

Structural studies of chitinolytic enzymes from *Pyrococcus chitonophagus*

Katarzyna Biniek-Antosiak

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania strukturalne i funkcjonalne enzymów uczestniczących w szlaku degradacji chityny. Do badań wybrano cztery białka należące do trzech różnych klas enzymów (chitynaz, deacetylaz diacetylochitobiozy i *egzo*- β -D-glukozaminidaz) i opracowałam dla nich protokoły oczyszczania.

Dla dwóch enzymów uzyskałam kryształy (w różnych warunkach krystalizacyjnych), dla których zarejestrowano dane dyfrakcyjne. Dla deacetylazy diacetylochitobiozowej zarejestrowano trzy zestawy danych: dla białka bez ligandu, dane anomalne przy długości fali absorpcji cynku oraz dla kompleksu enzym-substrat. Dzięki dodatkowym badaniom udało mi się potwierdzić, że deacetylaza należy do rodziny 14 esteraz węglowodanowych (CE) obejmującej deacetylazy zależne od cynku, co sugeruje literatura,. Dla *egzo*- β -D-glukozaminidazy uzyskano dane krystalograficzne i rozwiązano strukturę enzymu.

Oprócz badań strukturalnych, na których skupiała się moja praca, dzięki współpracy zakres działań został rozszerzony o badania komplementarne z wykorzystaniem takich technik jak SAXS, NMR, ITC, DSC.

Trzy badane przeze mnie enzymy - chitynaza, deacetylaza i glukozaminidaza - tworzą minimalny zestaw, wystarczający do tego żeby zdegradować chitynę do glukozaminy, pod warunkiem, że dwa ostatnie enzymy nie będą "zbyt specyficzne". W przeciwnym razie produkty pośrednie będą się gromadzić. Deacetylaza w tym badaniu usuwa grupę acetylową tylko z nieredukującego końca (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃, ale może również deacetylować monomeryczny GlcNAc. Oznacza to, że jest wystarczająco niespecyficzna, aby wchodzić w skład triady chitynolitycznej, zdefiniowanej powyżej. Specyficzność glukozaminidazy wciąż nie została określona i będzie przedmiotem dalszych badań, ale struktura dla niej została rozwiązana, a wczesne badania

enzymatyczne wskazują, że uzupełnia ona aktywność deacetylazy diacetylochitobiozowej.

Warto zauważyć, że oba enzymy są hipertermofilne, Dac-74 i GlnA-01, mogły być przygotowywane w temperaturze pokojowej, ale wymagały wyżarzania, zanim można było wykryć jakąkolwiek aktywność enzymatyczną. Termin "wyżarzanie" został zdefiniowany w metalurgii i materiałoznawstwie, aby opisać obróbkę cieplną, która zmienia fizyczne lub chemiczne właściwości materiałów. Najwyraźniej odnosi się on również do niektórych enzymów hipertermofilnych. Szczegóły tego, co faktycznie ma miejsce podczas procesu wyżarzania, pozostają do ustalenia.