

SANTRAUKA

Justina Kavaliauskaitė

***In vivo* transkripcijos interferencijos sistemos konstravimas restrikcijos endonukleazių Eco31I ir Eco31I^{Q69R/K127I} DNR specifiškumo tyrimams**

Šio darbo tikslas – taikant *in vivo* transkripcijos interferencijos sistemą, ištirti laukinio tipo restrikcijos endonukleazės (REazės) Eco31I (atpažįsta DNR seką 5'-GGTCTC-3') ir mutantinės REazės Eco31I^{Q69R/K127I} (atpažįsta DNR seką 5'-(G/W)GTCTC-3') sąveikos su DNR sekomis 5'-GGTCTC-3', 5'-AGTCTC-3', 5'-TGTCTC-3', 5'-CGTCTC-3' savybes. *In vivo* transkripcijos interferencijos sistemą sudaro *aadA* genas (sąlygoja atsparumą spektinomycinui) ir priešprasmis stiprus konstitutyviniis *E. coli* promotorius conII, nuo kurio vykstanti transkripcija blokuoja *aadA* geno ekspresiją. Tokios ląstelės fenotipas yra Sp^S. Transkripcija nuo promotoriaus conII gali būti reguliuojama, įvedant specifiškai su DNR sąveikaujančių baltymų atpažįstamas DNR sekas – sintetinius operatorius. Sąveikaudamas su atpažįstama DNR seka, baltymas veikia kaip conII promotoriaus represorius. Tai sąlygoja ląstelės fenotipo pasikeitimą į Sp^R. Darbo metu buvo sukonstruotos keturios transkripcijos interferencijos sistemos plazmidės, kuriose promotorius conII turi operatorines sekas: 5'-GGTCTC-3', 5'-AGTCTC-3', 5'-TGTCTC-3', 5'-CGTCTC-3'. REazė, nesant apsaugančios metilazės, turi letalų poveikį ląstelei-šeimininkui, todėl darbe buvo naudoti katalitiškai neaktyvūs fermento mutantai Eco31I^{H312A} ir Eco31I^{Q69R/K127I+H312A}. *A priori* tikėtasi, kad abu fermentai specifiškai sąveikaus su 5'-GGTCTC-3' seka, o Eco31I^{Q69R/K127I+H312A} taip pat įtakos transkripciją nuo promotoriaus conII, sąveikaudama su 5'-AGTCTC-3', 5'-TGTCTC-3' operatorinėmis sekomis. Gauti rezultatai parodė, kad eksperimento metu nustatytais optimaliomis *in vivo* transkripcijos interferencijos sąlygomis, abu tirti fermentai sąveikauja tik su 5'-GGTCTC-3' seka. Padaryta prielaida, kad naudotomis sąlygomis Eco31I^{Q69R/K127I+H312A} sąveika su operatorinėmis sekoms 5'-AGTCTC-3' bei 5'-TGTCTC-3' yra per silpna, kad būtų blokuota promotoriaus P_{conII} veikla.