

STRESZCZENIE

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przedstawiłam badania krystalograficzne 1,3- β -glukanazy z *Solanum tuberosum* (ziemniak, odmiana Désirée). Enzym ten należy do rodziny 17 hydrolaz glikozydowych (GH17) i posiada typ pofałdowania cylindra (β/α)₈, znany również pod nazwą „TIM barrel”. Oznaczone przeze mnie dwie struktury krystaliczne białka natywnego pozwoliły na wyznaczenie najbardziej zmiennych i zarazem mobilnych fragmentów strukturalnych w roślinnych 1,3- β -glukanazach. Analiza upakowania cząsteczek w kryształach potwierdziła, że obecność znacznika histydynowego nie zaburzyła struktury przestrzennej enzymu oraz pomogła w otrzymaniu wysokiej jakości kryształów. Poddanie zmutowanej formy białka kokrystalizacji z naturalnym substratem, pozwoliło na zaobserwowanie po raz pierwszy dla enzymów z rodziny GH17 oddziaływań pomiędzy sacharydami a białkiem.

Struktury białka natywnego określiłam do rozdzielczości 1.4 Å w przypadku formy HD (o wyższej gęstości) oraz 1.26 Å dla formy LD (o niższej gęstości). Różnice pomiędzy strukturami białka roślinnego występują głównie w obrębie pętli i helis tworzących zewnętrzną część cylindra (β/α)₈ oraz w elementach strukturalnych tworzących dodatkową subdomenę. W enzymie z *S. tuberosum* subdomena składa się z pętli ulokowanych wokół helisy α_6 : β_5 - α_5 i β_6 - α_6 , oraz z dodatkowych elementów strukturalnych występujących w tych pętlach: dwóch krótkich antyrównoległych łańcuchów β znajdujących się w pętli β_5 - α_5 i dwóch krótkich helis znajdujących się w pętli β_6 - α_6 . Długość wnęki katalitycznej, która biegnie wzdłuż całej cząsteczki białka nad rdzeniem arkusza β oraz nad subdomeną, sugeruje możliwość związania substratowej cząsteczki (1 \rightarrow 3)- β -D-glukanu o długości ośmiu jednostek cukrowych. Zaprezentowane wyniki pokazują, że pętla A6b- α_6 współtworząca subdomenę, wykazuje się dużą mobilnością i w przeciwieństwie do subdomeny w innych enzymach roślinnych tej grupy, nie zawiera krótkiego, antyrównoległego arkusza β , co może wpływać na różnice w długości i sposobie związania substratu. Ścisłe upakowanie

cząsteczek w obu strukturach krystalicznych [współczynnik Matthews'a 1.96 Å³.Da⁻¹ (struktura HD) i 2.03 Å³.Da⁻¹ (struktura LD)] jest wynikiem obecności znacznika histydynowego na karboksylowym końcu białka, który łączy sąsiadujące ze sobą cząsteczki w nieskończone, liniowe łańcuchy. Znacznik histydynowy biegnie od końca karboksylowego jednej cząsteczki i lokuje się we wnęce katalitycznej sąsiadującej z nią kolejnej cząsteczki białka. Ponieważ takie oddziaływania nie mają wpływu na strukturę białka ani na geometrię centrum aktywnego, obecność znacznika histydynowego miała korzystny wpływ na proces krystalizacji białka.

Kolejne dwie struktury 1,3-β-glukanazy rozwiązałam dla białka z resztą nukleofila Glu259 zmutowaną do alaniny. W obu przypadkach wykryłam białko w kompleksie z produktami hydrolizy laminaraheksozy, a struktury oznaczyłam z rozdzielczością 1.68 i 1.55 Å. Pomimo mutacji centrum aktywnego, enzym wykazał się resztkową aktywnością i w strukturach kompleksów pojawiły się produkty reakcji hydrolizy: laminatrioza i laminaratetroza, których powstanie potwierdziła spektrometria mas. W zmutowanym enzymie rolę nukleofila mogła odegrać cząsteczka wody, która wpasowała się we fragment struktury centrum aktywnego dostępny po zmutowaniu dłuższego łańcucha bocznego reszty Glu na krótszy łańcuch Ala. W obu strukturach kompleksów cząsteczka laminatriozy zajmuje obszar wnęki katalitycznej odpowiedzialny za związanie nieredukującego końca substratu (glikonu) w miejscach wiązających -1, -2 i -3. W warunkach zwiększonego stężenia substratu/produktu w roztworze krystalizacyjnym, dodatkowo miejsca wiązające +1, +2, +3 i +4, zajęła cząsteczka laminaratetrozy, dając w efekcie kompleks z dwoma produktami hydrolizy związanymi we wnęce katalitycznej. Oddziaływania enzym-laminaratetroza są słabsze i tylko dwie jednostki glukozy z miejsc wiązających +3 i +4 są na tyle uporządkowane, że ich położenie mogło zostać jednoznacznie zinterpretowane. Koniec nieredukujący trisacharydu umiejscowiony jest w pobliżu końca wnęki katalitycznej wyznaczonego przez pętlę β2-α2. Koniec redukujący tetrasacharydu umiejscowiony jest po przeciwnej

stronie wnęki w pobliżu helisy $\alpha 6$. Struktury kompleksów pozwoliły mi na opisanie oddziaływań występujących pomiędzy enzymem i oligosacharydami we wnęcie katalitycznej. Jednostki glukozy z miejsc wiążących -1 i -2 oddziałują z resztami aminokwasowymi, które są ściśle zachowawcze w roślinnych 1,3- β -glukanazach. Natomiast jednostki glukozy z miejsc wiążących -3, +3 i +4 oddziałują z niezachowawczymi resztami aminokwasowymi, co może sugerować różnice w sposobie rozpoznawania substratu pomiędzy enzymami różnych roślin. Kształt wnęki katalitycznej określa specyficzność substratową enzymu i wyklucza możliwość związania (1 \rightarrow 4)- β -glukanów w miejscach wiążących od -3 do +4. Boczne rozgałęzienia substratu przez wiązania β -1,6 są możliwe tylko w miejscach wiążących +1 i +2. Dodatkowo, zaobserwowane ograniczenie steryczne we wnęcie katalitycznej po stronie glikonu tłumaczy preferencję enzymu do tworzenia trisacharydów jako głównych produktów reakcji hydrolizy. Przedstawione struktury są pierwszymi opisanymi przypadkami kompleksów z oligosacharydami dla roślinnych 1,3- β -glukanaz z rodziny GH17.