

STRESZCZENIE

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę do nadania stopnia doktora dotyczy badań biochemicznych i strukturalnych bakteryjnych hydrolaz *S*-adenozylu-L-homocysteiny (SAHazy) pochodzących z *Thermotoga maritima*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Cytophaga hutchinsonii*. SAHazy regulują kluczowe dla metabolizmu komórki reakcje metylacji zależne od *S*-adenozylu-L-metioniny (SAM), poprzez kontrolę stężenia *S*-adenozylu-L-homocysteiny (SAH), silnego inhibitora szeregu procesów metylacyjnych. Enzymy te są najczęściej aktywne w formie homotetrameru, w którym każda z podjednostek: (i) ma budowę trójdomenową oraz (ii) wiąże po jednej cząsteczce substratu i kofaktora nikotynoamidoadeninowego w formie utlenionej (NAD⁺). Obecność kofaktora jest konieczna do przeprowadzenia reakcji enzymatycznej. W trakcie cyklu katalitycznego, każda z podjednostek oscyluje pomiędzy dwiema konformacjami – otwartą i zamkniętą, co wynika z ruchu dwóch głównych domen w trakcie wiązania substratu i uwalniania produktu. Prezentowane przeze mnie badania miały na celu poszerzenie wiedzy dotyczącej tej grupy enzymów. Interdyscyplinarność badań opisanych w niniejszym osiągnięciu naukowym pozwoliła mi na rozwiązanie wielu problemów pojawiających się w trakcie realizacji poszczególnych etapów badawczych, a co za tym idzie, pozwoliło na osiągnięcie założonych celów.

W trakcie prowadzenia badań nad hipertermofilną SAHazą z *T. maritima* wykazałam, że rekombinowane białko uzyskane w temperaturze pokojowej nie wykazuje aktywności katalitycznej. Analiza modelu krystalograficznego wskazywała, że poszczególne podjednostki przyjmują dwie nietypowe konformacje, wykluczające aktywność enzymatyczną tak zwiniętego białka. Dodatkowo, tylko dwie z czterech podjednostek wiążą kofaktor, który ponadto występuje głównie w formie zredukowanej (NADH), co również uniemożliwia katalityczny rozkład SAH. W oparciu o opracowaną przeze mnie procedurę pomiaru aktywności enzymatycznej tej SAHazy wykazałam, że białko zyskuje pełną aktywność katalityczną w wysokiej temperaturze, jedynie w obecności utlenionej formy kofaktora. W oparciu o porównanie modeli krystalograficznych SAHazy z *T. maritima* w formie nieaktywnej i aktywnej wyjaśniłam podłoże molekularne procesu termoaktywacji tego białka, polegające na przestrzennej rearanzacji poprawnie ufałdowanych domen.

W ramach badań związanych z SAHazą z *P. aeruginosa* zwróciłam uwagę na to, że aktywność katalityczna tego enzymu mocno zależy od typu jonu metalu alkalicznego obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Wykazałam, że enzym osiągał najwyższą aktywność w obecności kationów K^+ poprzez odpowiedni wpływ na dynamikę białka. Ponadto wykazałam, że wiązanie innych kationów wpływających na dynamikę tego białka może również prowadzić do inhibicji aktywności katalitycznej SAHazy. Zaobserwowałam to dla kationów Rb^+ i Zn^{2+} , które hamują aktywność enzymatyczną w sposób niekompetycyjny.

W ramach badań scharakteryzowałam biochemicznie i krystalograficznie SAHazę z *C. hutchinsonii*. Badania strukturalne oparte o metody biokrystalografii dotyczyły enzymu w konformacji zamkniętej w kompleksie z kofaktorem w formie utlenionej (NAD^+), adenozyną (produkt reakcji rozkładu SAH) oraz kationem Na^+ związanym w pobliżu kieszeni wiążącej substrat. Dodatkowo, przeanalizowałam sposób upakowania cząsteczek białka w sieci krystalicznej, zwracając uwagę na interesujący przypadek generowania homotetramerów odpowiadających aktywnej formie enzymu w oparciu o kombinację elementów symetrii krystalograficznej oraz translacyjnej symetrii niekrystalograficznej.

Podsumowując, uzyskane rezultaty stanowią nowe odkrycia i pozwalają na szersze zrozumienie aspektów biochemicznych i strukturalnych hydrolazy *S*-adenozyl-L-homocysteiny, dotyczących zwłaszcza nieznanych mechanizmów regulacji aktywności katalitycznej tej grupy enzymów.

28.05.2020 Justyna Czyrko-Horczak