

**Synteza nukleotydów sygnałowych [(p)ppGpp i (p)ppApp] przez enzym RSH z
Methylobacterium extorquens AM1
Michał Sobala**

Odpowiedź ścisła jest szeroko rozpowszechnionym mechanizmem regulacyjnym umożliwiającym adaptację bakterii do zmiennych warunków środowiskowych. Odpowiedź ta jest regulowana przez dwa alarmony będące analogami GTP i GDP, pppGpp i ppGpp nazywane zbiorczo (p)ppGpp. Wiele lat temu odkryto, że są one akumulowane w odpowiedzi na niedobory składników odżywczych oraz inne stresy, które mogą występować w środowisku. W konsekwencji akumulacji (p)ppGpp dochodzi do przekierowania dostępnych zasobów wykorzystywanych przy wzroście bakterii do zapewnienia im przetrwania niekorzystnych warunków środowiskowych. Odpowiedź ścisła ma potencjalne znaczenie medyczne, ponieważ akumulacja (p)ppGpp jest niezbędna bakteriom patogennym do obrony przed stresem wywołanym mechanizmami obronnymi komórek gospodarza a także do przetrwania w obecności antybiotyków.

Pierwszym celem niniejszej pracy była identyfikacja i oczyszczenie białka odpowiedzialnego za syntezę (p)ppGpp u *Methylobacterium extorquens* AM1. Za pomocą metod bioinformatycznych zidentyfikowano jedno potencjalne białko RSH. Konieczne było zastosowanie najnowocześniejszych technik zwiększających rozpuszczalność białek i zaprojektowanie wariantu białka zawierającego tylko N-terminalną domenę hydrolazy i syntetazy (p)ppGpp, bez C-terminalnej domeny regulatorowej, co pozwoliło uzyskać homogenny i aktywny preparat białkowy. Po pomyślnym oczyszczeniu białka RSH_{Mex}1-352, przeprowadzono jego charakterystykę biochemiczną w warunkach *in vitro*. RSH_{Mex}1-352 do wydajnej syntezy alarmonów wymaga kationów kobaltu co jest pierwszym tego typu przypadkiem dla do tej pory biochemicznie scharakteryzowanych enzymów syntetyzujących alarmony (p)ppGpp. Za pomocą chromatografii dwukierunkowej udowodniono, że wspomniany oczyszczony enzym syntetyzuje nukleotydy: pppGpp, ppGpp i pppApp, zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Jest to pierwszy udokumentowany przypadek syntezy pppApp przez enzym typu RSH. RSH_{Mex}1-352 wykazuje znacznie większe powinowactwo do ATP niż GTP, co jest cechą wyjątkową tego enzymu. Dodatkowo, omawiane białko jest aktywne w komórkach *E. coli* (pozbawionych aktywnej syntetazy (p)ppGpp gospodarza) przy nadprodukcji z plazmidu. Ponadto, w niniejszej rozprawie udowodniono syntezę pppApp w warunkach *in vivo* przez szczepy typu dzikiego bakterii *Methylobacterium extorquens* AM1 i co szczególnie intrygujące – także przez bakterie *Escherichia coli*. Może to może sugerować istnienie nowego potencjalnego alarmonu (pppApp) zaangażowanego w odpowiedź ścisłą.