

Badania strukturalne hydrolazy S-adenozyl-L-homocysteiny z symbiotycznych bakterii asymilujących azot

Tomasz Manszewski

Przedmiotem badań strukturalnych była hydrolaza S-adenozyl-L-homocysteiny (SAHaza) z symbiotycznej bakterii *Bradyrhizobium elkanii* (BeSAHaza). Enzym ten reguluje komórkowe procesy metylacji zależne od SAM (S-adenozyl-L-metioniny). U człowieka SAHaza odgrywa ważną rolę w regulacji poziomu homocysteiny (Hcy) w osoczu, który - gdy jest podwyższony - jest przyczyną wielu chorób.

Podczas realizacji projektu opracowany został wysokowydajny protokół nadekspresji białka, jak również procedura otrzymywania enzymu w formie wolnej od jakichkolwiek ligandów oraz warunki krystalizacji. Rozwiązanych oraz udokładnionych zostało pięć struktur krystalicznych BeSAHazy w kompleksie z takimi ligandami jak adenozyne, 2'-deoksyadenozyna, 3'-deoksyadenozyna oraz adenina.

W trakcie analizy pierwszej ze struktur, która okazała się tetramerem, zauważono, że cząsteczki adenozyne znajdują się w miejscach aktywnych trzech podjednostek, pomimo że adenozyne nie była dodawana ani w trakcie oczyszczania, ani w trakcie krystalizacji. Co więcej, podjednostki, w których związane były cząsteczki liganda, miały inną konformację, która została określona jako zamknięta, niż podjednostka z wolnym miejscem aktywnym, której konformacja była otwarta.

Druga struktura została określona dla białka inkubowanego z nadmiarem 3'-deoksyadenozyny. W tym przypadku dodawany ligand zlokalizowany został tylko w jednej z czterech podjednostek, podczas gdy pozostałe podjednostki znów związały cząsteczki adenozyne w miejscach aktywnych.

Określenie pozostałych trzech struktur zostało poprzedzone wprowadzeniem dodatkowego etapu w protokole oczyszczania. Pozwoliło to na uzyskanie białka wolnego od jakichkolwiek ligandów, które mogło być użyte do inkubacji z pożądanymi ligandami. W ten sposób zostały określone i udokładnione struktury kompleksów z adenozyną, adeniną oraz kompleksu mieszanego z adeniną i 2'-deoksyadenozyną.

Wszystkie wyznaczone struktury krystaliczne BeSAHazy stały się podstawą szczegółowej analizy i wzajemnego porównania. W wyniku tych analiz opisana została nowa konformacja SAHazy, półotwarta, którą przyjął enzym w kompleksie z 3'-deoksyadenozyną. Przeprowadzone badania rzuciły również nowe światło na mechanizm działania "bramki molekularnej", która otwiera i zamyka kanał prowadzący do miejsca aktywnego. Wyjaśniona została również rola kationów (amonowego i sodowego) w stabilizacji struktury białka.

Podsumowując, odkryte zostały nowe aspekty strukturalne hydrolazy S-adenozyl-L-homocysteiny, dające wgląd na poziomie atomowym w zmiany, jakim ulega to białko w trakcie przemian konformacyjnych niezbędnych dla jego aktywności enzymatycznej.