWI (TspGWI i TaqII) i podrodzinę TspDTI (TspDTI, Tth111II/TthHB27I, TsoI). Badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały zmianę specyficzności substratowej endonukleaz restrykcyjnych TspGWI i TaqII pod wpływem SIN, czego nie zaobserwowano przy zastosowaniu kofaktora SAM. Jednak zarówno SAM jak i SIN zwiększyły aktywność restrykcyjną tych enzymów. Założeniem, które chciałbym zweryfikować w ramach mojej pracy doktorskiej, jest zmiana specyficzności restrykcyjnej endonukleazy TthHB27I w wyniku zmian w sekwencji aminokwasowej w obrębie kluczowych dla aktywności enzymu motywów. Wykorzystywany do badań zaplanowanych w niniejszej pracy enzym jest uzyskiwany w wyniku nadekspresji syntetycznego genu, kodującego rekombinowaną endonukleazę restrykcyjną TthHB27I, o sekwencji aminokwasowej identycznej z enzymem natywnym. Nowe warianty wymienionego enzymu TthHB27I mogą być bardziej wrażliwe na obecność SIN/SAM. W przypadku wystąpienia relaksacji specyficzności zostanie zaobserwowana aktywność „affinity star”.

Mutagenesa ukierunkowana zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) PCR. Startery z docelową sekwencją zostaną zaprojektowane przy pomocy metod bioinformatycznych. Natywna sekwencja TthHB27I w motywie wiążącym SAM zostanie zmieniona z DPACGSG na DPAVGTG – sekwencję obecną w enzymie TspGWI, natomiast motyw katalityczny metylacji NPPW zostanie zmieniony na NPPY - sekwencję obecną w TspGWI i TaqII. Zostaną otrzymane trzy warianty białka: mutant NPPY, mutant DPAVGTG i mutant zawierający obie mutacje. Wprowadzenie mutacji zostanie wstępnie zweryfikowane przy pomocy enzymów restrykcyjnych, a następnie za pomocą sekwencjonowania. Nowe formy enzymu zostaną nadprodukowane w ekspresyjnym szczepie *E. coli*, a następnie zostaną wyizolowane, oczyszczone przy pomocy chromatografii jonowymiennej i scharakteryzowane pod względem biochemicznym.

Podstawowym zastosowaniem „często tnących” enzymów restrykcyjnych jest tworzenie bibliotek genomowych. Tworzenie bibliotek jest konieczne dla dalszego sekwencjonowania całego genomu. W ciągu ostatniej dekady wykorzystywanie sekwencjonowania ciągle wzrastało, jednocześnie stając się coraz bardziej dostępnym cenowo. Jest to w dużej mierze związane z rozwojem technologii sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS), które zastępuje tradycyjną metodę Sangera. Ilość artykułów naukowych w Medline, związanych z NGS rośnie wykładniczo.

To potwierdza fakt, że techniki NGS wykazały swój ogromny potencjał dla naukowców w dziedzinie medycyny i biologii. Pierwszym krokiem w analizie sekwencji przy pomocy technik NGS jest fragmentacja DNA o wysokiej masie cząsteczkowej. Istnieją trzy podstawowe podejścia do sposobu fragmentacji: fizyczne, enzymatyczne i chemiczne. Jednak ze względu na łatwość w wykonaniu i powtarzalne wyniki, metodą z wyboru wydaje się podejście enzymatyczne.

Najwyraźniej, zapotrzebowanie na nowe „często tnące” enzymy restrykcyjne będzie stale wzrastać. Dlatego opracowywanie nowych systemów enzymatycznych staje się aktualnym już dzisiaj. Uzyskanie w ramach mojego projektu “nożyczek molekularnych” wydaje się celem wysoce prawdopodobnym i pożądanym. Nawet w przypadku, gdy zaproponowana hipoteza nie zostanie potwierdzona, w trakcie projektu zostaną uzyskane cenne dane dla przyszłych badań.