

Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

Katedra Mikrobiologii



Rozprawa doktorska

**Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fosforylazy
metylotioadenozyny kodowanej przez gen otrzymany z metagenomu
gleby antarktycznej**

mgr inż. Paulina Bartasun

Promotor: prof. dr hab. Józef Kur

Promotor pomocniczy: dr inż. Hubert Cieśliński

Gdańsk, 2013

Składam serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Józefowi Kur za wiedzę i doświadczenie, które mi przekazał oraz za pomoc podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Pragnę również podziękować Panu Doktorowi Hubertowi Cieślińskiemu za cenne uwagi merytoryczne w trakcie prowadzenia badań i pisanie rozprawy, opiekę naukową i przekazaną wiedzę.

Dziękuję moim Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii za sympatyczną atmosferę pracy.

Dziękuję Pracownikom Katedry Mikrobiologii i wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy za pomoc i życzliwość.

Spis treści

1. Streszczenie	6
Abstract	8
2. Wstęp	10
2.1. Izolacja genu <i>rsfp</i>	10
2.2. Fosforylaza metylo tioadenozyny	12
2.2.1. Szlak odzysku metioniny	12
2.2.1.1. Przekształcenie MTA w MTR1P.....	15
2.2.1.2. Znaczenie cyklu MTA w komórkach eukariotycznych.....	16
2.2.2. Struktury krystaliczne znanych fosforylaz metylo tioadenozyny	17
2.2.2.1. Struktura krystaliczna ludzkiej MTAP	17
2.2.2.2. Struktura krystaliczna MTAP <i>Sulfolobus solfataricus</i>	21
2.2.2.2.1. SsMTAP.....	21
2.2.2.2.2. SsMTAPII.....	24
2.3. Rodamina B	27
2.3.1. Właściwości spektralne rodminy B	29
2.4. Badanie oddziaływań barwników ksantenowych z białkami	32
2.4.1. Metody badania oddziaływań barwników ksantenowych z białkami	32
2.4.2. Luminescencja	34
2.4.2.1. Wygaszanie fluorescencji	35
3. Cel pracy	39
4. Materiały i metody	40
4.1. Materiały	40
4.1.1. Szczepy bakteryjne	40
4.1.2. DNA plazmidowe	40
4.1.3. Pożywki i podłoża	40
4.1.4. Rozdział elektroforetyczny DNA	41
4.1.5. Markery wielkości DNA	41
4.1.6. Odczynniki do elektroforezy SDS-PAGE	41
4.1.7. Markery masy cząsteczkowej białek	42
4.1.8. Odczynniki do reakcji PCR	42
4.1.9. Enzymy restrykcyjne i bufor do reakcji trawienia	43
4.1.10. Odczynniki do reakcji ligacji	43
4.1.11. Mutageneza ukierunkowana	44
4.1.12. Bufory do oczyszczania białka RSFP	44
4.1.13. Pozostałe bufor i roztwory	44

4.2. Metody	46
4.2.1. Hodowle bakteryjne	46
4.2.2. Transformacja komórek <i>E. coli</i>	46
4.2.3. Izolacja i oczyszczanie DNA	46
4.2.4. Rozdział DNA w żelu agarozowym	47
4.2.5. Elektroforeza SDS-PAGE	47
4.2.6. Konstrukcja wektora ekspresyjnego pBAD-RSFP	47
4.2.6.1. Amplifikacja genu <i>rsfp</i>	47
4.2.6.2. Reakcja trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi	48
4.2.6.3. Reakcja ligacji	49
4.2.6.4. Izolacja plazmidu pBAD-RSFP	49
4.2.7. Konstrukcja wektora pułpkowego pTrap	50
4.2.7.1. Amplifikacja genu <i>rsfp</i>	50
4.2.7.2. Reakcja trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi	50
4.2.7.3. Reakcja ligacji	51
4.2.7.4. Izolacja plazmidu pTrap	51
4.2.8. Klonowanie fragmentów DNA genomowego <i>E. coli</i> do wektora pTrap	52
4.2.9. Mutageniza ukierunkowana	53
4.2.10. Ekspresja genu <i>rsfp</i> w komórkach <i>E. coli</i> LMG194	54
4.2.10.1. Ekspresja pilotażowa genu <i>rsfp</i> w komórkach <i>E. coli</i> LMG194	54
4.2.10.2. Ekspresja genu <i>rsfp</i> w komórkach <i>E. coli</i> LMG194	55
4.2.11. Oczyszczanie białka RSFP	55
4.2.12. Oznaczanie stężenia białek	56
4.2.13. Wyznaczenie masy molekularnej natywnego białka RSFP	56
4.2.14. Technika sprawdzenia aktywności białka RSFP	56
4.2.15. Pomiary spektrofotometryczne	57
4.2.15.1. Widma absorpcyjne i emisyjne rodamin B w obecności RSFP	57
4.2.15.2. Widma emisyjne (wzbudzenie 554 nm i 557 nm) rodamin B w obecności RSFP	57
4.2.15.3. Pomiary metodą spektroskopii korelacji fluorescencji	58
4.2.15.4. Wygaszanie fluorescencji rodamin B przez białko RSFP	58
4.2.15.5. Widma absorpcyjne rodamin B w obecności mutein RSFP	58
4.2.15.6. Pomiary spektrofotometryczne przeprowadzone w trakcie oceny przydatności szczepu ekspresyjnego gen <i>rsfp</i> jako biosensora rodamin B	59
4.2.16. Oznaczanie aktywności enzymatycznej RSFP	59
4.2.17. Przygotowanie preparatów mikroskopowych	60
4.2.18. Krystalizacja białka RSFP	60
4.3. Programy komputerowe i bazy danych	61
5. Wyniki	62
5.1. Otrzymanie białka RSFP	62
5.1.1. Konstrukcja wektora ekspresyjnego pBAD-RSFP	62
5.1.2. Ekspresja genu <i>rsfp</i> w komórkach <i>E. coli</i> LMG194	62
5.1.3. Oczyszczanie białka RSFP	63
5.1.3.1. Wyznaczenie masy molekularnej RSFP	63
5.1.4. Zbadanie zdolności preparatu białka RSFP do wywoływania fluorescencji rodamin B	64
Podsumowanie	65

5.2. Charakterystyka białka RSFP	66
5.2.1. Badanie wpływu obecności białka RSFP na właściwości spektralne rodamininy B	66
5.2.1.1. Widma absorpcyjne i emisyjne rodamininy B w obecności RSFP	66
5.2.1.2. Badanie oddziaływania rodamininy B z RSFP metodą spektroskopii korelacji fluorescencji	72
5.2.1.3. Wygaszanie fluorescencji rodamininy B przez białko RSFP	73
5.2.2. Wyniki badań krystalograficznych białka RSFP	74
5.2.2.1. Struktura natywnego białka RSFP	74
5.2.2.2. Zmiany konformacyjne białka RSFP po związaniu cząsteczki rodamininy B	75
5.2.2.3. Miejsca wiązania rodamininy B w białku RSFP	76
5.2.3. Mutagenеза ukierunkowana genu <i>rsfp</i>	78
5.2.3.1. Widma absorpcyjne rodamininy B w obecności mutein RSFP	80
5.2.3.2. Badanie oddziaływania rodamininy B z muteinami RSFP metodą spektroskopii korelacji fluorescencji	81
5.2.4. Aktywność enzymatyczna RSFP	82
Podsumowanie	85
5.3. Zastosowania genu <i>rsfp</i> i białka RSFP	86
5.3.1. Gen reporterowy	86
5.3.1.1. Gen <i>rsfp</i> jako gen reporterowy w wektorach pułapkowych	87
5.3.2. Mikroskopia fluorescencyjna	95
5.3.2.1. Zastosowanie białka RSFP w barwieniu komórek <i>E. coli</i> rodaminą B	95
5.3.3. Biosensory komórkowe	96
5.3.3.1. Komórki <i>E. coli rsfp+</i> w wykrywaniu rodamininy B	99
Podsumowanie	103
6. Omówienie i dyskusja wyników	104
8. Literatura	111
9. Dorobek naukowy	120
10. Indeks skrótów	121

1. Streszczenie

Gen *rsfp* wyizolowano w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej podczas przeszukiwania biblioteki metagenomowej utworzonej z DNA pochodzącego z gleby antarktycznej w celu otrzymania psychrofilnych enzymów lipolitycznych. Badania te przeprowadzone zostały na podłożu agarowym zawierającym rodaminę B (RB), umożliwiającym identyfikację kolonii bakteryjnych charakteryzujących się zdolnościami lipolitycznymi poprzez obserwację widocznego w świetle UV przejaśnienia barwy pomarańczowej wokół tej kolonii. Jedną z analizowanych w trakcie tego eksperymentu kolonii bakteryjnych, nie wykazującą aktywności lipolitycznej, wykazała silną, różową fluorescencję w świetle UV. Co ważne, analiza literatury wykazała brak doniesień o podobnym zjawisku fluorescencji podczas stosowania wspomnianej metody. Dalsze badania nad tym zjawiskiem ujawniły, że za powstającą fluorescencję odpowiedzialna jest akumulacja cząsteczek RB przez komórki bakteryjne, wywołana ekspresją genu pochodzącego z metagenomu. Białko kodowane przez ten gen wykazuje podobieństwo na poziomie 93% do sekwencji aminokwasowej fosforylasy metylo tioadenozyny (MTAP) szczepu *Psychrobacter arcticus* 273-4. Gen ten nazwano *rsfp* (ang. *rhodamine B sensitive fluorescent phosphorylase*). Enzym MTAP odpowiedzialny jest za przekształcanie 5'-metylo tioadenozyny do 5'-metylo tioribozu-1-fosforanu w pierwszym etapie szlaku metabolicznego metioniny w komórkach większości organizmów eukariotycznych, archeonów i niektórych bakterii, np. *Pseudomonas*. MTAP zaangażowana jest także w procesy takie jak quorum sensing, metylację, metabolizm puryn, syntezę poliamin, w związku z czym odgrywa znaczącą rolę w utrzymaniu komórkowej równowagi metabolicznej. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania ludzkim analogiem MTAP. Deficyt tego enzymu obserwowany jest w komórkach nowotworowych, przez co stanowić może nowy cel działania leków przeciwnowotworowych.

Rodamina B jest barwnikiem fluorescencyjnym, szeroko stosowanym w badaniach biologicznych i histologicznych oraz do barwienia fluorescencyjnego mikroorganizmów. Ponadto, barwnik ten jest wykorzystywany w przemyśle chemicznym, tekstylnym, papierniczym i farbiarskim. Toksyczność RB, przy jednoczesnym wzrastającym zapotrzebowaniu przemysłu na ten związek oraz trudności z oczyszczaniem ścieków zawierających RB i powtarzające się przypadki wykorzystania RB jako barwnika w kosmetykach i produktach spożywczych spowodowały wzrost zainteresowania badaniami nad mechanizmem toksyczności i kancerogenności tego barwnika. Czynnikiem stanowiącym

o szkodliwym działaniu RB może być wysokie powinowactwo tego barwnika do białek zaangażowanych w podstawowy metabolizm komórkowy.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były pierwszym doniesieniem wskazującym na istnienie oddziaływania RB z enzymami, w szczególności z fosforylazą metylo tioadenozyny. Potwierdzono, że za obserwowaną w świetle UV fluorescencję komórek *E. coli* ekspresujących gen *rsfp* odpowiada oddziaływanie cząsteczek RB z białkiem będącym produktem tego genu, czego konsekwencją była wewnątrzkomórkowa akumulacja RB. Analiza widm absorpcyjnych oraz emisyjnych RB w obecności i przy braku białka RSFP pozwoliła ustalić, że za fluorescencję odpowiedzialne jest wiązanie cząsteczek barwnika na powierzchni białka RSFP. Oddziaływanie cząsteczek RB z RSFP zostało ponadto potwierdzone badaniami spektroskopii korelacji fluorescencji. Badania krystalograficzne pozwoliły na ustalenie, że białko RSFP jest trimerym składającym się z trzech, identycznych podjednostek. Przeprowadzone następnie analizy porównawcze struktur krystalicznych natywnego białka RSFP oraz białka RSFP w kompleksie z RB wskazały istnienie w cząsteczce białka RSFP trzech miejsc wiązania cząsteczek barwnika. Ponadto, analizy danych krystalograficznych białka RSFP w obecności RB pozwoliły na zidentyfikowanie reszt aminokwasowych znajdujących się w miejscu wiązania RB. Jako reszty aminokwasowe kluczowe dla wiązania cząsteczek RB przez białko RSFP wskazano resztę Ser22, Asp222 i Asp224 oraz resztę Phe179. Na drodze mutagenyzy ukierunkowanej utworzono warianty sekwencyjne białka RSFP: RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A oraz RSFP-F179A. Stwierdzono, że nie są one zdolne do oddziaływania z rodaminą B, co zostało potwierdzone przez analizy właściwości spektralnych rodaminy B, w tym techniką FCS. Co więcej, badania homologii sekwencji aminokwasowej białka RSFP z sekwencjami aminokwasowymi znanych fosforylaz metylo tioadenozyny, np. ludzkiej MTAP wskazują, że reszty Asp222 i Asp224 są resztami zakonserwowanymi w tej grupie enzymów, odpowiedzialnymi za przeprowadzaną przez białko katalizę. Dowiedziono, że białko RSFP posiada aktywność fosforylasy metylo tioadenozyny i zdolne jest do przeprowadzania reakcji fosforolizy MTA, prowadzącej do uwolnienia metylo tyribozo-1-fosforanu oraz adeniny.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania genu *rsfp* jako nowego genu reporterowego. Gen *rsfp* może zostać wykorzystany w konstrukcji wektorów pułapkowych służących do poszukiwania sekwencji promotorowych lub innych typach wektorów, np. wahadłowych. Ponadto, gen *rsfp* może zostać wykorzystany w mikroskopii fluorescencyjnej jako gen markerowy do rozróżniania komórek rekombinantowych *E. coli*, w których zachodzi ekspresja genu *rsfp* od komórek nierekombinantowych. Potwierdzono także przydatność rekombinantowego szczepu *E. coli* niosącego gen *rsfp* do konstrukcji biosensora komórkowego biodostępnej rodaminy B w środowiskowych próbkach wody.

Abstract

The *rsfp* gene was discovered at The Microbiology Department at The Faculty of Chemistry of Gdansk University of Technology during examination of an Antarctic soil-derived metagenome library for the presence of *E. coli* clones exhibiting lipolytic activity. This screening was performed on agar plates containing rhodamine B (RB) where clones exhibiting lipolytic activity produce orange halos. One of the analyzed clones that did not produce any lipase activity exhibited pink fluorescence under UV illumination. What is interesting to note is that the pink fluorescence of recombinant clone of *E. coli* under the same experimental conditions had never been reported before. Detailed study of this unexpected discovery revealed that accumulation of rhodamine B in *E. coli* cells which was a consequence of expression of a metagenomic – derived *rsfp* gene was a factor responsible for pink fluorescence of this bacterial colony. The *rsfp* gene product showed 93% identity to the methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) of *Psychrobacter arcticus* 273-4. On this basis, the gene was called as *rsfp* gene (*rhodamine B sensitive fluorescent phosphorylase*).

The MTAP is an enzyme responsible for conversion of 5'-methylthioadenosine to 5'-methylthioribose-1P in the first step of the methionine salvage pathway in sulfur metabolism of most Eukaryotes, Archaea and some Bacteria. MTA phosphorylase is also metabolically linked to S-adenosylmethionine (SAM)-related biological processes, such as quorum sensing, methylation reactions, purine salvage and polyamine biosynthesis. In recent years, the most intensively investigated MTA phosphorylase is a human MTA phosphorylase that is known as a ubiquitously expressed housekeeping gene in normal human tissues and cells. However, this enzyme has been also found to be deficient in a variety of human cancers. The MTA phosphorylase plays an important role in the balance between cell metabolism processes.

Rhodamine B is a fluorescent dye commonly used in textile, leather, paper and chemical industry and it is also used as a stain in biology, histology and pathology applications. RB can be used as a fluorescent dye in the complex with free fatty acids in the plate assay for bacterial lipases. RB is also used in fluorescent staining of microorganisms. The toxic properties of RB, increasing rate of production of RB for industry demand, the problems with RB removal from industrial wastewaters and the iterative incidents of an unauthorized usage of RB as colorant in food and cosmetics are the main reasons for the recent growth of the interest in the study of the mechanism of toxic and carcinogenic action of RB. The interactions between cell proteins and dye molecules may be of great importance for the understanding of the toxic properties of RB.

The research described in this thesis is the first study indicating the existence of the specific interaction between the methylthioadenosine phosphorylase (in general)

and rhodamine B. There are no previous reports that could confirm the phenomenon of interaction between MTAP and RB as well as explain the molecular mechanism of the fluorescence visible under UV illumination exhibited by the bacterial cells expressing *rsfp* gene. Follow-up studies of this discovery revealed that accumulation of the rhodamine B in *E. coli* cells expressing *rsfp* gene was a factor responsible for the pink fluorescence of the bacterial colony. The fluorescence microscopy technique revealed the presence of a strong red fluorescence of bacterial cells only in the case of the *E. coli* strain able to express the *rsfp* gene. Firstly, the *rsfp* gene was cloned into pBADMyHisA expression vector and the resulted recombinant plasmid was used for the *rsfp* gene expression in *E. coli* LMG194 cells. The RSFP protein was purified using the ion-exchange chromatography. The RB absorption and emission spectra in the presence and absence of RSFP were obtained. The interaction between RB and RSFP was also investigated with the fluorescence correlation spectroscopy experiments. The analysis of the results led to the conclusion that the presence of RB and RSFP protein is necessary for the observation of the fluorescence phenomenon. The RSFP protein interacts with RB molecule (-s) leading to the change of the spectroscopic properties of RB which is in turn responsible for the observed fluorescence phenomenon. The next step of the study was to confirm that RB molecules bind to the RSFP surface. The crystal structures of an apo RSFP protein and the RSFP/RB complex were obtained. The results of the crystallographic studies revealed that the native form of this protein is a trimer consisting of three identical subunits with one RB binding site in each monomer. Serine 22, Aspartic Acid 222 and Aspartic Acid 224 and Arginine 79 amino acids residues of RSFP play crucial role in the binding of RB to RSFP. The amino acids residues: Aspartic Acid 222 and 224 correspond to the proposed catalytic aspartic acids residues of a human methylthioadenosine phosphorylase. The study of the mutated variants of the RSFP protein linked the pink fluorescence phenomenon of RB interactions with RSFP via amino acids residues D222 and D224. The enzymatic activity of RSFP of methylthioadenosine phosphorylase was verified.

The *rsfp* gene can be used as a reporter gene in construction of promoter-trap vectors, as well as in fluorescence microscopy. The usefulness of *E. coli* cells expressing the *rsfp* gene as a biosensor in wastewater monitoring was also confirmed.

In summary, the existence of the connection between the RB molecules, the RSFP protein and the pink fluorescence phenomenon of the recombinant *E. coli* colonies expressing *rsfp* gene and growing on LB agar supplemented with RB was confirmed. It is worth stressing that the studies of the toxicity of RB have suggested that the interaction between dye molecules and proteins may be crucial for toxic properties of RB.

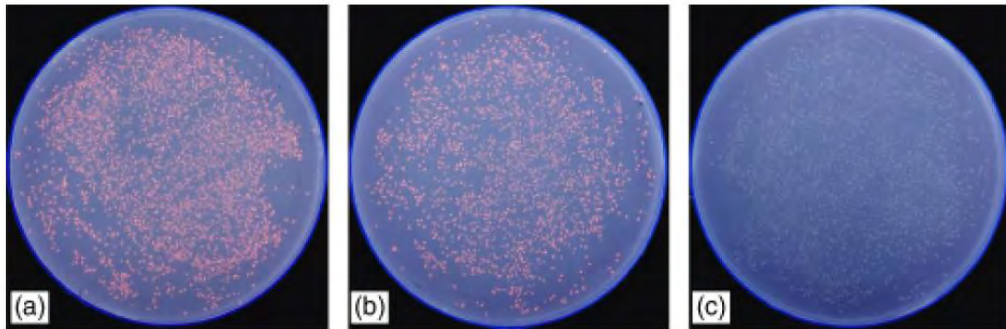
2. Wstęp

2.1. Izolacja genu *rsfp*

Gen *rsfp* został wyizolowany w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej w trakcie screeningu biblioteki metagenomowej w kierunku identyfikacji enzymów lipolitycznych aktywnych w niskich temperaturach (Cieśliński i wsp., 2009). Enzymy lipolityczne (acylohydrolazy triacylogliceroli; EC 3.1.1.3) przeprowadzają reakcję hydrolizy triglicerydów do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu (Gupta i wsp., 2003). Lipazy stanowią ważną grupę biokatalizatorów o znaczeniu przemysłowym, szczególnie ze względu na zdolności do katalizowania reakcji zarówno w środowisku wodnym jak i niewodnym.

Powszechnie stosowaną metodą w poszukiwaniu enzymów lipolitycznych jest hodowla mikroorganizmów na podłożu stałym zawierającym triglicerydy i rodaminę B (RB) (Kouker i Jaeger, 1987). Wokół kolonii bakteryjnych wykazujących zdolność rozkładu tłuszczów pojawia się pomarańczowe przejaśnienie, widoczne w świetle UV, wywołane fluorescencją cząsteczek rodminy B będących w kompleksie z wolnymi kwasami tłuszczowymi.

W Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej podczas poszukiwania adaptowanych do zimna lipaz do skonstruowania biblioteki DNA metagenomowego w *Escherichia coli* wykorzystano DNA wyizolowane z próbki ziemi pobranej w sąsiedztwie Polskiej Stacji Antarktycznej im. Henryka Arctowskiego na Wyspie Króla Jerzego. Próbka ta została pobrana z głębokości 0 – 5 cm z terenu kolonii pingwinów Adeli (*Pygoscelis adeliae*) (62°09'46''S, 58°27'42''W). W trakcie przeszukiwania uzyskanej biblioteki DNA metagenomowego, zaobserwowano, że jedna z kolonii bakteryjnych *E. coli* rosnących na podłożu agarowym z oliwą i rodaminą B wykazywała silną różową fluorescencję po oświetleniu jej światłem UV o długości fali 312 nm, przy jednoczesnym braku aktywności lipolitycznej. Z hodowli płynnej uzyskanej z posiewu bakterii z tej kolonii, wyizolowano plazmid biblioteczny, nazwany pPINK-uv. DNA tego plazmidu pozwoliło na uzyskanie sekwencji DNA znajdującego się w nim insertu DNA metagenomowego. Analiza tej sekwencji DNA ujawniła obecność w jej obrębie siedmiu potencjalnych otwartych ramek odczytu (ORF). Dalsze badania doprowadziły do ustalenia, że produkt ekspresji ORF4 badanego plazmidu jest odpowiedzialny za fluorescencję kolonii komórek *E. coli* niosących plazmid pPINK-uv (*E. coli*/pPINK-uv) rosnących na podłożu z rodaminą B (rys. 1) (Cieśliński i wsp., 2009).



Rys. 1. Fluorescencja kolonii *E. coli* w świetle UV ($\lambda_{exc} = 312 \text{ nm}$) na podłożu z RB: (a) *E. coli* TOP10F'/pPINK-uv, (b) *E. coli* TOP10F'/pUC19-ORF4, (c) *E. coli* TOP10F'/pUC19 (Cieśliński i wsp., 2009).

Analiza sekwencji aminokwasowej białka kodowanego przez ORF4 wykazała 93% podobieństwo do sekwencji aminokwasowej fosforylasy metylotioadenozyny (EC 2.4.2.28) szczepu *Psychrobacter arcticus* 273-4 (GenBank accession no. AAZ19006). Gen ORF4 został nazwany genem *rsfp*, jest to akronim utworzony z nazwy białka RSFP (ang. *rhodamine B sensitive fluorescent phosphorylase*) będącego produktem jego ekspresji (Cieśliński i wsp., 2009).

Podsumowując, w cytowanej wyżej pracy wykazano, że kluczowymi elementami dla powstawania fluorescencji kolonii *E. coli*/pPINK-uv są: rodamina B w podłożu, na którym rosną kolonie *E. coli* tworzące badaną bibliotekę metagenomową oraz obecność białka RSFP będącego produktem ekspresji genu *rsfp* obecnego w komórkach *E. coli* z tej kolonii. Jednak dokładna zależność pomiędzy powstającą fluorescencją kolonii bakteryjnych, genem *rsfp* i rodaminą B pozostawała nieznana. Po przeprowadzeniu analizy dostępnej literatury naukowej opublikowanej do roku 2009 stwierdzono brak jakichkolwiek doniesień o analogicznym odkryciu podczas stosowania metody z podłożem zawierającym rodaminę B w celu identyfikacji klonów o aktywności lipolitycznej w przebadanych bibliotekach metagenomowego lub genomowego DNA. W związku z powyższym w przedstawionej rozprawie doktorskiej podjęto się znalezienia odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy przyczyną obserwowanej fluorescencji kolonii *E. coli* jest oddziaływanie pomiędzy białkiem RSFP a cząsteczkami rodaminy B?
2. Jaka jest rola białka RSFP oraz cząsteczek rodaminy B w powstawaniu obserwowanej fluorescencji?
3. Czy białko RSFP, domniemana fosforylaza metylotioadenozyny (EC 2.4.2.28), posiada aktywność enzymatyczną charakterystyczną dla tego enzymu?
4. Czy można wykorzystać przedstawione odkrycie w sposób praktyczny?

2.2. Fosforylaza metylotioadenozyny

Analiza sekwencji aminokwasowej białka kodowanego przez gen *rsfp* wykazała 93% podobieństwo do sekwencji aminokwasowej fosforylazy metylotioadenozyny *Psychrobacter arcticus* 273-4. Poniższy rozdział przedstawia rolę tego enzymu w komórkach prokariotycznych, eukariotycznych oraz archeonów.

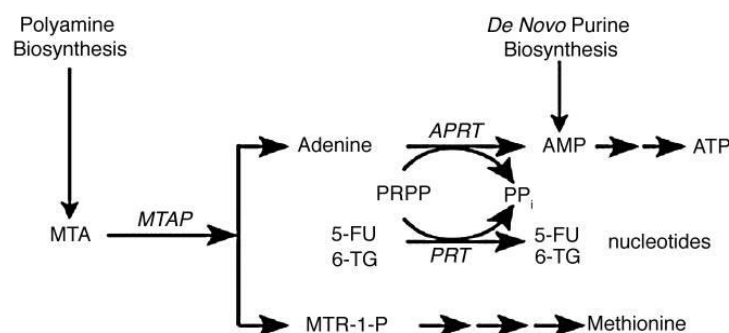
Podstawową rolą fosforylazy metylotioadenozyny w komórce jest udział w metabolizmie związków siarki. Siarka jest ważnym pierwiastkiem wykorzystywanym przez organizmy żywe i jest im niezbędna do życia, a ze względu na to, że charakteryzuje się wysoką reaktywnością i łatwością utlenienia, duże znaczenie dla komórki ma jej zatrzymanie i zachowanie w odpowiedniej formie (Sekowska i wsp., 2004). Asymilacja siarki przez organizmy żywe jest procesem bardzo skomplikowanym. W obecności tlenu związki siarki muszą przeniknąć ze środowiska do wnętrza komórki o ujemnym potencjale elektrycznym (-70 mV), a następnie ulec redukcji, co związane jest z kosztem energetycznym i koniecznością utrzymania wysokiego potencjału oksydacyjno – redukcyjnego (Sekowska i wsp., 2000). We wszystkich organizmach żywych obserwuje się mechanizmy służące do utrzymania odpowiedniej ilości siarki w formie różnych grup funkcyjnych oraz jej odzyskiwania i ponownego wykorzystania w syntezie niezbędnych dla komórki związków i struktur. Szlaki metaboliczne w których niezbędne są związki zawierające siarkę to m.in. synteza aminokwasów: cysteiny i metioniny, oraz synteza zawierających siarkę koenzymów i grup prostetycznych enzymów. Szczególnie ważnym procesem jest odzyskiwanie metioniny, ponieważ aminokwas ten niezbędny jest to zapoczątkowania syntezy wszystkich białek w komórce (Sekowska i wsp., 2000).

2.2.1. Szlak odzysku metioniny

Szlak odzysku metioniny jest uniwersalnym szlakiem metabolicznym zaangażowanym w przekształcanie związków chemicznych zawierających siarkę do aminokwasu – metioniny. Występuje on w komórkach wszystkich organizmów: bakterii, roślin i zwierząt (Albers, 2009). Kluczowym jego składnikiem jest MTA - metylotioadenozyna (5-deoksy-5-metyltio-adenozyna; adenino-9-β-D(5-deoksy-5metyltio) rybofuranozyd), w związku z czym szlak ten nazywany jest cyklem MTA lub, w przypadku metabolizmu roślinnego, cyklem Yang'a (Avila i wsp., 2004). Cykl MTA pozwala na transport wewnątrz komórki atomu siarki zawartego w metabolitach takich jak 5'-metylotioadenozyna (MTA) i S-adenozylhomocysteina (Albers, 2009, Sekowska i wsp., 2004).

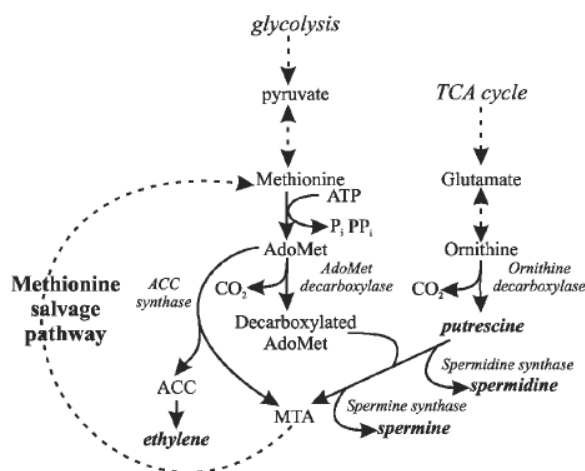
Uważa się, że cykl MTA wyewoluował, ponieważ bardziej korzystne dla komórki jest odzyskiwanie siarki ze związków już istniejących w komórce. Produkty uboczne powstające w reakcjach, w których bierze udział S-adenozylometionina (AdoMet), czyli MTA i S-adenozylhomocysteina, są przekształcane do metioniny. Ma to ogromne znaczenie dla organizmów żyjących w środowiskach ubogich w źródła biodostępnej siarki (Sekowska i wsp., 2000). Bakterie z rodzaju *Bacillus* oraz drożdże z rodzaju *Saccharomyces* posiadają funkcjonalny szlak odzysku metioniny (Pirkov i wsp., 2008). Z drugiej strony, bakterie *E. coli*, które żyją zazwyczaj w środowisku bogatym w siarkę i pozbawionym tlenu, nie posiadają funkcjonalnego szlaku odzysku metioniny. Jedynym enzymem tego szlaku obecnym w komórkach *E. coli* jest nukleozydaza MTA, co jest korzystne ze względu na możliwość uzyskania adeniny w przeprowadzanej przez ten enzym reakcji (Sekowska i wsp., 2000). U wyższych organizmów eukariotycznych, metionina jest aminokwasem podstawowym, który może stanowić jedyne źródło siarki i musi być dostarczona z pożywieniem. W związku z tym, ważnym aspektem dla życia tych organizmów staje się utrzymanie wysokiej puli metioniny wewnątrz komórek i posiadanie sprawnego szlaku odzysku metioniny (Albers, 2009).

Fosforylaza metylotioadenozyny (MTAP) jest jednym z kluczowych enzymów szlaku metabolicznego metioniny (rys. 2). Enzym ten uczestniczy w metabolizmie cząsteczek zawierających siarkę: S-adenozylhomocysteiny oraz 5'-deoksy-5'(metylotio)adenozyny (MTA). Poza kluczową rolę w cyklu MTA pełni także rolę w innych szlakach metabolicznych związanych z rolą S-adenozylometioniny w metabolizmie komórkowym (Sekowska i wsp., 2004).



Rys. 2. Rola MTAP w komórce. MTAP przecina cząsteczkę MTA będącą produktem ubocznym syntezy poliamin z wytworzeniem adeniny i metylotiorybozo 1-fosforanu (MTR1P). Adenina ulega przekształceniu do AMP, a MTR1P przekształcany jest do metioniny (Lubin i Lubin, 2009).

W komórce MTA jest produktem ubocznym powstającym podczas syntezy poliamin (sperminy i spermidyny) i zarazem cząsteczką regulatorową tego procesu. Powstaje z S-adenozylometioniny będącej produktem kondensacji metioniny i ATP (rys. 3).

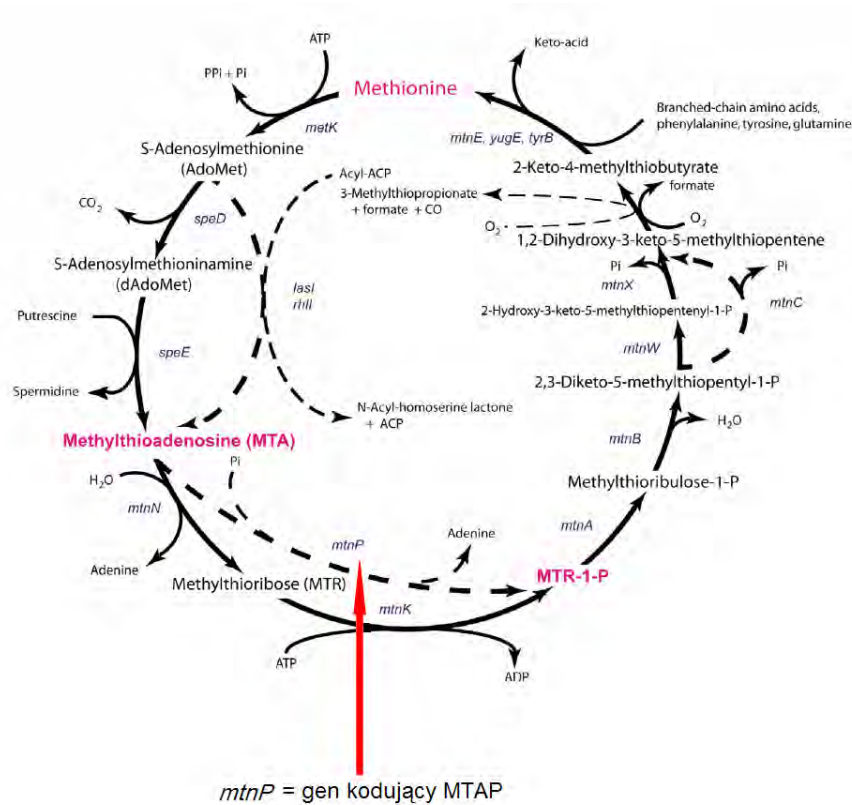


Rys. 3. Schemat szlaku powstawania metyloioadenozyny (MTA) w szlaku syntezy poliamin i etylenu (AdoMet – S-adenozylometionina; ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy; TCA – cykl kwasu cytrynowego) (Albers, 2009).

Innymi procesami prowadzącymi do powstania MTA w komórce są: wytwarzanie hormonu roślinnego – etylenu, powstawanie fitosideroforów (wykorzystywanych przez rośliny w absorpcji metali) oraz aktywność syntazy acylowanego laktonu homoseryny (cząsteczka sygnałowa zaangażowana w komunikowanie się komórek bakterii Gram-ujemnych). Preskursorem tych szlaków metabolicznych jest również S-adenozylometionina, która pełni ważną rolę jako donator grupy metylowej i jest kluczową cząsteczką regulatorową metabolizmu komórkowego, proliferacji i apoptozy. Cząsteczka S-adenozylometioniny uczestniczy w reakcjach metylacji DNA/RNA, potranslacyjnej modyfikacji białek oraz w procesach quorum sensing, zachodzących m.in. u bakterii *Vibrio fischerii* (Sekowska i wsp., 2004). Produkt uboczny metylacji, S-adeozylhomocysteina, jest również przekształcana do metioniny przez homocysteinę w cyklu metioniny. W komórkach drożdżowych, w których nie zachodzą wymienione wyżej procesy metaboliczne, MTA jest produktem ubocznym syntezy poliamin (Albers, 2009).

W szlaku odzysku metioniny, cząsteczki MTA, powstające w wyniku metabolizmu komórkowego, są przekształcane do metioniny (rys. 4). W pierwszym etapie procesu cząsteczka MTA jest przecinana i ulega fosforylacji tworząc 5–metylotiorybozo 1–fosforan (MTR1P). Etap ten przebiegać może jednostopniowo, jeśli katalizowany jest przez fosforylazę (MTAP) lub dwustopniowo, z wytworzeniem 5–metylotiorybozy (MTR), jeżeli katalizowany jest przez dwa enzymy: nukleozydazę i kinazę. MTAP wykazuje aktywność zarówno kinazy jak i nukleozydazy. Następnie cząsteczka MTR1P przekształcana jest do 5–metylotiorybulozo 1–fosforanu przez izomerazę. Enzymami zaangażowanymi w kolejne etapy cyklu są: dehydrataza, enolaza, fosfataza oraz dioksygenaza, a reakcje przez nie katalizowane prowadzą do powstania 4–metylotio–2–oksomaślanu (MTOB), która to cząsteczka jest zdeaminowaną formą

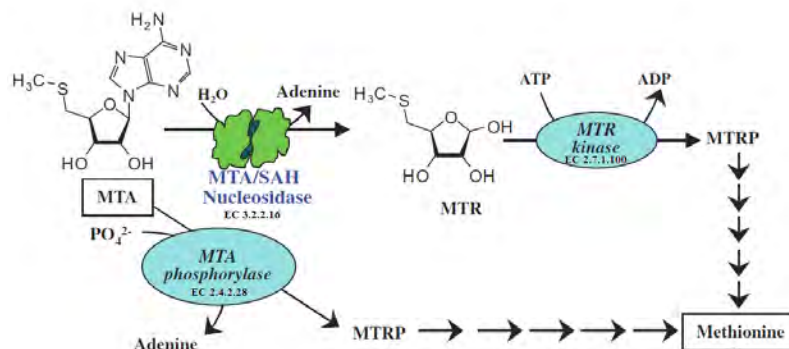
metioniny. W końcowym etapie tego cyklu transaminaza przekształca MTOB w cząsteczkę metioniny (Avila i wsp., 2004).



Rys. 4. Szlak metaboliczny metioniny w komórkach *B. subtilis* (linia ciągła). Inne warianty szlaku- linia przerywana (Sekowska i wsp., 2004).

2.2.1.1. Przekształcenie MTA w MTR1P

W komórkach eukariotycznych MTA jest bezpośrednio przekształcane do MTR1P. W komórkach bakteryjnych, pierwotniakach i niektórych komórkach roślinnych reakcja ta katalizowana jest przez dwa enzymy: nukleozydazę i kinazę (rys. 4 i 5). W komórkach niektórych bakterii, takich jak *Pseudomonas*, *Trypanosomes* i *Archea* reakcja przekształcenia MTA do MTR1P może także przebiegać jednoetapowo (Albers, 2009).



Rys. 5. Przekształcenie MTA do MTR i MTRP przez MTA fosforylazę lub MTA nukleozydazę i MTR-kinazę (Parveen i Cornell, 2011).

Fosforylaza MTA wykazuje znaczne podobieństwo do fosforylaz purynowych. Większość roślinnych nukleozydaz MTA jest specyficznych tylko wobec MTA, podczas gdy enzymy bakteryjne oraz izozymy z roślin z rodzaju *Arabidopsis* mogą z mniejszym powinowactwem wykorzystywać jako substrat także S-adenozylhomocysteinę. Aktywność nukleozydazy MTA pochodzącej z łubinu jest silnie hamowana obecnością produktu reakcji – adeniny, natomiast hamowanie katalizowanej przez ten enzym reakcji wywołanej obecnością MTR jest znacznie słabsze. Kinaza MTR należy do rodziny kinaz cholinowych/etanoloaminowych, w komórkach roślinnych obserwuje się tylko jeden izozym, z wyjątkiem komórek ryżu, gdzie występują dwa izozymy (Sekowska i wsp., 2001). Kinaza MTR nie występuje w komórkach *E. coli* oraz niektórych komórkach bakterii beztlenowych i z tego powodu mikroorganizmy te nie posiadają sprawnego szlaku odzysku metioniny (Sekowska i wsp., 2000; Sekowska i wsp., 2004).

2.2.1.2. Znaczenie cyklu MTA w komórkach eukariotycznych

Szlak odzysku metioniny w komórkach eukariotycznych ma wpływ na procesy nowotworzenia, apoptozę oraz odpowiedź immunologiczną. Wszystkie zdrowe komórki ssące zawierają MTAP, co pozwala na utrzymanie niskiego stężenia MTA (Lubin i Lubin, 2009). W komórkach nowotworowych nie obserwuje się aktywności fosforylazy MTA lub jest ona bardzo obniżona (Behrmann i wsp., 2003; Berasain i wsp., 2004; Marcé i wsp., 2006). Gen *MTAP* znajduje się na chromosomie 9p21 w sąsiedztwie genu supresorowego *CDKN2A*, który to region w procesie nowotworzenia ulega delecji lub hipermetylacji, co w obu przypadkach skutkuje brakiem ekspresji *MTAP* (Hellerbrand i wsp., 2006; Kim i wsp., 2011). Brak MTAP może mieć także wpływ na regulację dekarbonylasy ornitynowej, która w tych warunkach ulega nadekspresji, co zwiększa ryzyko nowotworzenia (Subhi i wsp., 2004).

W komórkach pozbawionych MTAP zablokowany jest cykl odzysku metioniny. Komórki te są bardziej wrażliwe od komórek ekspresujących gen *MTAP* na inhibitory syntezy puryn i na brak metioniny. Zjawisko to może zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej polegającej na leczeniu wysokimi dawkami toksycznych analogów puryn lub pirymidyn. W zdrowych komórkach adenina powstająca z MTA uniemożliwia przekształcenie analogu w toksyczny nukleotyd. W komórkach pozbawionych MTAP reakcja ta nie jest hamowana i komórki nowotworowe nie są w stanie przeżyć (Bertino i wsp., 2011). Cykl MTA pełni również ważną rolę w procesie apoptozy ponieważ MTA i MTOB są związkami wywołującymi ten proces (Avila i wsp., 2004). Może zostać to wykorzystane w leczeniu metionino-zależnych nowotworów przy użyciu leków hamujących aktywność transaminazy przekształcającej MTOB do metioniny (Quash i wsp., 2004).

2.2.2. Struktury krystaliczne znanych fosforylaz metyloadenozyny

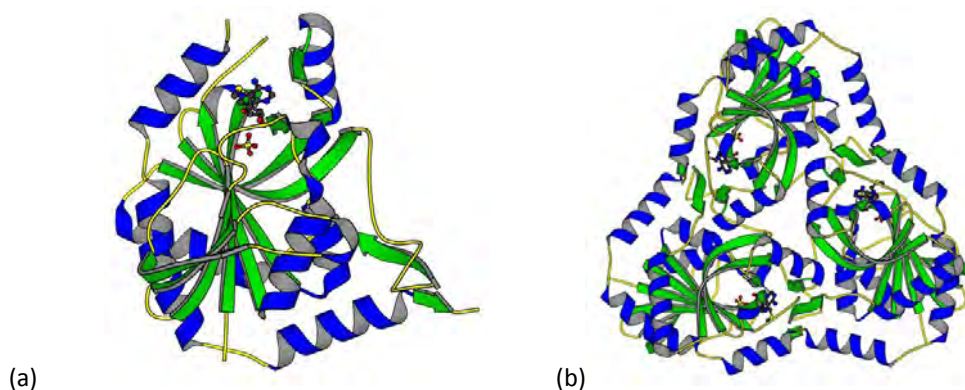
Ze względu na kluczowe znaczenie wyników badań krystalograficznych białka RSFP, przedstawionych w niniejszej pracy, w poniższym rozdziale przedstawiono opis opublikowanych wyników badań krystalograficznych fosforylaz metyloadenozyny.

2.2.2.1. Struktura krystaliczna ludzkiej MTAP

Sekwencja aminokwasowa ludzkiej fosforylasy metyloadenozyny (hMTAP) wykazuje 25–28% podobieństwa do ludzkiej fosforylasy nukleozydów purynowych (hPNP). PNP jest enzymem zaangażowanym w metabolizm puryn. Katalizuje on przerwanie wiązania glikozydowego w nukleozydach purynowych zachodzące z udziałem nieorganicznego ortofosforanu. W komórkach ssaków enzym ten odpowiedzialny jest za fosforolizę nukleozydów 6-oksopurynowych, guaniny i inozyny, natomiast hMTAP jako substrat wykorzystuje nukleozydy 6-aminopurynowe. Substrat dla enzymu ludzkiego stanowią także 5'-deoksyadenozyna oraz nukleozydy 6-aminopurynowe zawierające w pozycji 5' grupy halogenowe, haloalkilowe lub alkilotioloowe, nie wykazuje jednak aktywności wobec adenozyne lub jej analogów (Appleby i wsp., 1999).

Struktura czwartorzędowa hMTAP

Białko hMTAP zbudowane jest z trzech identycznych podjednostek. Na monomer tego białka składa się 286 reszt aminokwasowych tworzących struktury α -helisy i β -kartek. W centrum każdego monomeru znajduje się osiem β -nici. Kolejnych pięć β -nici tworzy drugą strukturę β -kartki. β -kartki otoczone są przez sześć α -helisy (rys. 6). Reszty aminokwasowe tworzące strukturę β -nici 11, β -nici 5, α -helisy 5 oraz sieć pętli biorą udział w tworzeniu centrum aktywnego enzymu (Appleby i wsp., 1999).

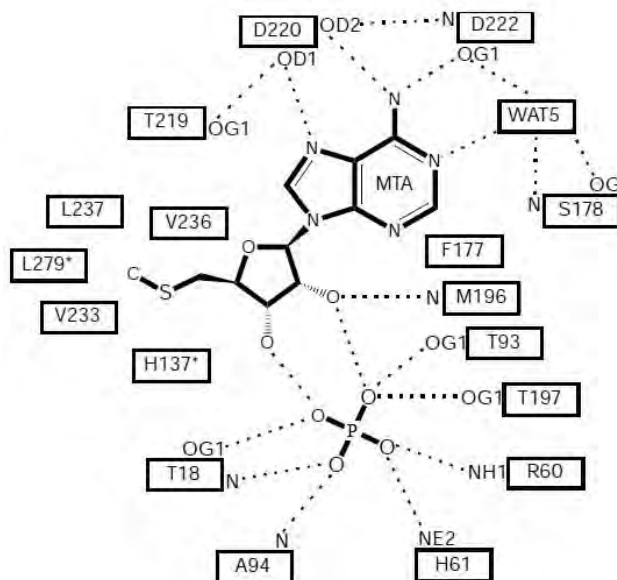


Rys. 6. (a) monomer białka hMTAP (b) trimer białka hMTAP – kolorem zielonym oznaczono β -nici, kolorem granatowym – α -helisy; w górnej części monomeru znajduje się model szkieletowo-kulkowy substratu (źródło rysunku: materiały grupy badawczej „Steve Ealick's Research Group”, Cornell University, USA).

Na końcu C białka hMTAP występuje α -helisa, która w trimerze znajduje się w pobliżu kieszeni hydrofobowej centrum aktywnego sąsiadującego monomeru. W oddziaływanie pomiędzy sąsiadującymi monomerami zaangażowane są reszty aminokwasowe wchodzące w skład β -nici 7 oraz pętli łączącej tę nić z α -helisą 2 drugiej podjednostki oraz reszty aminokwasowe tworzące α -helisę 3 i pętlę łączącą β -nić 9 z α -helisą 3 drugiego monomeru. Bezpośrednie oddziaływania pomiędzy monomerami zachodzą pomiędzy trzema resztami Trp189 oraz poprzez sieć wiązań wodorowych w których udział biorą reszty Thr118 (Appleby i wsp., 1999).

Centrum aktywne hMTAP

Centrum aktywne każdego monomeru hMTAP zlokalizowane jest w przestrzeni pomiędzy sąsiadującymi podjednostkami i zbudowane jest w całości z reszt aminokwasowych wchodzących w skład tego monomeru, jedynie reszty His137 oraz Leu279 pochodzą z sąsiedniej podjednostki. Pomiędzy zasadą adeninową a atomami reszt aminokwasowych białka dochodzi do utworzenia wiązań wodorowych, co umożliwia związanie substratu w centrum aktywnym i specyficzność substratową enzymu. W centrum aktywnym hMTAP można wyróżnić trzy regiony odpowiadające miejscom wiązania zasady purynowej, metylotrybozy oraz reszty fosforanowej. Rysunek 7 przedstawia położenie ligandów i odpowiednich reszt aminokwasowych hMTAP (Appleby i wsp., 1999).



Rys. 7. Centrum aktywne hMTAP. Gwiazdką oznaczono reszty aminokwasowe pochodzące z sąsiedniego monomeru. Linią przerywaną oznaczono możliwe wiązania wodorowe białko – białko oraz białko – ligand (zmodyfikowany rys. z Appleby i wsp., 1999).

Wiązanie zasady purynowej w centrum aktywnym hMTAP

W wiązanie pierścienia purynowego zaangażowane są reszty aminokwasowe Phe177, Ser178, Asp220, Asp222 oraz cząsteczka wody. Wiązania wodorowe zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi białka i ligandem zapewniają specyficzność substratową enzymu wobec nukleozydów 6-aminopurynowych. Po sprotonowaniu reszty Asp220 możliwe jest utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu Asp220 i atomem N7 adeniny. Reszta Asp220 może także tworzyć wiązania wodorowe z atomem N6 adeniny i atomem azotu Asp222. Reszta Asp222 zdolna jest do utworzenia wiązania wodorowego z atomem N6 adeniny i udziału w tworzeniu sieci takich wiązań z cząsteczką wody, atomem tlenu reszty Ser178 oraz atomem azotu Ser178. Taki układ wiązań pozwala na zatrzymanie cząsteczki wody i zorientowanie jej w odpowiednim kierunku tak, aby możliwe było utworzenie wiązania wodorowego z nieprotonowanym atomem N1 adeniny. Płaszczyzna grupy fenylowej reszty aminokwasowej Phe177 oddziałuje ze znajdującą się prostopadle do niej płaszczyzną pierścienia purynowego. Reszta Asp222 wydaje się pełnić ważną rolę w specyficzności substratowej, ponieważ może brać udział w tworzeniu wiązania wodorowego z atomem N7 i N6 adeniny (Appleby i wsp., 1999).

Wiązanie metylotioribozy w centrum aktywnym hMTAP

Reszty Met196, Val233, Val236 i Leu237 jednego monomeru hMTAP oraz reszty His237 i Leu279 sąsiadującego monomeru zaangażowane są w wiązanie fragmentu metylotioribozy cząsteczki MTA w centrum aktywnym hMTAP. W miejscu tym dochodzi do wytworzenia jednego wiązania wodorowego pomiędzy atomem azotu reszty aminokwasowej Met196 i grupą hydroksylową pierścienia rybozy. Reszty Val233, Val236, Leu237 i Leu279 biorą udział w powstaniu kieszeni hydrofobowej zlokalizowanej w pobliżu grupy 5'-metylotio MTA. W oddziaływaniu tym bierze udział także pierścień imidazolowy His137 sąsiedniego monomeru poprzez utworzenie oddziaływań van der Waals'a z pierścieniem rybozy oraz wiązania wodorowego z cząsteczką wody, którą jednocześnie związana jest w taki sam sposób z resztą His65 sąsiadującego monomeru (Appleby i wsp., 1999).

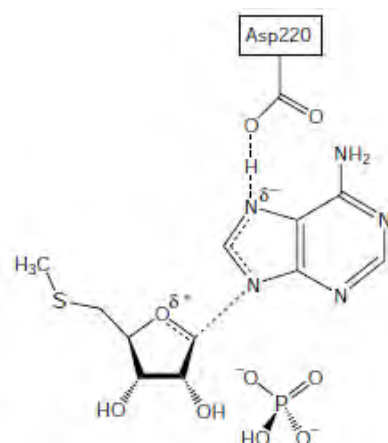
Wiązanie reszty ortofosforanowej w centrum aktywnym hMTAP

W centrum aktywnym hMTAP jon fosforanowy znajduje się naprzeciwko pierścienia rybozy MTA. Kieszeń wiążąca resztę fosforanową składa się z reszt aminokwasowych Thr18, Arg60, His61, Thr93, Ala94 i Thr197. Dodatnio naładowana grupa guanidynowa Arg60 zapewnia oddziaływanie jonowe z ujemnie naładowaną resztą fosforanową. Dodatkowo atomy tlenu Thr18, Thr93 i Thr197 oraz atom azotu His61 tworzą wiązania wodorowe z atomami

tlenu reszty fosforanowej. Atomy azotu wiązania amidowego Thr18 i Ala94 także oddziałują z jednym z atomów tlenu reszty fosforanowej poprzez wytworzenie wiązań wodorowych. Łańcuch boczny Thr18 ulega prawdopodobnie zmianie konformacyjnej podczas wiązania fosforanu w centrum aktywnym (Appleby i wsp., 1999).

Przebieg reakcji katalizowanej przez hMTAP

Mechanizm reakcji przeprowadzanej przez hMTAP opracowano na podstawie podobieństwa funkcji i struktury hMTAP do hPNP. Reakcja katalizowana przez hPNP należy do reakcji typu SN1, gdzie najpierw dochodzi do przecięcia wiązania glikozydowego i utworzenia karbokationu. Po ustabilizowaniu karbokationu dochodzi w tym miejscu do ataku ujemnie naładowanego atomu tlenu grupy fosforanowej. Na podstawie wyników badań krystalograficznych stwierdzono, że grupa karboksamidowa Asn243 hPNP znajduje się w odpowiednim miejscu do ustabilizowania stanu przejściowego reakcji poprzez utworzenie wiązania wodorowego z atomem N7 puryny. W enzymie hMTAP tej reszcie aminokwasowej odpowiada reszta Asp222. Układ reszt Glu89, His86 i jonu fosforanowego obserwowany w centrum katalitycznym hPNP wykazuje duże podobieństwo do triady katalitycznej obecnej w proteazach serynowych. Układ ten może powodować wzrost nukleofilowości reszty fosforanowej. Reszta His61 hMTAP pełni tę samą funkcję co reszta His86 hPNP. Podobieństwo strukturalne MTAP do PNP sugeruje, że reakcja katalizowana przez hMTAP przebiegać może według tego samego mechanizmu. Wiązanie glikozydowe nukleozydu wiązanego w centrum aktywnym enzymu znajduje się w konformacji antyklinalnej o wysokiej energii, gdzie pierścień rybozy wykazuje rzadko spotykaną konformację C4-*endo*. Taki stan konformacyjny jest wysokoenergetyczny i powoduje powstanie naprężeń sterycznych, co ułatwia przecięcie wiązania glikozydowego. Wiązanie glikozydowe jest następnie osłabione poprzez przepływ elektronów z pierścienia rybozy do pierścienia purynowego, co skutkuje powstaniem karbokationu stabilizowanego przez ujemny ładunek jonu fosforanowego (Pugmire i Ealick, 2002). Jon fosforanowy zostaje związany w hMTAP naprzeciwko pierścienia rybozy i dlatego może brać udział w stabilizacji karbokationu. Zmiana konformacyjna hMTAP w trakcie reakcji powoduje zbliżenie tlenu jonu fosforanowego do atomu C1 nukleozydu i umożliwia w ten sposób atak nukleofilowy. Jeżeli reszta Asp220 hMTAP jest sprotonowana może ona sprotonować atom N7 puryny, co pozwala na zneutralizowanie ładunku ujemnego powstającego podczas przecięcia wiązania glikozydowego (rys. 8). Wiązanie wodorowe wytworzone pomiędzy atomem tlenu Asp220 i atomem azotu Asp222 może pełnić ważną rolę w odpowiednim ułożeniu łańcucha bocznego Asp220 tak, że znajduje się on w dogodnej pozycji do sprotonowania atomu N7 puryny (Appleby i wsp., 1999).



Rys. 8. Proponowany stan przejściowy reakcji katalizowanej przez hMTAP (Appleby i wsp., 1999).

2.2.2.2. Struktura krystaliczna MTAP *Sulfolobus solfataricus*

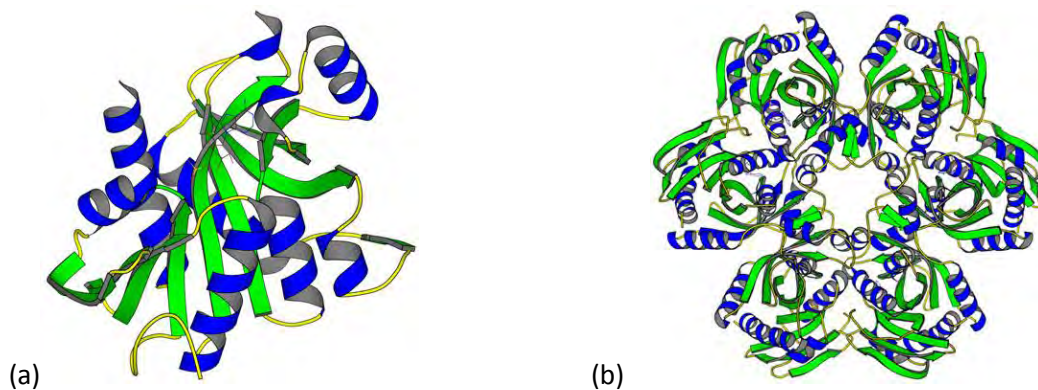
Z hipertermofilnego archeona *Sulfolobus solfataricus* zostały wyizolowane i scharakteryzowane dwa enzymy MTAP: SsMTAP oraz SsMTAPII. Pomimo, że enzymy te katalizują tę samą reakcję, różnią się budową strukturalną (Appleby i wsp., 2001).

2.2.2.2.1. SsMTAP

Jako substrat enzym SsMTAP wykorzystać może inozynę, guanozynę, adenozynę oraz MTA. Maksymalną aktywność enzym ten wykazuje w temperaturze 120°C. Zaliczany jest do enzymów termostabilnych, zachowuje aktywność nawet po 2 h inkubacji w 100°C. Ponadto, pozostaje stabilny nawet w obecności czynników denaturujących, detergentów i rozpuszczalników organicznych (Appleby i wsp., 2001).

Struktura czwartorzędowa SsMTAP

Struktura monomeru SsMTAP jest bardzo podobna do struktury monomeru PNP *E. coli*. W centrum monomeru znajduje się ośmiem β -nici. Utworzona tak struktura β -kartki otoczona jest siedmioma α -helisami (rys. 9a). SsMTAP jest heksamerem składającym się z sześciu identycznych podjednostek o masie 27 kDa każda. Strukturę tę można opisać jako trimer dimerów połączonych ze sobą trzema mostkami disiarczkowymi (Rys. 9b). W heksamerze SsMTAP występuje sześć centrów aktywnych. Każdy monomer enzymu posiada miejsce aktywne do którego utworzenia dochodzi w przestrzeni pomiędzy dwiema sąsiadującymi podjednostkami enzymu (Appleby i wsp., 2001).



Rys. 9. (a) Monomer białka SsMTAP (b) Heksamer białka SsMTAP. Kolorem zielonym oznaczono β -nici, kolorem granatowym α -helisy (źródło rysunku: materiały grupy badawczej „Steve Ealick's Research Group”, Cornell University, USA).

Utworzenie dimerów SsMTAP zachodzi poprzez oddziaływanie α -helisy 2, α -helisy 3 oraz trzech pętli. Dimery te tworzą heksamer poprzez oddziaływania zachodzące pomiędzy resztami aminokwasowymi β -nici 6, α -helisy 3, α -helisy 4, β -nici 7 oraz trzech pętli. Struktura stabilizowana jest poprzez mostki disiarczkowe występujące pomiędzy resztami Cys125 sąsiednich monomerów znajdującymi się w pętli pomiędzy α -helisą 3 i α -helisą 4 w pobliżu centrum heksameru (Appleby i wsp., 2001).

Po związaniu nukleozydu przez SsMTAP pętla łącząca β -nić 7 z α -helisą 5 (reszty aminokwasowe 162 – 166) ulega przekształceniu w helisę 3_{10} . Dzięki temu reszta aminokwasowa Glu163 przesuwają się w pozycję, w której może oddziaływać z zasadą purynową substratu (Appleby i wsp., 2001).

Centrum aktywne SsMTAP

Centrum aktywne SsMTAP znajduje się w przestrzeni pomiędzy dimerami, jest ono łatwiej dostępne dla substratów enzymu niż centrum aktywne np. hMTAP będącej trimerem. Reszty aminokwasowe tworzące szczelinę katalityczną to Gly21, Arg25, Ile64, Arg86, Thr89, Thr90, Gly91, Phe160, Glu163, Val179, Glu180, Met181, Glu182, Ser204, Asp205 jednego monomeru oraz Val4, His5, i Arg43 sąsiadującej podjednostki. Miejsce aktywne SsMTAP podzielić można na trzy regiony: miejsce wiązania zasady purynowej, miejsce wiązania metylotyribozy i miejsce wiązania jonu fosforanowego (Appleby i wsp., 2001).

Wiązanie zasady purynowej w centrum aktywnym SsMTAP

W wiązaniu zasady purynowej w centrum aktywnym SsMTAP biorą udział reszty aminokwasowe Phe160, Glu163, Val179, Met181, Ser204 i Asp205. Dochodzi do wytworzenia wielu oddziaływań hydrofobowych pomiędzy resztami aminokwasowymi β -nici 5 i 8, które przechodzą przez centrum miejsca wiązania puryny. Wiązania wodorowe łączą resztę Glu163

(po sprotonowaniu) z atomem N1 i C2 zasady purynowej oraz grupę karboksylową reszty Asp205 i atom N7 zasady purynowej. Mostki wodorowe powstają także pomiędzy Asp205 i Ser204, co umożliwia sprotonowanie atomu N7 nukleozydu. Płaszczyzna reszty aminokwasowej Phe160 znajduje się prostopadle do płaszczyzny pierścienia purynowego, co umożliwia im wzajemne oddziaływanie. Reszta Met181 oddziałuje z zasadą purynową, resztą Phe160 oraz rybozą (Appleby i wsp., 2001).

Wiązanie metylotioribozy w centrum aktywnym SsMTAP

W wiązaniu reszty metylotioribozy biorą udział reszty aminokwasowe Ile64, Thr89, Phe160, Met181 i Glu182 jednego monomeru oraz Val4, His5 i Arg43 sąsiedniego monomeru. Dochodzi do wytworzenia wiązań wodorowych pomiędzy resztą Glu182 i grupą 2' hydroksylową pierścienia rybozy. Reszta Thr89 zapewnia oddziaływania hydrofobowe pomiędzy grupą 5'-metylotio MTA z białkiem. Pierścień rybozy po związaniu wykazuje konformację anyklynalną, o wysokiej energii. Taka struktura centrum aktywnego umożliwia atak nukleofilowy jonu fosforanowego na atom C1 nukleozydu (Appleby i wsp., 2001).

Wiązanie reszty ortofosforanowej w centrum aktywnym SsMTAP

Reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie jonu fosforanowego poprzez sieć wiązań wodorowych to Gly21, Arg25, Thr89 i Arg86 jednego monomeru oraz Arg43 sąsiedniego monomeru. Grupy hydroksylowe 2' i 3' pierścienia rybozy tworzą wiązania wodorowe z atomami tlenu reszty fosforanowej. Reszta Arg25 oddziałuje z dwoma atomami tlenu jonu fosforanowego. Tlen grupy karbonylowej Ile64 związany jest wiązaniem wodorowym z cząsteczką wody, umożliwiając jej w ten sposób utworzenie wiązania wodorowego z resztą fosforanową (Appleby i wsp., 2001).

Przebieg reakcji katalizowanej przez SsMTAP

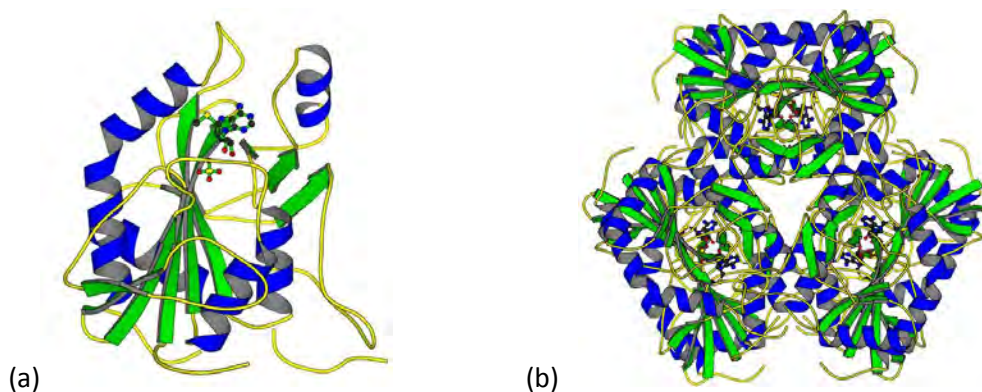
Pierwszym etapem reakcji jest osłabienie wiązania glikozydowego MTA wynikające z dużych naprężeń torsyjnych wokół tego wiązania. Następuje sprotonowanie atomu C1 pierścienia rybozy. W stanie przejściowym reakcji ładunek ujemny stabilizowany jest przez sieć wiązań wodorowych. Ulega on akumulacji na atomie N7 pierścienia purynowego, gdzie reszta Asp205 może utworzyć wiązanie wodorowe w celu zrównoważenia tego ładunku. Reszta Asp205 oddziałuje z grupą aminową puryny, a także resztą Ser204. Stan przejściowy reakcji stabilizowany jest dodatkowo przez cząsteczki wody oddziałujące z atomem N7 puryny i O6 rybozy (Appleby i wsp., 2001).

2.2.2.2. SsMTAPII

Enzym SsMTAPII jest wyjątkowo termostabilny, a jego optymalna temperatura działania wynosi 120°C. Odporny jest na działanie SDS i chlorowodoru guanidyny. W regionie C końcowym SsMTAPII znajduje się miejsce rozpoznania dla proteazy, jednak obecność substratu – MTA - zabezpiecza to miejsce przed degradacją (Zhang i wsp., 2006).

Struktura czwartorzędowa SsMTAPII

SsMTAPII jest utworzonym przez dimeryzację trimerów homoheksamerem, którego monomer ma masę 30 kDa (rys. 10b). W centrum monomeru tego białka znajduje się osiem β -nici tworzących β -karkę. Strukturę drugiej, małej β -karkki formuje pięć β -nici. Struktura β -beczki powstająca z tych dwóch β -karek otoczona jest przez 5 α -helisy (rys. 10a) (Zhang i wsp., 2006).



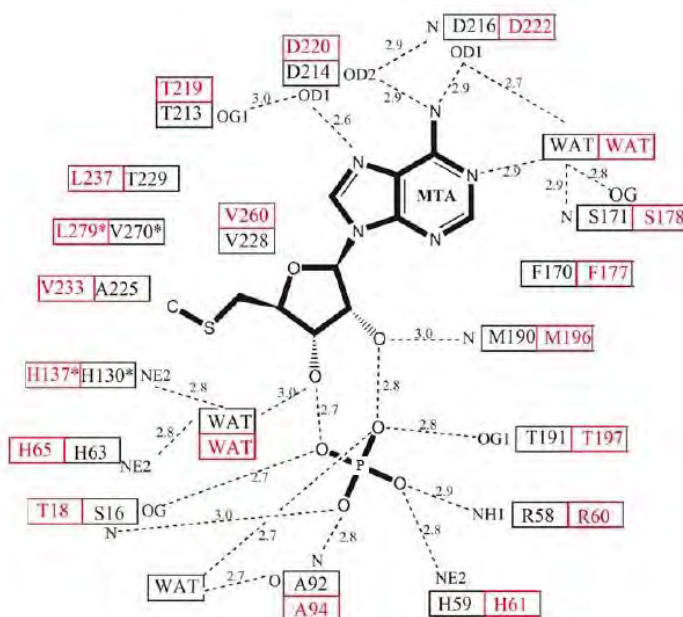
Rys. 10. (a) Monomer białka SsMTAPII – kolorem zielonym oznaczono β -nici, kolorem granatowym – α -helisy; (b) dimer trimerów białka SsMTAPII (źródło rysunku: materiały grupy badawczej „Steve Ealick’s Research Group”, Cornell University, USA).

Do utworzenia heksameru SsMTAPII niezbędne jest oddziaływanie pomiędzy pętlą N końcową oraz pętlą łączącą β -nić 2 i β -nić 3 jednego monomeru oraz pomiędzy pętlą C końcową i pętlami łączącymi β -nić 7 i α -helisę 2 oraz β -nić 4 i α -helisę 1 sąsiedniego monomeru. Oddziaływania te mają charakter hydrofobowy, wzmocnienie ich możliwe jest poprzez utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy atomami azotu Arg64 dimerów. Ten sam atom azotu tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu Glu38 sąsiedniej podjednostki. W oddziaływanie pomiędzy trimerami zaangażowane są: β -nić 7 i pętla łącząca tę β -nić z α -helisą 2 jednej podjednostki oraz α -helisa 3, pętla łącząca β -nić 9 i α -helisę 3 i pętla łącząca β -nić 4 i α -helisę 1 drugiej podjednostki (Zhang i wsp., 2006).

W każdym monomerze MTAPII znajduje się siedem reszt cysteiny. Cztery z nich tworzą dwie pary wiązań disiarczkowych wewnątrz podjednostek w pobliżu końca C białka. Kolejne wiązanie zachodzi pomiędzy resztami Cys138 i Cys205 oraz Cys200 i Cys262 (Zhang i wsp., 2006).

Centrum aktywne SsMTAPII

W cząsteczce SsMTAP znajduje się sześć centrów aktywnych, które zlokalizowane są w przestrzeni pomiędzy poszczególnymi podjednostkami w trimerze. Nie znajdują się one jednak, tak jak w SsMTAP, w pobliżu centrum heksameru. Kieszeń katalityczna otoczona jest przez α -helisę 5, pętlę łączącą β -nić 9 i α -helisę 3 oraz pętlę pomiędzy β -nicią 7 i α -helisą 7 sąsiedniego monomeru (Zhang i wsp., 2006). Rysunek 11 przedstawia położenie ligandów i odpowiednich reszt aminokwasowych hMTAP.



Rys. 11. Centrum aktywne SsMTAPII. W ramce koloru czarnego – reszta aminokwasowa SsMTAPII, w ramce koloru czerwonego – reszta aminokwasowa hMTAP. Gwiazdką oznaczono reszty aminokwasowe pochodzące z sąsiedniego monomeru. Liniją przerywaną oznaczono możliwe wiązania wodorowe białko – białko oraz białko – ligand (zmodyfikowany rysunek z Zhang i wsp., 2006).

Wiązanie zasady purynowej w centrum aktywnym SsMTAPII

MTA związane jest w centrum aktywnym znajdując się w rzadko spotkanej konformacji *O4'-endo* o dużym kącie torsyjnym. Wiązanie zasady purynowej zachodzi poprzez sieć wiązań wodorowych pomiędzy enzymem a ligandem. Atom N7 adeniny tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu Asp214, który z kolei bierze udział w wiązaniu wodorowym z grupą hydroksylową Thr213. Drugi atom tlenu Asp214 jest akceptorem wiązań wodorowych tworzonych z atomem N6 adeniny oraz atomem azotu głównego łańcucha reszty Asp216. Łańcuch boczny Asp216 może oddziaływać z atomem N6 adeniny i grupą hydroksylową Ser171, atomem amidowym azotu Ser171 i cząsteczką wody poprzez mostki wodorowe. Cząsteczka wody jest donorem wiązania wodorowego dla atomu N1 adeniny. Pierścień adeniny jest stabilizowany poprzez oddziaływanie z pierścieniem aromatycznym Phe170 (Zhang i wsp., 2006).

Wiązanie metylotioribozy w centrum aktywnym SsMTAPII

Region wiążący 5'-metylotioribozę składa się z reszt Val228, Ala225, Thr229, His63, Ser16 jednego monomeru oraz His130 i Val270 sąsiadującego monomeru. W przeciwieństwie do rozbudowanej sieci wiązań wodorowych w regionie centrum aktywnego wiążącym pierścień purynowy, w regionie wiązania metylotioribozy obserwuje się jedynie dwa wiązania wodorowe, występujące pomiędzy grupą 2' hydroksylową i azotem amidowym Met190 oraz pomiędzy cząsteczką wody i grupą 3' hydroksylową rybozy, atomem azotu His63 oraz His130 sąsiadującego monomeru. Dodatkowo grupy hydroksylowe rybozy oddziałują z atomami tlenu jonu fosforanowego (Zhang i wsp., 2006).

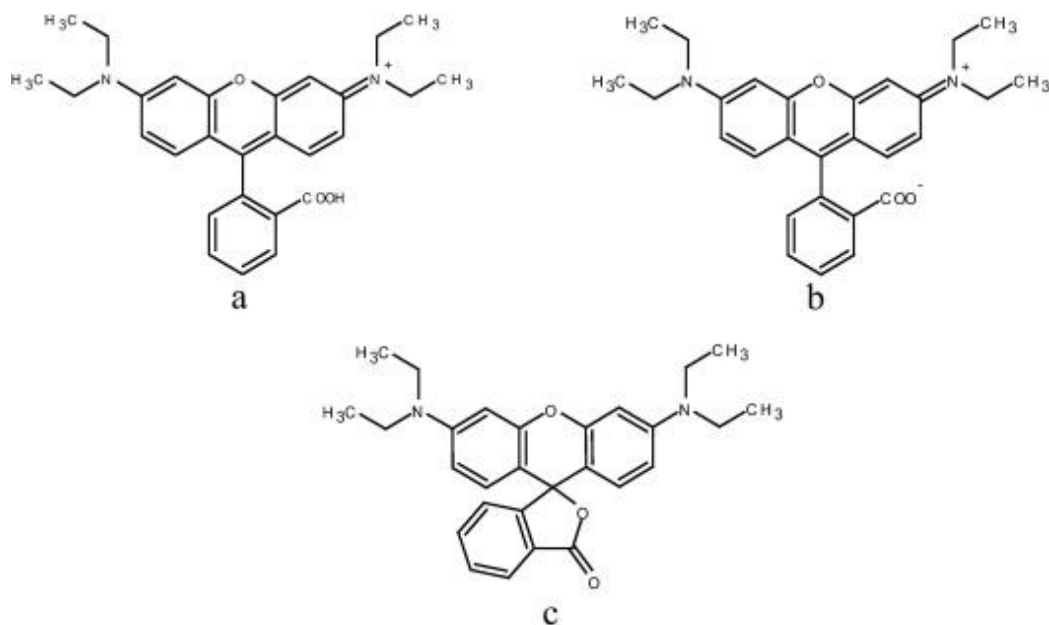
Wiązanie reszty ortofosforanowej w centrum aktywnym SsMTAPII

Miejsce wiązania jonu fosforanowego budowane jest przez reszty aminokwasowe Thr191, Arg58, His59, Ser16 i Ala92. Atom tlenu reszty Ser16, atom azotu His59, atom azotu Arg58 i atom tlenu Thr191 biorą udział w tworzeniu wiązań wodorowych z atomami tlenu jonu fosforanowego. Dodatkowo, atomu azotu w wiązaniu amidowym reszt Ser16 i Ala92 oddziałuje poprzez wiązanie wodorowe z atomem tlenu reszty fosforanowej. Wiązania wodorowe łączą także grupy 2' i 3' hydroksylowe rybozy z atomami tlenu jonu fosforanowego. Grupa 2' hydroksylowa rybozy jest także akceptorem wiązania wodorowego tworzonego z cząsteczką wody, która z kolei w taki sam sposób oddziałuje z azotem amidowym Ala92 (Zhang i wsp., 2006).

2.3. Rodamina B

Do powstania widocznego w świetle UV zjawiska fluorescencji komórek *E. coli* ekspresyjujących gen *rsfp* (2.1) niezbędna jest obecność w podłożu wzrostowym rodminy B. W związku z tym, w poniższym rozdziale przedstawiono charakterystykę rodminy B oraz jej najważniejsze właściwości fizykochemiczne, zagadnienia związane z toksycznością tego związku oraz praktycznym zastosowaniem jako barwnika ksantenowego w przemyśle i badaniach naukowych.

Strukturę cząsteczki rodminy B (UPAC: chlorek [9-(2-karboksyfenilo)-6-(dietylamino)ksanten-3-ylideno]-dietylazaniowy) przedstawia rysunek 12.



Rys. 12. Struktura cząsteczki RB: (a) kation, (b) jon obojnaczy, (c) lakton (Sagoo i Jockusch, 2011).

Rodamina B (RB) jest barwnikiem fluorescencyjnym, często stosowanym w badaniach biologicznych, także wykonywanych na żywych organizmach, ponieważ łatwo ulega akumulacji we włosach, pazurach i zębach zwierząt (Lindsey, 1983; Blanco i wsp., 2006). Barwnik ten znajduje również zastosowanie w badaniach histologicznych i patologicznych np. w wybarwianiu komórek wątroby lub płuc (Wessely i wsp., 1981; Shapiro i Wessely, 1988). W mikrobiologii wykorzystuje się RB m.in. w wybarwianiu *Mycobacterium tuberculosis* (Truant i wsp., 1962) lub *Listeria monocytogenes* (Whitehead i wsp., 2009). Szerokie zastosowanie RB wynika z wysokiej fotostabilności i czerwonej fluorescencji łatwej do obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym (Shakir i wsp., 2010; Burghardt i wsp., 1996). RB używana jest także w badaniach fotochemicznych, np. w badaniach nad analizą spektrofotometryczną uranu

(Shakir i wsp., 2010). Ponadto, barwnik ten jest wykorzystywany w przemyśle chemicznym, tekstylnym, papierniczym i farbiarskim (Namasivayam i wsp., 2001; Shakir i wsp., 2010).

Rodamina B jest szkodliwa dla ludzi i zwierząt, powoduje podrażnienia skóry, oczu i układu oddechowego. Badania wskazują, że RB jest związkiem o działaniu rakotwórczym i neurotoksycznym (Jain i wsp., 2007). Jedne z pierwszych doniesień o rakotwórczych właściwościach RB pochodzą z lat siedemdziesiątych (IARC, 1978). W związku z tym, zabronione jest wykorzystywanie RB jako barwnika w produktach spożywczych. Z powodu doniesień o szkodliwym wpływie na RB na proliferację ludzkich fibroblastów, barwnik ten nie może być stosowany także w kosmetykach (Kaji i wsp., 1991a; Kaji i wsp., 1991b; Kaji i wsp., 1992). Jednakże, pomimo tego zakazu, odnotowywano przypadki obecności RB w niektórych kosmetykach (Wang i wsp., 2008; Soylak i wsp., 2011). Wykryto także przypadki użycia RB w produktach spożywczych np. przyprawach, przetworach warzywnych i mącznych (Oplatowska i Elliott, 2011).

Wzrastające zapotrzebowanie przemysłu na rodaminę B, trudności z usuwaniem pozostałości barwnika ze ścieków oraz incydenty wykorzystywania go w żywności i kosmetykach, wyjaśniają obserwowany w ostatnich latach wzrost zainteresowania mechanizmem toksyczności RB. Opisane do tej pory badania wskazują, że u podstaw szkodliwego wpływu na komórki żywe RB leży zdolność barwnika do interakcji z białkami (Ju i wsp., 2008). Brakuje jednak doniesień opisujących dokładny mechanizm oddziaływania RB z enzymami i innymi białkami kluczowymi dla metabolizmu komórkowego, mogących wyjaśnić istotę toksyczności. Zaobserwowano zdolność RB do wiązania się z albuminą surowicy bydlęcej (Cai i wsp., 2010; Zhu i wsp., 2009). Opisane w wymienionych pracach wyniki wskazują na wiązanie RB do BSA i wywołane w ten sposób zmiany we właściwościach spektrofotometrycznych RB i białka, bez podania mechanizmu tego oddziaływania.

Z powodu licznych zastosowań, rodamina B stanowi składnik ścieków przemysłowych oraz powstających w laboratoriach chemicznych i biologicznych. Przed uwolnieniem ścieków do środowiska, muszą one zostać pozbawione RB. Jednak z powodu wysokiej stabilności cząsteczki RB, jej usuwanie metodami tradycyjnymi, takimi jak oksydacja, ozonowanie, dekompozycja fotokatalityczna, separacja membranowa, koagulacja i flokulacja, jest nieskuteczne. Z tego faktu wynika wzrastające zainteresowanie nowymi technologiami oczyszczania ścieków z RB, opartymi głównie na adsorpcji i biosorpcji (Das i wsp., 2006; Hii i wsp., 2009; Ju i wsp., 2008).

2.3.1. Właściwości spektralne rodaminy B

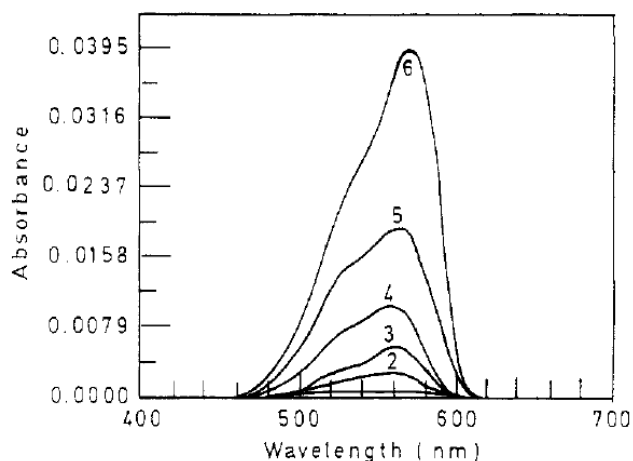
Widmo absorpcyjne rodaminy B zależne jest od właściwości rozpuszczalnika, w którym barwnik się znajduje. W etanolu maksimum absorpcji RB obserwuje się przy 543 nm, a w wodzie przy 554 nm (Kemnitz i wsp., 1986). Wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika (metanol, DMSO) dochodzi do przesunięcia maksimum emisji w stronę fal dłuższych, co wynika z protonacji cząsteczki RB. W rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak np. benzen, cykloheksan, dochodzi do wytworzenia formy laktonowej RB i przesunięcia maksimum absorpcji w kierunku fal krótszych (El-Rayyes i wsp., 2005). W rozpuszczalnikach polarnych RB występuje w formie kationu oraz jonu obojnaczego, które mogą oddziaływać ze sobą tworząc dimery. Dimery tworzone są przez oddziaływanie elektrostatyczne i siły van der Waals'a oraz wiązania wodorowe. Dodatek nawet niewielkiej ilości rozpuszczalnika niepolarnego zmienia rozkład ładunku w roztworze oraz osłabia wiązania wodorowe pomiędzy wodą i cząsteczką RB, co powoduje rozpad dimeru (Zhao i wsp., 2009).

Zaobserwowano, że absorpcja rodaminy B w niskich stężeniach spowodowana jest absorpcją monomerów RB. Ponadto, wygląd widma fluorescencyjnego i absorpcyjnego zależny jest od stężenia barwnika (Sanghi i wsp., 1998). Występujące przesunięcie hipsokromowe (w kierunku fal krótszych) widma absorpcyjnego spowodowane jest absorpcją powstających w większym stężeniu dimerów cząsteczek RB. Przez długi czas dimery cząsteczek RB uważane były za niezdolne do fluorescencji, co jest prawdą dla roztworów barwnika w rozpuszczalnikach o niskiej lepkości, takich jak woda w temperaturze pokojowej (Kemnitz i wsp., 1986). Zmiana absorpcji spowodowana jest spadkiem wydajności kwantowej fluorescencji i czasem rozpadu w wyższych stężeniach. Zjawisko to znane jest jako „concentration quenching” – wygaszanie własnej fluorescencji pod wpływem wyższego stężenia (van der Auweraer i wsp., 1988).

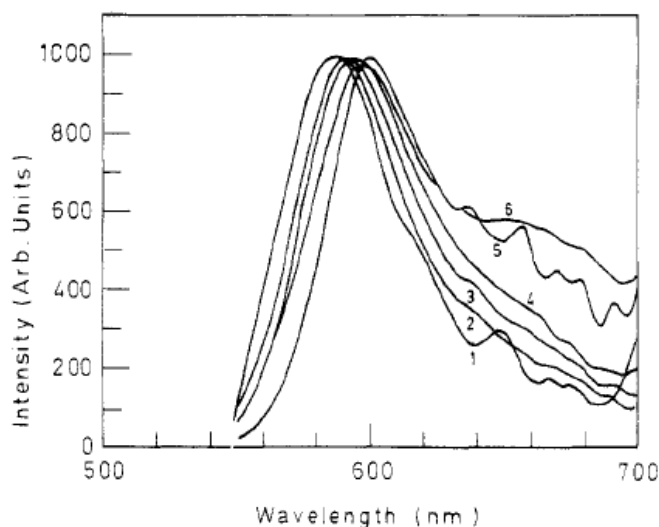
Rodamina B była także wykorzystywana w badaniu adsorpcji na różnych nośnikach. Jeśli na powierzchni nośnika zachodzi adsorpcja cząsteczki RB to obserwuje się wtedy przesunięcie batochromowe maksimum widma absorpcyjnego dla RB (w kierunku fal dłuższych) w porównaniu do absorpcji monomerów RB w roztworze. Zjawisko to zachodzi w przypadku adsorpcji RB, np. na powierzchni gliny (Gollnick i wsp., 1981), kwarcu, nieorganicznych półprzewodnikach (van der Auweraer i wsp., 1988), tlenku glinu (Moadhen i wsp., 2007), srebrze (Marchi i wsp., 1999), polistyrenie (Moreno-Villoslada i wsp., 2006a, Moreno-Villoslada i wsp., 2006b). Przesunięcie batochromowe widma świadczy o przejściu cząsteczki barwnika z roztworu wodnego i jego adsorpcji, co ma związek ze zmianą polarności środowiska wokół RB po związaniu na powierzchni nośnika. W bardziej stężonych roztworach RB cząsteczki barwnika pokrywają większą powierzchnię nośnika. Prowadzi to do znacznego zmniejszenia

intensywności fluorescencji przy jednoczesnym rozszerzeniu i przesunięciu maksimum emisji (van der Auweraer i wsp., 1988).

Rysunek 13 pokazuje zmianę widma absorpcyjnego rodaminy B zaadsorbowanej na szkle i jego przesunięcie batochromowe wraz ze wzrostem stężenia barwnika z 558 nm do 564 nm. Także w widmie fluorescencyjnym na rysunku 14 można zauważyć przesunięcie maksimum emisji w kierunku fal dłuższych w porównaniu do położenia maksimum emisji wyznaczonego podczas pomiarów widma emisyjnego wykonanego dla roztworu RB w etanolu. Wraz ze wzrostem stężenia barwnika maksimum przesunę się z 588 nm do 600 nm. Jak można zauważyć, przesunięcie maksimum emisji jest większe niż przesunięcie maksimum absorpcji. Tłumaczone jest to różną geometrią dimerów RB (van der Auweraer i wsp., 1988). Adsorpcja na nośniku pozwala na stabilizację ładunku dodatniego RB przez ujemnie naładowaną powierzchnię nośnika (Moreno-Villoslada i wsp., 2006b).

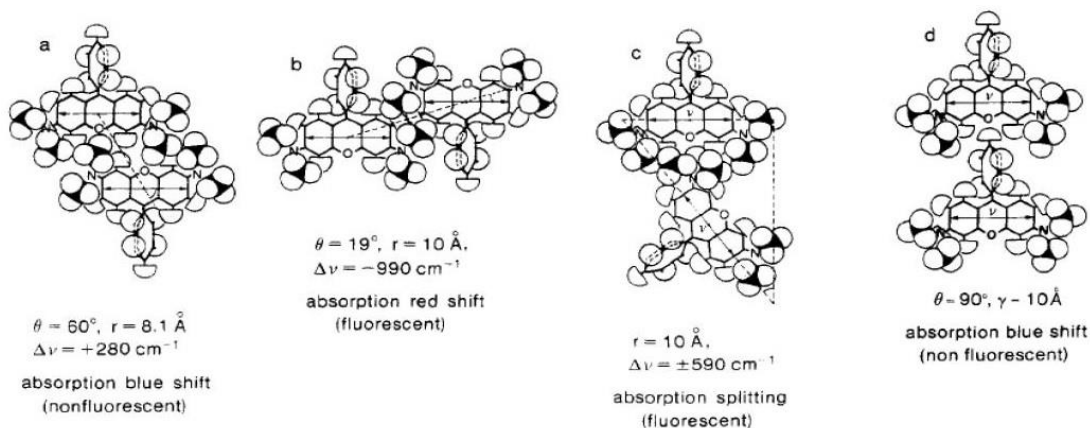


Rys. 13. Widmo absorpcyjne rodaminy B zaadsorbowanej na szkle (od 1 do 6 - wzrost stężenia RB) (van der Auweraer i wsp., 1988).



Rys. 14. Widmo fluorescencyjne rodaminy B zaadsorbowanej na szkle (od 1 do 6 - wzrost stężenia RB) (van der Auweraer i wsp., 1988).

Adsorpcja znacznie wpływa na geometrię i właściwości spektralne dimerów rodaminy B. Dimery na powierzchni nośnika mają inną geometrię niż dimery powstające w roztworze RB przedstawione na rys. 15. Podczas adsorpcji duże grupy oktadecylowe muszą znaleźć się po tej samej stronie i z dala od polarnej powierzchni międzypfazowej (rys. 16) (van der Auweraer i wsp., 1988). Na powierzchni nośnika występować może całe spektrum dimerów, co zależy od zróżnicowania miejsc adsorpcji nośnika (Kemnitz i wsp., 1986).



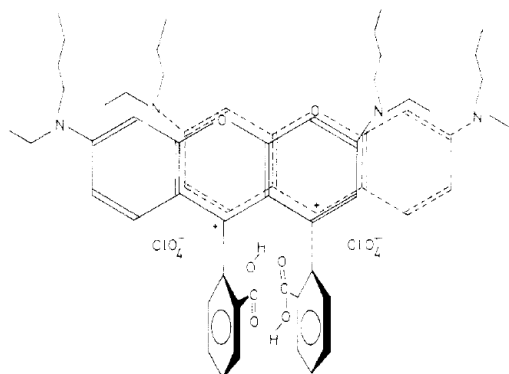
Rys. 15. Struktury dimerów rodaminy B w roztworze (Kemnitz i wsp., 1986).

a- niefluorescencyjny, wywołujący przesunięcie hipschromowe

b - fluorescencyjny, wywołujący przesunięcie batochromowe

c- fluorescencyjny

d- niefluorescencyjny, wywołujący przesunięcie hipschromowe



Rys. 16. Struktura zaadsorbowanego dimeru rodaminy B (van der Auweraer i wsp., 1988).

2.4. Badanie oddziaływań barwników ksantenowych z białkami

W badaniach opisanych w pracy doktorskiej, mających na celu wyjaśnienie przyczyny obserwowanej fluorescencji kolonii *E. coli* oraz określenie roli białka RSFP oraz cząsteczek rodaminy B w jej powstawaniu (2.1), wykorzystano metody badania oddziaływania związków chemicznych (np. substratów, kofaktorów, inhibitorów) z białkami. Metody te dostarczają informacji nie tylko o samym fakcie oddziaływania, ale także o charakterze wiązania i jego wpływie na właściwości cząsteczki białka (strukturę, właściwości fizykochemiczne).

2.4.1. Metody badania oddziaływań barwników ksantenowych z białkami

W śledzeniu zmian konformacyjnych w strukturze białek wywołanych oddziaływaniem jakiegoś związku chemicznego (nie wykazującego fluorescencji w świetle UV-VIS) stosować można m.in. barwniki ksantenowe, które w tym przypadku są stosowane jako znaczniki fluorescencyjne połączone wiązaniem kowalencyjnym z cząsteczką badanego związku chemicznego. Dzięki obecności znaczników fluorescencyjnych, mechanizm wiązania tych związków chemicznych przez białka, może zostać określony przy wykorzystaniu kilku metod spektroskopowych. Metody te znajdują też zastosowanie w przypadku badania mechanizmu i skutków oddziaływania związków chemicznych zdolnych do absorpcji i emisji promieniowania w zakresie UV-VIS, np. barwników ksantenowych.

Jedną z najczęściej wykorzystywanych w celu określenia mechanizmu wiązania barwników z białkami jest różnicowa spektroskopia absorpcyjna. Technika ta znalazła zastosowanie np. w badaniu oddziaływań barwnika Cibacron BlueF₃GA i syntetazy glutaminy (Federici i wsp., 1984), Cibacron BlueF₃GA i rekombinowanego ludzkiego interferonu α -2b (Bumeliene i wsp., 2003). Różnica w absorpcji barwnika związanego z białkiem, a absorpcją niezwiązanego barwnika w roztworze pozwala potwierdzić lub wykluczyć powstanie kompleksu pomiędzy białkiem i barwnikiem. Stopień wiązania może być wyliczony z wynikającej różnicy absorpcji. Także analiza całych widm absorpcyjnych UV-VIS może znaleźć zastosowanie w badaniu oddziaływań wielu różnych grup barwników z białkami (Ahmad i wsp., 2009; Cai i wsp., 2010).

Kolejnymi metodami stosowanymi w badaniu oddziaływań białko – cząsteczki barwnika są techniki oparte na Rezonansowej Spektroskopii Ramana (RRS). Metody te są proste, czułe i dość szybkie w wykonaniu. Określenie wiązania barwnika przez białko opiera się na fakcie, że agregacja barwnika fluorescencyjnego na cząsteczce białka wywołuje wzrost rezonansowego rozproszenia Ramana (Liu i wsp., 2001).

Spektroskopia w podczerwieni – FTIR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) jest techniką stosowaną w ustalaniu konformacji białek (Male i wsp., 2008; Papadopoulou i wsp., 2005). Ponadto, metoda ta pozwala na pośrednie badanie oddziaływania związku chemicznego tzw. ligand z białkiem. W przypadku oddziaływania np. wiązania cząsteczek ligandu, na powierzchni białka następują mierzalne zmiany konformacji białka.

Woltametria cykliczna pozwala na zbadanie właściwości redoks białek. Połączenie woltametria cyklicznej i metod spektroskopowych może pozwolić na pełny i dokładny opis mechanizmu oddziaływań barwnik – białko (Male i wsp., 2008; Zong i wsp., 2009).

Inną techniką mogącą stanowić użyteczne narzędzie badania zmian w strukturze białek wywołanych związaniem cząsteczki barwnika jest dichroizm kołowy – CD (Male i wsp., 2008; Cai i wsp., 2010). Dichroizm kołowy to zjawisko polegające na różnej absorpcji przez substancje chromoforowe światła spolaryzowanego kołowo prawoskrętnie i lewoskrętnie. W białkach znajduje się wiele chromoforów, które mogą powodować wzrost sygnałów CD. α – helisy, β –kartki i inne struktury białka wykazują charakterystyczny kształt i wielkość widm CD. Wykorzystanie CD do badania oddziaływania cząsteczek związków chemicznych z cząsteczkami białek polega na oszacowaniu różnic w procentowym udziale każdej z wymienionych powyżej struktur w cząsteczce białka przed i po związaniu cząsteczek barwnika przez białko (Kelly i Price, 2000).

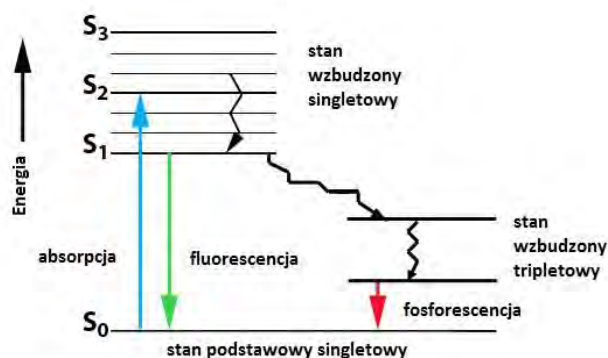
Głównym przeznaczeniem spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) jest pomiar ruchliwości cząsteczek znakowanych fluorescencyjnie (lub samych barwników) w dobrze zdefiniowanym, niewielkim obszarze o wymiarach rzędu jednego mikrometra. Średni czas korelacji dostarcza informacji o współczynniku dyfuzji lub czasie dyfuzji cząsteczek, a tym samym o rozmiarze i masie obserwowanych molekuł. Rosnący czas dyfuzji cząsteczki fluorescencyjnej świadczy o wzroście rozmiarów obiektu, co jest skutkiem oddziaływania tej cząsteczki z inną (np. białkiem). Wyniki uzyskiwane w pomiarach FCS dostarczają informacji o średnim czasie dyfuzji cząsteczki przez objętość konfokalną oraz o ilości tych cząsteczek w tej objętości. Na podstawie danych otrzymanych tą techniką wyznaczyć można stałą dysocjacji i ocenić stabilność utworzonego kompleksu, poprzez badanie termodynamiki i kinetyki oddziaływań pomiędzy cząsteczkami (Novo i wsp., 2011).

Do badania interakcji pomiędzy barwnikiem i białkiem można zastosować także zjawisko FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Rasoulzadeh i wsp., 2009), które jest procesem fotofizycznym polegającym na przenoszeniu energii między dwoma chromoforami. Energia zaabsorbowana przez fluorescencyjną cząsteczkę donorową przenoszona jest na drodze innej niż promieniowanie na cząsteczkę akceptora fluorescencyjnego. Proces ten może być zaobserwowany jako jednoczesne wygaszanie fluorescencji donora i wzbudzenie

elektrostatyczne cząsteczki akceptora (More i wsp., 2010). Wygaszanie fluorescencji zachodzić może na drodze wygaszania dynamicznego, wynikającego ze zderzeń pomiędzy cząsteczkami fluoroforu i wygaszacza, bądź na drodze wygaszania statycznego, polegającego na utworzeniu niefluorescencyjnego kompleksu fluorofor-wygaszcz w stanie podstawowym. Wiązanie cząsteczek barwnika przez białka zazwyczaj prowadzi do wygaszania fluorescencji barwnika i może zostać wykorzystane do określania mechanizmu oddziaływania białko – barwnik (Perez-Ruiz i wsp., 2000; Cai i wsp., 2010; Zhu i wsp., 2009). Metoda ta może zostać wykorzystana także do badania wiązania przez białka innych związków chemicznych niż barwniki (Papadopoulou i wsp., 2005; Hu i wsp., 2005; Li i wsp., 2007a). Poza tym, FRET jest techniką znajdującą zastosowanie w analizach odległości pomiędzy donorem a akceptorem fluoroforu, a także w określeniu położenia fluoroforu (Hu i wsp., 2005; Li i wsp., 2007a).

2.4.2. Luminescencja

Luminescencja jest to zjawisko emisji fal świetlnych – promieniowania, nie będącego efektem ogrzania substancji. Ze względu na rodzaj wzbudzenia wyróżnia się: fotoluminescencję, katodoluminescencję, radioluminescencję, rentgenoluminescencję, elektroluminescencję, trybo-luminescencję, sonoluminescencję, chemiluminescencję, elektrochemio-luminescencję oraz bioluminescencję. Fotoluminescencja jest luminescencją wywołaną absorpcją promieniowania świetlnego w zakresie ultrafioletowym i widzialnym. W zależności od czasu pomiędzy pochłonięciem a wyemitowaniem energii wyróżnia się fluorescencję i fosforescencję. Zjawisko fluorescencji jest szybkim procesem fotofizycznym zachodzącym, gdy od pochłonięcia światła przez cząsteczkę do emisji nie upłynęło więcej niż 10^{-8} s. Jeśli czas pomiędzy pochłonięciem energii a jej emisją jest dłuższy niż 10^{-8} s mówimy wówczas o fosforescencji (Kawski, 1992; Valeur, 2001). Zjawisko fluorescencji i fosforescencji ilustruje diagram Jabłońskiego przedstawiający schemat rozmieszczenia poziomów energii elektronicznej cząsteczki (rys. 17).



Rys. 17. Uproszczony diagram Jabłońskiego dla absorpcji, fluorescencji i fosforescencji (rysunek zmodyfikowany z materiałów „Advanced Imaging Laboratory” Uniwersytet Victoria, Kanada).

Zdolność luminescencji posiadają m.in. cząsteczki aromatyczne i heterocykliczne, cząsteczki licznych barwników (np. fluoresceina, eozyna), a także cząsteczki o znaczeniu biologicznym. Substancjami wykazującymi zjawisko fluorescencji wśród związków biologicznie czynnych są między innymi aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina), zasady azotowe nukleotydów w DNA i RNA (adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl), barwniki roślinne (chlorofil, bakteriochlorofil i karotenoidy), niektóre witaminy i hormony (ryboflawina).

Dla niskich stężeń substancji emitującej, intensywność fluorescencji (I_F) jest proporcjonalna do jej stężenia, w przypadku wysokiego stężenia zachodzi autowygaszenie fluorescencji (Lakowicz, 2006). Zależność tę ilustruje równanie:

$$I_F = k \cdot I_0 \cdot c \cdot s$$

gdzie:

k – stała proporcjonalności

I_0 – natężenie promieniowania wzbudzającego

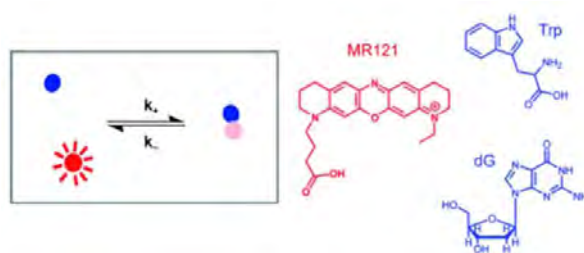
c – stężenie substancji emitującej

s – grubość warstwy absorbującej

2.4.2.1. Wygaszenie fluorescencji

W badaniach oddziaływań związków chemicznych z białkami często wykorzystuje się zjawisko wygaszania fluorescencji białka przez inną cząsteczkę lub wygaszania fluorescencji tej cząsteczki przez białko (Birla i wsp., 2004).

Intensywność fluorescencji danej substancji może zostać zmniejszona jeżeli w jej roztworze znajdzie się substancja zwana wygaszaczem (rys. 18) (Lakowicz, 2006).



Rys. 18. Wygaszenie fluorescencji fluoroforu (kolor czerwony) przez potencjalne donory elektronów (kolor niebieski) (Doose i wsp., 2009).

W wygaszaniu dynamicznym cząsteczki wygaszacza dyfundują do fluoroforu w trakcie kiedy fluorofor znajduje się w stanie wzbudzonym i kiedy zajść może transfer energii. W wygaszaniu statycznym tworzy się niezdolny do fluorescencji kompleks wygaszacz – fluorofor o nowych właściwościach fizykochemicznych (Ahmad i wsp., 2009).

Wygaszanie dynamiczne (kolizyjne) zależy od prędkości dyfuzji i stężenia substancji emitującej. Im większa ilość wygaszacza w roztworze, tym większe prawdopodobieństwo kolizji

między cząsteczką wygaszacza a cząsteczką fluoroforu. Wzbudzona cząsteczka fluoroforu spotyka się z cząsteczką niezdolną do fluorescencji, która przechodzi w stan wzbudzenia. W trakcie tego procesu cząsteczki nie ulegają modyfikacji chemicznej. W odróżnieniu od wygaszania dynamicznego, wygaszanie statyczne nie zależy od prędkości dyfuzji. Wygaszanie statyczne związane jest procesem bardzo szybkim ($\approx 10^{-15}$ s), polega na utworzeniu przez substancję fluorescencyjną niefluoryzującego kompleksu z wygaszaczem lub na natychmiastowym odebraniu wyemitowanej energii przez znajdującą się bardzo blisko cząsteczkę wygaszacza. Kiedy taki kompleks absorbuje światło to natychmiast powraca do stanu podstawowego nie emitując fotonu. Im większe stężenie wygaszacza, tym większe prawdopodobieństwo związania się z cząsteczką fluoroforu (Lakowicz, 2006).

Zależność pomiędzy stężeniem wygaszacza a intensywnością fluorescencji opisuje równanie Sterna-Volmera:

$$I_0/I_w = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

gdzie:

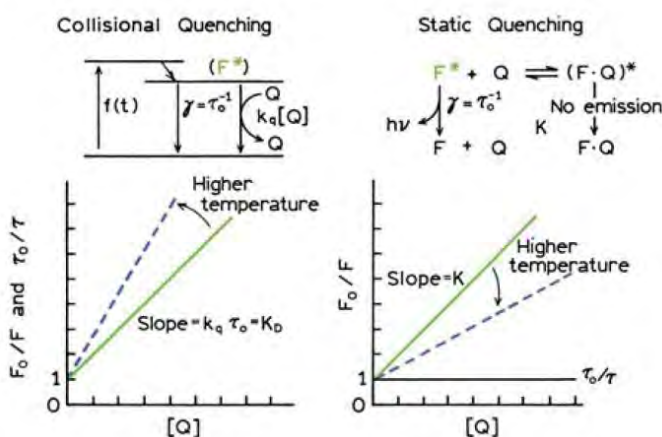
I_0 – intensywność fluorescencji bez wygaszacza

I_w – intensywność fluorescencji w obecności wygaszacza

K_{SV} – stała wygaszania

$[Q]$ – stężenie wygaszacza

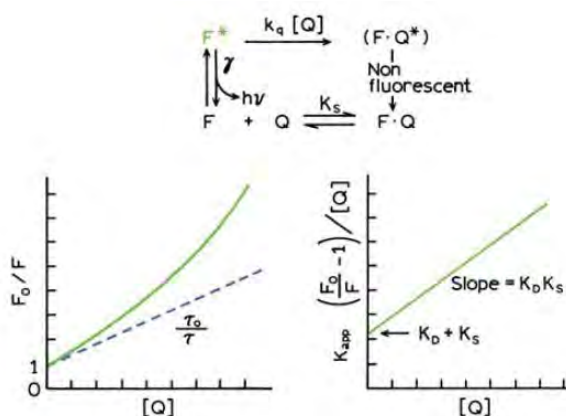
Zależność ta (wykres Sterna – Volmera) jest liniowa dla wygaszania dynamicznego fluorescencji, a także w niektórych przypadkach dla wygaszania statycznego (rys. 20). W przypadku gdy wykres Sterna – Volmera jest liniowy typ wygaszania można określić badając zależność wygaszania od temperatury roztworu, lepkości lub czasu trwania fluorescencji. Wzrost temperatury prowadzi do wzrostu stałej dysocjacji wygaszacza, co w większości przypadków wywołuje zwiększenie wygaszania dynamicznego (rys. 19). W przypadku wygaszania statycznego fluorescencji wzrost temperatury prowadzi do spadku stałej wiązania wygaszacza z fluoroforem, co skutkuje zmniejszeniem wygaszania (rys. 19) (Lakowicz, 2006).



Rys. 19. Porównanie wygaszania dynamicznego (po lewej; ang. *collisional quenching*) i statycznego fluorescencji (po prawej; ang. *static quenching*) (Lakowicz, 2006).

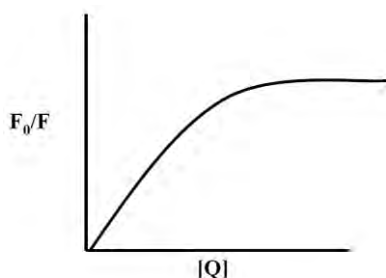
Inną metodą określenia typu wygaszenia fluorescencji jest porównanie widm absorpcyjnych fluoroforu. Wygaszenie dynamiczne ma wpływ na stan wzbudzony fluoroforu, przez to nie wpływa na wygląd widma absorpcyjnego. W przeciwieństwie do tego, utworzenie kompleksu w stanie podstawowym, jak ma to miejsce w wygaszaniu statycznym, zaburza często widmo absorpcyjne fluoroforu (Lakowicz, 2006).

Wygaszenie fluorescencji może mieć także charakter mieszany – dynamiczny i statyczny (Valeur, 2001). W takim przypadku charakterystyczną cechą wykresu Sterna-Volmera jest nieliniowy przebieg wykresu, o wznoszącej się krzywiźnie w kierunku osi y (rys. 20).



Rys. 20. Wykres Sterna-Volmera dla mieszanego mechanizmu wygaszenia fluorescencji (Lakowicz, 2006).

Dostępność fluoroforu dla wygaszacza może zostać użyta w określaniu jego lokalizacji w makrocząsteczkach (np. białkach). Jeśli w cząsteczce występują dwie populacje fluoroforu (np. reszty tryptofanowe), nie będące dostępne dla wygaszacza w takim samym stopniu, wtedy wykres Sterna-Volmera wykazuje odchylenie od linii prostej w kierunku osi x (rys. 21). Wyniki takie obserwuje się często w wygaszaniu fluorescencji reszt tryptofanu w białkach przez polarne lub naładowane wygaszacze. Cząsteczki takie z trudnością penetrują hydrofobowe wnętrza białek i tylko reszty tryptofanu znajdujące się na powierzchni białka mogą zostać wygaszane (Lakowicz, 2006).



Rys. 21. Wykres Sterna-Volmera dla układu posiadającego fluorofory o różnym stopniu dostępności dla wygaszacza (Lakowicz, 2006).

W łańcuchu polipeptydowym białek wyróżnić można aromatyczne reszty aminokwasowe tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny, będące źródłem właściwości fluorescencyjnych białek. Ich fluorescencja przypada na zakres bliskiego ultrafioletu. Dla fenyloalaniny maksimum absorpcji przypada w 260 nm, a emisji w 282 nm. Dla tyrozyny następuje przesunięcie w stronę niższych energii, maksimum absorpcji przypada na długość fali 275 nm, a emisji 304 nm. Widma absorpcji tryptofanu przesunięte są w jeszcze bardziej długofalową część UV. Maksimum absorpcji dla tryptofanu to 295 nm, a emisji 353 nm. Fluorescencja reszty tryptofanu jest bardzo wrażliwa na wpływ otoczenia (rozpuszczalnik, wygaszacze). Ponieważ białka zawierają wiele reszt aminokwasowych, podlegających różnym czynnikom środowiska, ich fluorescencja jest heterogenna, co przejawia się przede wszystkim zależnością parametrów emisji od długości fali promieniowania wzbudzającego. Reszty tryptofanu odgrywają decydującą rolę dla fluorescencji białek, gdyż fluorescencja pochodząca od tyrozyny jest w znacznym stopniu wygaszona, natomiast emisję pochodzącą od fenyloalaniny obserwuje się w niewielu przypadkach. Do wygaszania fluorescencji w białkach dochodzi w skutek wewnątrzcząsteczkowego kompleksu nakładających się na siebie pierścieni aromatycznych. Wygaszenie fluorescencji ma tu zarówno charakter statyczny jak i dynamiczny (Lakowicz, 2006).

3. Cel pracy

Celem pracy było wyjaśnienie przyczyn obserwowanej na podłożu z rodaminą B fluorescencji komórek *E. coli* ekspresujących gen *rsfp* pochodzący z metagenomu gleby antarktycznej oraz ocena możliwości praktycznego wykorzystania tego zjawiska.

Cele szczegółowe pracy to produkcja białka RSFP przy zastosowaniu arabinozowego systemu ekspresji w komórkach rekombinantowego szczepu *E. coli*, oczyszczenie białka oraz zbadanie jego aktywności enzymatycznej, a także wyjaśnienie roli białka RSFP oraz cząsteczek rodaminy B w powstawaniu obserwowanej fluorescencji. Celem pracy było również zbadanie możliwości zastosowania genu *rsfp* jako nowego genu reporterowego i składnika biosensora komórkowego biodostępnej rodaminy B w środowiskowych próbkach wody.

4. Materiały i metody

4.1. Materiały

4.1.1. Szczepy bakteryjne

Escherichia coli TOP 10F' – F' (*lacI^q* Tn 10 (Tet^R), *mcrA*Δ(*mrr*- *hsdRMS*- *mcrBC*) φ80' *lacZ*Δ15, Δ*lacX74* *deoR* *recA* 1 *araD139* Δ (*ara* – *leu*) F697 *galU* *galK* *rspL* (*strR*) *endA1* *nupG*)

Escherichia coli DH5α – *fhuA2* *lac*(*del*)U169 *phoA* *glnV44* Φ80' *lacZ*(*del*)M15 *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*

Escherichia coli LMG194 – F'Δ*lacX74* *galE* *thi* *rpsL* Δ*phoA* (*PvuII*) Δ*ara714* *leu*::Tn10

Escherichia coli XL10-Gold – TetR Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* Hte [F' *proAB* *lacIq*ΔM15 Tn10 (TetR) Amy CamR

4.1.2. DNA plazmidowe

pUC19 – (Fermentas) - wysokokopijny plazmid replikujący się w komórkach *E. coli*, zawierający: gen *bla* kodujący β-laktamazę nadającą oporność bakterii na antybiotyki β-laktamowe (ampicylinę); fragment operonu *lac*: miejsce wiązania CAP, P_{*lac*}, miejsce operatorowe wiązania represora *lac*, 5' terminalną część genu *lacZ* kodującą N-terminalny fragment β-galaktozydazy pozwalającą na selekcję rekombinatów plazmidów metodą "blue-white screening" (2 686 pz),

pPINK-uv – plazmid biblioteczny pUC19 z fragmentem DNA metagenomowego pochodzącego z gleby arktycznej (10 999 pz) (Cieśliński i wsp., 2009),

pUC19-RSFP – plazmid skonstruowany w Katedrze Mikrobiologii PG, zawierający gen *rsfp* wprowadzony do plazmidu pUC19 (4 598 pz) (Cieśliński i wsp., 2009),

pBADMycHisA – (Invitrogen) plazmid ekspresyjny zapewniający wydajną ekspresję genu wprowadzonego pod kontrolą promotora arabinozowego *araBAD* (4 094 pz),

4.1.3. Pożywki i podłoża

Podłoże LA (Luria-Bertani Agar)

Pepton K	1,0 %
Ekstrakt drożdżowy	0,5 %
NaCl	1,0 %
Agar	1,5 %

Podłoże LB (Luria-Bertani)

Pepton K	1,0 %
Ekstrakt drożdżowy	0,5 %
NaCl	1,0 %

Dodatkowo stosowano:

Tetracyklinę ($C_k = 12 \mu\text{g/ml}$)

Ampicylinę ($C_k = 100 \mu\text{g/ml}$)

Rodaminę B ($C_k = 1 \mu\text{g/ml}$)

IPTG ($C_k = 1 \text{ mM}$)

20% roztwór L-arabinozy w wodzie

Każde z podłoży przed zastosowaniem było sterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C , przez 20 min. Po ochłodzeniu podłoży dodawano do nich odpowiednie antybiotyki oraz składniki dodatkowe.

4.1.4. Rozdział elektroforetyczny DNA

Rozdział elektroforetyczny DNA przeprowadzany był w żelu agarozowym (1%, 1,5% lub 2%) w buforze 1xTAE z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu $0,1 \mu\text{g/ml}$. Roztwór DNA nanoszony był w buforze obciążającym "6x DNA loading dye" (Fermentas). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 5-10 V na 1 cm długości żelu.

- **Bufor 1xTAE** (pH 8,3): 40mM Tris, 20mM kwas octowy, 1mM EDTA

4.1.5. Markery wielkości DNA

Marker Ideal (Blirt SA - DNA Gdańsk) - wielkość fragmentów (pz): 9276, 5982, 3653, 2555, 1827, 1241, 900, 700.

4.1.6. Odczynniki do elektroforezy SDS-PAGE

- 12% rozdzielający żel poliakrylamidowy (5ml):
 - Woda - 1,6 ml
 - 30% mieszanina akrylamidów – 2,0 ml
 - 1,5 M Tris pH 8,8 - 1,3 ml
 - 10% SDS - 0,05 ml
 - 10% nadsiarczan amonu - 0,05 ml
 - TEMED - 0,004 ml

- 5% zagęszczający żel poliakrylamidowy (2 ml):
 - Woda - 1,4 ml
 - 30% roztwór akrylamidów- 0,33 ml
 - Tris 1M, pH 6,8- 0,25 ml
 - 10% SDS- 0,02 ml
 - 10% nadsiaroczan amonu- 0,02 ml
 - TEMED- 0,002 ml
- Bufor barwiący:
 - Roztwór metanol: woda (1:1)- 90 ml
 - Kwas octowy lodowaty- 10 ml
 - 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R
- Bufor 5x Tris- glicyna :
 - Tris-HCl pH 8,3- 15,1 g
 - Glicyna- 94 g
 - 10% SDS- 50 ml
 - Woda destylowana- 900 ml
- Bufor do nanoszenia próbek na żel 5x stężony, pH 6,8:
 - 0,3125 M Tris-HCl
 - 10% SDS
 - 0,5 M DTT
 - 50% glicerol v/v
 - 0,05% błękit bromofenolowy

4.1.7. Markery masy cząsteczkowej białek

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas): 116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa.

4.1.8. Odczynniki do reakcji PCR

- DNA matrycowe - DNA plazmidu pPINK-uv
- Roztwór chlorku magnezu (50 mM)
- Roztwór trifosforanów deoksyrybonukleozydów (2,5 mM każdy)
- 10x stężony bufor do reakcji PCR dla polimerazy *Hypernova* (Blirt SA - DNA Gdańsk)
- Polimeraza DNA *Hypernova* (Blirt SA - DNA Gdańsk)
- Startery (Genomed, Polska):

For_ *rsfp*-BAD

31 nukleotydów: 5'TTATCATGACTTCAACCGCAGTAGAAATTAC 3'
 sekwencja rozpoznania dla enzymu *PagI* - kolor czerwony
 podkreślona sekwencja - sekwencja komplementarna do matrycy
 $T_{m1} = 54,3^{\circ}\text{C}$; $T_{m2} = 59,4^{\circ}\text{C}$

Rev_ *rsfp*-BAD

33 nukleotydy: 5'ATACTG**CAG**CTACGGAAGTAATGCTGCAAGTCT 3'
 sekwencja rozpoznania dla enzymu *Pst*I - kolor czerwony
 podkreślona sekwencja - sekwencja komplementarna do matrycy
 $T_{m1}= 52,8^{\circ}\text{C}$; $T_{m2}= 63,6^{\circ}\text{C}$

F_19primer

43 nukleotydy: 5'TTAG**GGATCC**AGGAGATATACTTATGACTTCAAACGCAGTAGAA3'
 sekwencja rozpoznania dla enzymu *Bam*HI- kolor czerwony
 podkreślona sekwencja - sekwencja komplementarna do matrycy
 $T_{m1}= 49,2^{\circ}\text{C}$; $T_{m2}= 69,0^{\circ}\text{C}$

R_primer

30 nukleotydów: 5'AAT**GTCGACT**TACGGAAGTAATGCTGCAAGT3'
 sekwencja rozpoznania dla enzymu *Sal*I- kolor czerwony
 podkreślona sekwencja - sekwencja komplementarna do matrycy
 $T_{m1}= 50,9^{\circ}\text{C}$; $T_{m2}= 63,0^{\circ}\text{C}$

4.1.9. Enzymy restrykcyjne i bufor do reakcji trawienia

Enzym restrykcyjny (Fermentas)	Seqwencja rozpoznania	Bufor reakcyjny (Fermentas)	Temperatura działania
<i>Pag</i> I	5'T^C A T G A3' 3'A G T A C^A5'	Orange	37°C
<i>Pst</i> I	5'C T G C A^G3' 3'G^A C G T C5'	Orange	37°C
<i>Nco</i> I	5'C^C A T G G3' 3'G G T A C^A5'	Tango	37°C
<i>Hinc</i> II	5'G T Y^R A C3' 3'C A R^Y T G5'	Tango	37°C
<i>Hind</i> III	5'A^A G C T T3' 3'T T C G A^A5'	Red	37°C
<i>Bsp</i> 143I (<i>Sau</i> 3AI)	5^A G A T C3' 3'C T A G^A5'	Bsp143I	37°C
<i>Bam</i> HI	5'G^G A T C C3' 3'C C T A G^G5'	Yellow, Tango	37°C
<i>Hind</i> III	5'A^A G C T T3' 3'T T C G A^A5'	Red	37°C
<i>Sal</i> I	5'G^T C G A C3' 3'C A G C T^G5'	Tango	37°C

4.1.10. Odczynniki do reakcji ligacji

- Ligaza DNA faga T4 (Epicentre)
- 10 x stężony bufor do reakcji ligacji (Epicentre)
- Roztwór ATP o stężeniu 25 nM (Epicentre)

4.1.11. Mutageneza ukierunkowana

Mutagenezę ukierunkowaną wykonano wykorzystując zestaw „QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit” firmy Stratagene.

Ponadto, wykorzystano:

- DNA matrycowe - DNA plazmidu pBAD-RSFP
- Startery (Sigma-Aldrich) – podkreślono trójki nukleotydów kodujące resztę aminokwasową alaniny lub kwasu asparaginowego:
 - **Startery S22A**
F_mutRSFP_S22: 5' CGCTATTATCGGCGGTGCCGGTCTGTATCAAATGC 3'
R_mutRSFP_S22: 5' GCATTTGATACAGACCCGACCCGCCGATAATAGCG 3'
 - **Startery D222A**
F_RSFP_D222A: 5' CGTTAGCGCTAGTGACAGGCTTTTGATTGTTGGCATCC 3'
R_RSFP_D222A: 5' GGATGCCAACAATCAAAAGCTGTCACTAGCGCTAACG 3'
 - **Startery D224A**
F_RSFP_D224A: 5' GCTAGTGACAGATTTTGCTTGTTGGCATCCAAATGAG 3'
R_RSFP_D224A: 5' CTCATTTGGATGCCAACAAGCAAAATCTGTCACTAGC 3'
 - **Startery F179A:**
For_F179A: 5' GTATCGAAGGACCTCAGGCTTCAACTCGCGCAGAATC 3'
Rev_F179A: 5' GATTCTGCGCGAGTTGAAGCCTGAGGTCCTTCGATAC 3'
 - **Startery F179Y:**
For_F179Y: 5' GTATCGAAGGACCTCAGTATTCAACTCGCGCAGAATC 3'
Rev_F179Y: 5' GATTCTGCGCGAGTTGAAATACTGAGGTCCTTCGATAC 3'

4.1.12. Bufory do oczyszczania białka RSFP

- Bufor A: 0,02 M sodowy bufor fosforanowy, 50 mM NaCl; pH 6,3
- Bufor B: 0,02 M sodowy bufor fosforanowy, 1,5 M NaCl; pH 6,3

4.1.13. Pozostałe bufory i roztwory

- 0,1 M roztwór chlorku wapnia
- BSA – Sigma-Aldrich (USA)
- Sól fizjologiczna – 0,9% NaCl
- **Bufor TE** (pH=8,0): 10 mM Tris, 1mM EDTA
- **Bufor Tris** (pH= 8,5): 10 mM Tris-HCl
- **Bufor A1**: 0,02 M sodowy bufor fosforanowy; pH 6,3
- **Bufor PBS**: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7.4

- **Bufor GL:** 50 mM sodowy bufor fosforanowy, 150 mM NaCl; pH 7.0
- **Odczynnik Bradford:** 5% EtOH, 8,50 % kwas ortofosforowego, 0,007 % Commasie Brilliant Blue G
- Oksydaza ksantynowa – Calbiochem (USA)
- Adenina – Sigma-Aldrich (USA)
- Metylotioadenozyna (MTA) Sigma-Aldrich (USA)
- Rodamina B – 1mg/ml

4.2. Metody

4.2.1. Hodowle bakteryjne

Hodowla w pożywce płynnej

Hodowlę komórek bakteryjnych *E. coli* (4.1.1) prowadzono w pożywce płynnej LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku (4.1.3) w temperaturze 37°C przez 18 h.

Hodowla na podłożu stałym

Komórki *E. coli* (4.1.1) wysiewano na odpowiednie podłoże stałe (4.1.3), a następnie płytki z podłożem inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 h.

Hodowla w pożywce płynnej z rodaminą B

Hodowlę komórek bakteryjnych *E. coli* TOP10F' transformowanych DNA plazmidu pUC19 (*E. coli rsfp-*) oraz komórek bakteryjnych *E. coli* TOP10F' transformowanych DNA plazmidu pP5 (*E. coli rsfp+*) prowadzono w pożywce płynnej LB (4.1.3) z dodatkiem ampicyliny w temperaturze 37°C, przez 18 h. Następnie hodowlę odmładzano przez przeniesienie 2 ml hodowli do 200 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny i poddano inkubacji w 37°C z wytrząsaniem do momentu osiągnięcia gęstości optycznej zawiesiny $OD_{600}=0,5$. Następnie hodowlę *E. coli rsfp+* oraz hodowlę kontrolną dzielono na porcje 5 ml i dodawano do nich 5 ml roztworu rodaminę B w LB tak by otrzymać końcowe stężenia barwnika wynoszące: 5; 2,5; 0,5; 0,25; 0,05; 0,025; 0,005; 0,0025 [$\mu\text{g/ml}$], hodowlę kontynuowano przez 4 i 24 h.

4.2.2. Transformacja komórek *E. coli*

Komórki kompetentne *E. coli* szczepu TOP10F' i LMG194 oraz transformację komórek kompetentnych DNA odpowiedniego plazmidu przeprowadzono wg. procedury opisanej przez Sambrook i wsp. (1989). Uzyskane mieszaniny transformacyjne wysiewano następnie na odpowiednie podłoże stałe.

4.2.3. Izolacja i oczyszczanie DNA

Izolację DNA plazmidowego i genomowego oraz oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych wykonywano wykorzystując zestawy firmy A&A Biotechnology (Clean-up; Plasmid Mini; Genomic Mini) postępując zgodnie z procedurą dołączoną do zestawów przez producenta.

4.2.4. Rozdział DNA w żelu agarozowym

Żel agarozowy o odpowiednim stężeniu umieszczano w aparacie do elektroforezy agarozowej wypełnionym buforem 1x TAE (4.1.4). Do studzienek żelu наносono 5-10 µl próbki DNA wymieszanej z buforem obciążającym 6x DNA loading dye (Fermentas). Następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny przez około 30 min, przy napięciu 100 V. Wynik rozdziału obserwowano w świetle UV.

4.2.5. Elektroforeza SDS-PAGE

Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w żelu poliakrylamidowym (4.1.6) w buforze 1x Tris-glicyna (4.1.6) przy napięciu 10 V/cm długości żelu do czasu osiągnięcia przez barwnik czoła żelu. W studzienki żelu наносono 25 µl próbki (20 µl próbki białka + 5 µl barwnika denaturującego (4.1.6)) inkubowanej uprzednio przez 10 min w temperaturze 94°C. Następnie żel barwiono (4.1.6), po czym odbarwiano przez gotowanie w wodzie przez 20 min.

4.2.6. Konstrukcja wektora ekspresyjnego pBAD-RSFP

4.2.6.1. Amplifikacja genu *rsfp*

Gen *rsfp* pochodzący z plazmidu pPINK-uv (4.1.2) został powielony w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów „For_*rsfp*-BAD” i „Rev_*rsfp*-BAD” (4.1.8). Na końcu 5', niekomplementarnym do matrycy, starter „For_*rsfp*-BAD” zawierał sekwencję rozpoznania dla restryktazy *PagI*, starter „Rev_*rsfp*-BAD” zawierał sekwencję rozpoznania dla enzymu restrykcyjnego *PstI*. Sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych zostały wprowadzone, aby możliwe było późniejsze włączenie produktu PCR do wektora ekspresyjnego pBADMyHisA. Reakcja PCR przebiegała dwuetapowo. W pierwszym etapie, składającym się z dziesięciu cykli, zastosowano temperaturę przyłączania starterów wynoszącą 53°C, optymalną dla części starterów komplementarnej do matrycy. W następnych dwudziestu czterech cyklach zastosowano temperaturę 63°C odpowiadającą T_m całości starterów. Produkt reakcji PCR naniesiono na żel agarozowy i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (4.2.4), a następnie oczyszczono (4.2.3).

Skład mieszaniny reakcyjnej (na jedną reakcję – 25 µl) (4.1.8):

Składnik	Ilość [µl]
DNA (pPINK-uv)	1,5
For_ <i>rsfp</i> -BAD (100µM)	1
Rev_ <i>rsfp</i> -BAD (100µM)	1
50 mM MgCl ₂	1,7
10 mM dNTPs	2,5
Bufor <i>Pwo</i> 10x	2,5
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> (<i>Hypernova</i>)	0,5
woda	14,3

Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR:

Denaturacja wstępna	94°C	120s	
Denaturacja	94°C	30s	} 10 cykli
Przyłączanie starterów	53°C	45s	
Wydłużanie starterów	72°C	60s	
Denaturacja	94°C	30s	
Przyłączanie starterów	63°C	45s	
Wydłużanie starterów	72°C	60s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300s	

4.2.6.2. Reakcja trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi

Oczyszczony produkt PCR (4.2.6.1) został poddany reakcji trawienia enzymami *PagI* i *PstI* w celu uzyskania lepkich końców pozwalających na dalsze klonowanie (4.1.9). DNA wektora pBADMycHisA (4.2.1) trawiono enzymami *NcoI* i *PstI*. Fragmenty DNA będące produktami reakcji trawienia plazmidu pBADMycHisA oraz będące produktami reakcji trawienia produktu PCR zostały oczyszczone (4.2.3) oraz naniesione na żel agarozowy w celu kontroli procesu trawienia i oceny ilości niezbędnych komponentów do reakcji ligacji (4.2.4).

Składnik	Ilość [µl]	Składnik	Ilość [µl]
Produkt PCR (4.2.5)	16	pBADMycHisA	16
Enzym <i>PagI</i>	2	Enzym <i>NcoI</i>	2
Enzym <i>PstI</i>	2	Enzym <i>PstI</i>	2
Bufor Tango 10x	2,5	Bufor Tango 10x	2,5
woda	2,5	woda	2,5

4.2.6.3. Reakcja ligacji

Reakcję ligacji produktów trawienia wektora pBADMycHisA oraz produktu PCR (4.2.6.2) przeprowadzono w 16°C, przez 18 h w mieszaninie (4.1.10):

Składnik	Ilość [μl]
Produkt PCR/ <i>PagI</i> , <i>PstI</i>	6
DNA plazmidu pBADMycHisA/ <i>NcoI</i> , <i>PstI</i>	10
Ligaza DNA faga T4	1
25 nM ATP	1,5
Bufor 10x	1,5

4.2.6.4. Izolacja plazmidu pBAD-RSFP

Komórki *E. coli* TOP10F' transformowano mieszaniną ligacyjną (4.2.6.3), po czym wysiano je na podłoże LA zawierające rodaminę B, arabinozę oraz ampicylinę w celu selekcji prawidłowych klonów (4.1.3). Zaobserwowano 13 kolonii bakteryjnych wykazujących fluorescencję w świetle UV, kolonie te przesiano na podłoże LA i LB z ampicyliną (4.1.3), a następnie wyizolowano DNA plazmidowe (4.2.3). Uzyskane plazmidy naniesiono na żel agarozowy i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w celu oszacowania opóźnienia migracji wyizolowanych plazmidów względem plazmidu pBADMycHisA (4.2.4). Plazmidy wykazujące opóźnienie migracji poddano analizie restrykcyjnej za pomocą enzymu *HindIII* oraz *HincII* (4.1.10):

Składnik	Ilość [μl]
DNA plazmidu pBADMycHisA lub pBAD-RSFP	12
Enzym <i>HindIII</i> lub <i>HincII</i>	1
Bufor R 10x	2
woda	5

Otrzymano oczekiwane produkty trawienia pBAD-RSFP: dla enzymu *HindIII* o wielkości 839 pz i 4 130 pz oraz dla enzymu *HincII* o wielkości 763 pz, 808 pz i 3 398 pz. Plazmid pBADMycHisA w wyniku trawienia *HindIII* ulega linearyzacji, a w wyniku trawienia *HincII* otrzymuje się fragmenty o wielkości 808 pz i 3 286 pz.

DNA otrzymanego plazmidu pBAD-RSFP zostało zsekwencjonowane w celu sprawdzenia prawidłowości sekwencji nukleotydowej genu *rsfp* wprowadzonego do wektora pBADMycHisA.

4.2.7. Konstrukcja wektora pułapkowego pTrap

4.2.7.1. Amplifikacja genu *rsfp*

Amplifikacji poddano gen *rsfp* z plazmidu pPINK-uv (4.1.2). Do reakcji PCR zastosowano starter "F_19 primer" (4.1.8) zawierający miejsce rozpoznania dla enzymu *Bam*HI oraz optymalną dla *E. coli* sekwencję RBS i starter "R_primer" (4.1.8) zawierający miejsce rozpoznania dla enzymu *Sall*.

Skład mieszaniny reakcyjnej (na jedną reakcję- 25 µl) (4.1.8):

Składnik	Ilość [µl]
DNA matrycowe (pPINK-uv)	1,5
F_19primer (100µM)	1
R_primer (100µM)	1
50 mM MgCl ₂	1,7
10 mM dNTPs	2,5
Bufor <i>Pwo</i> 10x	2,5
Polimeraza DNA <i>Pwo</i> (<i>Hypernova</i>)	0,5
woda	14,3

Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR:

Denaturacja wstępna	94°C	120s	
Denaturacja	94°C	30s	} 12 cykli
Przyłączanie starterów	50°C	60s	
Wydłużanie starterów	72°C	60s	
Denaturacja	94°C	30s	} 24 cykle
Przyłączanie starterów	65°C	45s	
Wydłużanie starterów	72°C	60s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300s	

4.2.7.2. Reakcja trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi

Oczyszczone DNA (4.2.3) produktu PCR (4.2.7.1) oraz DNA wektora plazmidowego pUC19 (4.1.2) zostało poddane reakcji trawienia enzymami *Bam*HI i *Sall* w celu uzyskania lepkich końców pozwalających na dalsze klonowanie (4.1.9).

Składnik	Ilość [μl]
Produkt PCR / DNA plazmidu pUC19	16
Enzym <i>Bam</i> HI	1
Enzym <i>Sal</i> I	1
Bufor Tango 10x	2

Fragmety DNA będące produktami reakcji trawienia plazmidu pBADMyHisA oraz będące produktami reakcji trawienia produktu PCR zostały oczyszczone (4.2.3) oraz naniesione na żel agarozowy w celu kontroli procesu trawienia i oceny ilości niezbędnych komponentów do reakcji ligacji (4.2.4).

4.2.7.3. Reakcja ligacji

Reakcję ligacji fragmentu DNA pUC19/*Bam*HI*Sal*I z produktem PCR/*Bam*HI*Sal*I (4.2.7.2) prowadzono w temperaturze 16°C przez 2 h (4.1.10).

Składnik	Ilość [μl]
DNA plazmidu pUC19/ <i>Bam</i> HI <i>Sal</i> I	12
Produkt PCR/ <i>Bam</i> HI <i>Sal</i> I	3
Ligaza DNA faga T4	1
25 nM ATP	1,5
Bufor T4 10x	2,5
woda	2

4.2.7.4. Izolacja plazmidu pTrap

Uzyskaną mieszaniną ligacyjną (4.2.7.3) transformowano komórki *E. coli* TOP10F'. Komórki zostały następnie wysiane na podłoże LA zawierające IPTG, X-gal oraz ampicylinę w celu selekcji prawidłowych klonów (4.1.3). Uzyskane białe kolonie bakteryjne przesiano na podłoże LA z rodaminą B (4.1.3). Wyizolowano plazmidy z wybranych kolonii bakteryjnych (4.2.3). Uzyskane plazmidy naniesiono na żel agarozowy i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w celu oszacowania opóźnienia migracji wyizolowanych plazmidów względem plazmidu pUC19 (4.2.4). Plazmidy wykazujące opóźnienie migracji poddano analizie restrykcyjnej za pomocą enzymu *Hind*III (4.1.9).

Składnik	Ilość [μl]
DNA plazmidu pTrap lub pUC19	12
Enzym <i>Hind</i> III	1
Bufor R 10x	2
woda	5

Restryktaza *Hind*III rozpoznaje dwa miejsca w wektorze pTrap, okalające gen *rsfp*. W wyniku tego eksperymentu otrzymano oczekiwane produkty trawienia pTrap o wielkości 829 pz i 2757 pz. Plazmid pUC19 w takich warunkach ulega linearyzacji.

Otrzymany plazmid pTrap został zsekwencjonowany w celu sprawdzenia prawidłowości sekwencji nukleotydowej genu *rsfp* wprowadzonego do wektora pUC19.

4.2.8. Klonowanie fragmentów DNA genomowego *E. coli* do wektora pTrap

Wyizolowano DNA genomowe (4.2.3) *E. coli* TOP10F' (4.1.1), które poddano następnie reakcji trawienia enzymem restrykcyjnym *Bsp*143I (*Sau*3AI) (4.1.9). Wektor pTrap trawiono enzymem *Bam*HI (4.1.9), pozostawiającym lepkie końce 5' komplementarne do lepkich końców pozostawianych przez enzym *Sau*3AI. Miejsce rozpoznania dla restryktazy *Bam*HI w plazmidzie pTrap znajduje się przed genem *rsfp*.

Składnik	Ilość [μl]
DNA genomowe <i>E. coli</i> TOP10F'	30
Enzym <i>Bsp</i> 143I	3
Bufor <i>Bsp</i> 143I 10x	6
woda	2

Składnik	Ilość [μl]
DNA plazmidu pTrap	16
Enzym <i>Bam</i> HI	2
Bufor Yellow 10x	2

Uzyskane fragmenty DNA genomowego *E. coli* TOP10F' zostały włączone z użyciem ligazy DNA do DNA plazmidu pTrap w miejsce znajdujące się przez genem *rsfp*. Reakcję ligacji fragmentu DNA pTrap/*Bam*HI z fragmentami DNA genomowego *E. coli* TOP10F'/*Bsp*143I przeprowadzono w temperaturze 16°C, przez 18 h (4.1.10).

Składnik	Ilość [μl]
pTrap/BamHI	3
DNA genomowe <i>E. coli</i> TOP10F'/Bsp143I	18
Ligaza DNA faga T4	2
25nM ATP	2
Bufor 10x	3
woda	2

Po reakcji ligacji uzyskaną mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* DH5α (4.2.2), które następnie wysiano na podłoże zawierające rodaminę B (4.1.3) w celu selekcji klonów wykazujących fluorescencję w świetle UV o długości fali 312 nm. Fluorescencja kolonii bakteryjnych świadczyła o obecności promotora we wprowadzonym insercie.

Uzyskane plazmidy pTrap_insert (nazwane odpowiednio: pP1 - pP13) zostały rozdzielone w żelu agarozowym (4.2.4), a następnie zostały poddane analizie restrykcyjnej przy pomocy enzymu restrykcyjnego *HindIII* (4.1.9). W wyniku analizy restrykcyjnej otrzymano fragmenty o wielkości 829 pz oraz większe od 2757 pz. Wszystkie plazmidy zsekwencjonowano, a uzyskane wyniki zostały poddane analizie w celu określenia występowania sekwencji promotorowych.

4.2.9. Mutageneza ukierunkowana

Mutagenezę ukierunkowaną wykonano wykorzystując zestaw „QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit” firmy Stratagene.

Pierwszym etapem prowadzącym do uzyskania nowych wariantów sekwencyjnych białka RSFP było przeprowadzenie amplifikacji DNA przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych nie w pełni komplementarnych starterów oligonukleotydowych (4.1.11) na matrycy plazmidu pBAD-RSFP (4.2.6). Niekomplementarność ta jest konsekwencją występowania w sekwencji starterów trójki nukleotydów odpowiadającej kodonowi reszty aminokwasowej alaniny w miejscu występowania w sekwencji genu *rsfp* trójki nukleotydów kodującej odpowiednią resztę aminokwasową Ser22, Asp222, Asp224, Phe179. W przypadku reszty fenyloalaniny 179 oprócz wymiany tej reszty na resztę alaniny, wykonano także mutagenezę mające na celu wymianę tej reszty na resztę tyrozyny. Z powstałego w reakcji PCR DNA plazmidowego przy pomocy enzymu restrykcyjnego *DpnI* (specyficznego dla DNA zmetylowanego i hemimetylowanego) usuwana jest zmetylowana nić matrycowa. Nić DNA zsyntetyzowana w trakcie reakcji PCR jest niezmetylowana i nie ulega trawieniu tym enzymem, dzięki czemu może zostać wprowadzona na drodze transformacji do komórek *E. coli* XL10-Gold.

Skład mieszaniny reakcyjnej (50 μ l):

Składnik	Ilość [μ l]
DNA plazmidu pBAD-RSFP	2
starterF	1,2 (125 ng)
starterR	1,2 (125 ng)
50 mM MgCl ₂	1,7
10 mM dNTP mix	1
10× bufor reakcyjny	5
QuikSolution	3
polimeraza <i>Pfu</i> Ultra HF DNA (2.5 U/ μ l)	1
woda	36,6

Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR:

Denaturacja wstępna	95°C	60s	} 18 cykli
Denaturacja	95°C	50s	
Przyłączanie starterów	60°C	50s	
Wydłużanie starterów	68°C	300s	
Wydłużanie końcowe	68°C	420s	

Trawienie zmetylowanej nici DNA

W celu usunięcia macierzystego (zmetylowanego) DNA do mieszaniny reakcyjnej po reakcji PCR dodano 1 μ l enzymu restrykcyjnego *DpnI* (10 U/ μ l), mieszaninę wymieszano, a po odwirowaniu inkubowano w 37°C, przez 1 h.

Transformacja komórek *E. coli* XL10Gold

Do 50 μ l komórek kompetentnych *E. coli* XL10-Gold dodano 2 μ l produktów trawienia endonukleazą *DpnI*, a następnie postępowano zgodnie z procedurą transformacji zalecaną przez producenta zestawu.

DNA plazmidowe wybranych kolonii bakteryjnych zostało wyizolowane (4.2.3) i zsekwencjonowane.

4.2.10. Ekspresja genu *rsfp* w komórkach *E. coli* LMG194

4.2.10.1. Ekspresja pilotażowa genu *rsfp* w komórkach *E. coli* LMG194

DNA plazmidu pBAD-RSFP (4.2.6) transformowano komórki *E. coli* LMG194 (4.2.2). W celu optymalizacji warunków ekspresji przeprowadzono ekspresję pilotażową zgodnie z procedurą opisaną w „User Manual pBAD/His A, B, and C, pBAD/Myc-His A, B, and C, Vectors for Dose-Dependent Expression of Recombinant Proteins Containing N- or C-Terminal 6×His Tags in *E. coli*” firmy Invitrogen. Hodowlę komórek *E. coli* LMG194 zawierających plazmid

pBAD-RSFP prowadzono w 37°C w pożywce płynnej (4.1.3) z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) do momentu osiągnięcia gęstości optycznej zawiesiny $OD_{600}=0,5$. Następnie przeprowadzono indukcję ekspresji genu *rsfp* dodając 0,1 ml roztworu L-arabinozy (4.1.3) o odpowiednim stężeniu do 10 ml hodowli *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP, jak pokazuje tabela poniżej.

Wyjściowe stężenie arabinozy	Stężenie końcowe arabinozy w pożywce
0,002%	0,00002%
0,02%	0,0002%
0,2%	0,002%
2%	0,02%
20%	0,2%

Hodowlę po indukcji prowadzono w 30°C. Po upływie 4 h, a następnie 8 h, pobrano po 1 ml z każdej hodowli, zwirowano (4000 rpm, 5 min), uzyskane osady komórkowe zawieszono w 200 µl wody jałowej, pobrano 20 µl próbki i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym (4.2.5)

4.2.10.2. Ekspresja genu *rsfp* w komórkach *E. coli* LMG194

Komórki *E. coli* LMG194 transformowano (4.2.2) DNA plazmidu pBAD-RSFP (4.2.6). 20 ml hodowli nocnej *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP dodano do 780 ml podłoża płynnego LB z dodatkiem ampicyliny (4.1.3) i prowadzono hodowlę w 37°C do momentu osiągnięcia gęstości optycznej zawiesiny $OD_{600}=0,5$. Następnie do hodowli dodano 8 ml 20% roztworu arabinozy (4.1.3) i kontynuowano hodowlę przez 8 h w temperaturze 30°C. Po tym czasie hodowlę zwirowano (4000 rpm, 15 min, 4°C). Osad komórkowy zamrożono (-20°C).

Podobnie przeprowadzono ekspresję mutein RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A, RSFP-F179A oraz RSFP-F179Y wykorzystując komórki *E. coli* LMG194 transformowane odpowiednim plazmidem uzyskanym na drodze mutagenyzy ukierunkowanej (4.2.9).

4.2.11. Oczyszczanie białka RSFP

Osad komórkowy *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP (lub *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-D222A, *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-D224A, *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-D222AD224A, *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-F179A oraz *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-F179Y) zawieszono w 20 ml buforu A (4.1.12), po czym komórki zdeintegrowano za pomocą ultradźwięków. Otrzymany

lizat komórkowy zwirowano (20 min, 10000 rpm, 4°C). Osad odrzucono, supernatant nanoszono na uprzednio skalibrowaną buforem A (4.1.12) kolumnę jonowymienną Fractogel EMD DEAE. W celu elucji białek z kolumny zastosowano linowy gradient NaCl (0,05 - 1,5 M) w buforze A przy przepływie przez kolumnę 1ml/min. Frakcje zawierające białko RSFP, wyeluowane z kolumny przy stężeniu 0,42-0,45 M NaCl, zostały zebrane i poddane dializie wobec buforu A1 (4.1.13) w 4°C. Uzyskany preparat poddano rozdzielni elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym (4.2.5).

4.2.12. Oznaczanie stężenia białek

Stężenie białek wyznaczono stosując metodę opracowaną przez Bradford (1976).

4.2.13. Wyznaczenie masy molekularnej natywnego białka RSFP

Oczyszczony preparat białka RSFP (4.2.11) naniesiono na kolumnę do filtracji żelowej Superdex 200 10/300 GL uprzednio skalibrowaną buforem GL (4.1.13). Elucję przeprowadzono w tym samym buforze przy przepływie przez kolumnę 0,5 ml/min. Zastosowano następujące wzorce masowe: tyroglobulina ($M_r=669$ kDa), apoferrytyna ($M_r=440$ kDa), β -amylaza ($M_r=200$ kDa), dehydrogenaza alkoholowa ($M_r=150$ kDa), albumina surowicy bydlęcej (BSA) ($M_r=66$ kDa) oraz anhydraza węglanowa ($M_r=29$ kDa).

4.2.14. Technika sprawdzenia aktywności białka RSFP

Wykonano pomiar fluorescencji rodaminy B wywołanej obecnością białka RSFP w lizacie komórkowym *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP oraz frakcjach elucyjnych po oczyszczaniu białka RSFP. Skład próbek:

- 73 μ l analizowanej próbki oczyszczonego białka RSFP lub lizatu komórkowego *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP
- 7 μ l roztworu RB w buforze PBS (4.1.13) (C_k RB - 0,3 μ g/ml)
- 20 μ l buforu PBS (4.1.13)

Próbka kontrolna:

- 73 μ l buforu A1,
- 7 μ l roztworu RB w buforze PBS (4.1.13) (C_k RB - 0,3 μ g/ml)
- 20 μ l buforu PBS (4.1.13)

Kontrola negatywna:

- 73 μ l lizatu komórkowego *E. coli* LMG194/pBADMyHisA,
- 7 μ l roztworu RB w buforze PBS (4.1.13) (C_k RB - 0,3 μ g/ml)
- 20 μ l buforu PBS (4.1.13)

Sporządzono również mieszaniny o takim samym składzie, pozbawione RB. Tak przygotowane próbki analizowano w świetle UV (312 nm).

4.2.15. Pomiary spektrofotometryczne

4.2.15.1. Widma absorpcyjne i emisyjne rodaminy B w obecności RSFP

Widmo absorpcyjne UV-VIS rodaminy B (1,75 µg/ml) i oczyszczonego białka RSFP (0,023 mg/ml) w zakresie 200–700 nm sporządzono używając kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej 1 cm wykorzystując spektrofotometr Evolution 300 UV-VIS (Thermo Electron Corporation). Próba referencyjna zawierała bufor PBS. Pomiary przeprowadzono w temperaturze pokojowej.

Widma emisyjne RB (1,225 µg/ml) i białka RSFP (0,081 mg/ml) w zakresie 400–750 nm sporządzono wykorzystując spektrofotometr Infinite 200 (Tecan Group Ltd.). Pomiary przeprowadzono w temperaturze pokojowej.

Próbki do pomiaru wpływu obecności białka RSFP lub białek lizatu *E. coli* na właściwości spektralne RB przygotowywano mieszając roztwór wyjściowy RB (5,0 µg/ml) z odpowiednią objętością roztworu białka RSFP (3,2 mg/ml) lub lizatu białek *E. coli* LMG194/pBADMyHisA (2,3 mg/ml) i uzupełniano do końcowej objętości 2 mL buforem PBS. Widma absorpcyjne i emisyjne RB w tych próbach uzyskano w sposób opisany w poprzednich akapitach. Do pomiarów UV-VIS przygotowano próbki referencyjne, pozbawione RB, zawierające takie same stężenia białka RSFP lub białek lizatu *E. coli* LMG194/pBADMyHisA jak badana próbka zawierająca RB.

4.2.15.2. Widma emisyjne (wzbudzenie 554 nm i 557 nm) rodaminy B w obecności RSFP

Widma emisyjne rodaminy B wykonano stosując spektrofotometr luminescencyjny LS55 Perkin Elmer. Do sporządzenia próbek wykorzystano roztwór A1 (4.1.13). Skład próbek:

- **E:** rodamina B (30 ng/ml)
- **F:** rodamina B (30 ng/ml) oraz oczyszczone białko RSFP (0,07 mg/ml)
- **G:** rodamina B (30 ng/ml) oraz białka lizatu komórkowego *E. coli* LMG194/pBADMyHisA (0,07 mg/ml)
- **H:** rodamina B (30 ng/ml) oraz BSA (0,07 mg/ml)

Dla każdej z próbek przygotowano próbkę referencyjną o takim samym składzie, jednak nie zawierającą rodaminy B. Otrzymane roztwory wprowadzano do kuwety i przeprowadzano analizę spektralną.

4.2.15.3. *Pomiary metodą spektroskopii korelacji fluorescencji*

1. W pomiarach wiązania RB przez białko RSFP techniką spektroskopii korelacji fluorescencji wykorzystano:

- Roztwór rodaminy B o stężeniu C_0 wynoszącym 70 nM
- Roztwór białka RSFP o stężeniu C wynoszącym 30 μ M

Roztwór białka RSFP w buforze A1 (4.1.13) dodawano w odpowiedniej objętości do roztworu RB w buforze A1, tak aby uzyskać następujące stosunki stężeń molowych C/C_0 : 1; 2,5; 3,5; 5,5; 7,5; 10; 13,5; 22,5; 33; 52; 70; 93,5; 120.

2. W pomiarach wiązania RB przez muteiny RSFP wykorzystano:

- Roztwór rodaminy B o stężeniu C_0 wynoszącym 20 nM
- Roztwór RSFP-D222A o stężeniu C wynoszącym 18 μ M
- Roztwór RSFP-D224A o stężeniu C wynoszącym 33 μ M
- Roztwór RSFP-D222AD224A o stężeniu C wynoszącym 5 μ M
- Roztwór RSFP-F179A o stężeniu C wynoszącym 45 μ M
- Roztwór RSFP-F179Y o stężeniu C wynoszącym 50 μ M

Roztwór mutein w buforze A1 (4.1.13) dodawano w odpowiedniej objętości do roztworu RB w buforze A1 i uzyskano następujące stosunki stężeń molowych C/C_0 :

- C RSFP-D222A/ C_0 : 170
- C RSFP-D224A/ C_0 : 315
- C RSFP-D222AD224A/ C_0 : 240
- C RSFP-F179A/ C_0 : 430
- C RSFP-F179Y/ C_0 : 480

4.2.15.4. *Wygaszanie fluorescencji rodaminy B przez białko RSFP*

Widma absorpcyjne UV-VIS rodaminy B wykonane zostały przy zastosowaniu spektrofotometru Evolution 300 (Thermo Electron Corporation). Widma emisyjne RB wykonano stosując spektrofotometr luminescencyjny LS55 (Perkin Elmer) używając fali wzbudzenia o długości 554 nm. Roztwór RB wykonano stosując bufor A1. Doświadczenia prowadzono w temperaturze pokojowej zachowując stałe stężenie RB (0,8 μ M) i zmieniając stężenie RSFP (od 0,2 do 32 μ M).

4.2.15.5. *Widma absorpcyjne rodaminy B w obecności mutein RSFP*

Widma absorpcyjne RB w obecności białka RSFP i jego mutein (1 mg/ml) sporządzono wykorzystując spektrofotometr Evolution 300 UV-VIS (Thermo Electron Corporation). Próba

referencyjna zawierała bufor PBS lub bufor PBS z odpowiednim białkiem. Pomiar przeprowadzono w temperaturze pokojowej.

4.2.15.6. Pomiar spektrofotometryczny przeprowadzony w trakcie oceny przydatności szczepu ekspresyjnego gen *rsfp* jako biosensora rodamin B

2 ml hodowli bakteryjnej w pożywce płynnej z rodaminą B (4.2.1) wirowano (5000 rpm, 6 min), następnie uzyskany osad komórkowy przemywano roztworem soli fizjologicznej (4.1.13) i wirowano (5000 rpm, 6 min). Procedurę przemywania osadu komórek wykonywano 3 razy. Następnie osad komórkowy zawieszono w 2 ml soli fizjologicznej i wykonano pomiar fluorescencji oraz absorbancji.

Pomiary fluorescencji rodamin B związanej przez komórki *E. coli* oraz gęstości optycznej zawiesiny tych komórek dokonywano w temperaturze pokojowej przy użyciu czytnika mikroplątek Infinite 200 (Tecan Group Ltd.). Zastosowano falę wzbudzenia o długości 553 nm, a odczyt fluorescencji przeprowadzono przy długości fali 585 nm. Absorbancję mierzono przy długości fali 600 nm.

4.2.16. Oznaczanie aktywności enzymatycznej RSFP

Skład mieszanin kontrolnych:

1. próbka do wyznaczenia widma absorpcyjnego adeniny:

- adenina (100 μ M)
- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4

2. próbka reakcji adeniny i oksydazy ksantynowej:

- adenina (100 μ M)
- Oksydaza ksantynowa (0,1 U/ml)
- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4

3. próbka do wyznaczenia widma absorpcyjnego MTA:

- MTA (100 μ M)
- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4

Skład mieszanin reakcyjnych:

1. próbka kontrolna do wyznaczenia linii bazowej absorbancji:

- RSFP (0,2 mg/ml)
- Oksydaza ksantynowa (0,1 U/ml)
- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4

2. próbka kontrolna braku zdolności oksydazy ksantynowej do rozkładu MTA:

- MTA (100 μ M)
- Oksydaza ksantynowa (0,1 U/ml)
- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4

3. próbka reakcyjna z RSFP

- MTA (100 μ M)
- RSFP (0,2 mg/ml)
- Oksydaza ksantynowa (0,1 U/ml)
- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4

Mieszanki reakcyjne inkubowano w temperaturze pokojowej przed odpowiedni dla danego eksperymentu czas. Widma uzyskano wykorzystując spektrofotometr Thermo Electron Corporation Evolution 300.

4.2.17. Przygotowanie preparatów mikroskopowych

Komórki *E. coli* TOP10F' transformowane DNA plazmidu pUC19 oraz pP5 (4.1.2) inkubowano w podłożu płynnym uzupełnionym ampicyliną oraz rodaminą B (C_k RB= 1 μ g/ml). Po 18 h inkubacji w 37°C zwirowano (4000 \times g, 6 min) po 2 ml każdej hodowli. Uzyskane osady przemywano trzykrotnie 1 ml buforu PBS pH 7,4 i wirowano. Następnie osady bakteryjne zawieszono w 1 ml buforu PBS. 20 μ l otrzymanych zawiesin umieszczono na szkiełku podstawowym. Po wyschnięciu preparatu nakładano szkiełko nakrywkowe, a krawędzie preparatu zabezpieczono przed wysychaniem. Preparaty obserwowano pod mikroskopem Olympus BX60 w świetle widzialnym i zielonym.

4.2.18. Krystalizacja białka RSFP

Eksperymenty krystalizacyjne wykonano w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. 5 ml roztworu oczyszczonego białka RSFP dializowano w buforze Tris (4.1.13) o pH 7,0. Otrzymany roztwór białka zagęszczono wykorzystując koncentrator Viva-spin 10 kDa do końcowego stężenia białka 12 mg/ml. Tak przygotowany preparat został poddany krystalizacji. W celu otrzymania kompleksów białka RSFP z rodaminą B otrzymane kryształy białka RSFP inkubowano z 10 mM roztworem barwnika.

4.3. Programy komputerowe i bazy danych

Konstrukcji map genetycznych plazmidów dokonano za pomocą programu GENTle. Startery do reakcji PCR zaprojektowano wykorzystując program Vector NTI (Invitrogen). Analizę sekwencji nukleotydowych w celu porównania z sekwencjami zamieszczonymi w bazie GenBank przeprowadzono wykorzystując programy "nucleotide blast", "tblastn", pochodzące ze strony: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Masę cząsteczkową białka oraz jego punkt izoelektryczny obliczono przy pomocy programu Expasypl/MW (www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Analizę densytometryczną przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Quantity One 4.3.1.

Do analizy sekwencji promotorowych wykorzystano program Vecscreen i BPProm (http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfi_ndb) oraz Promoter Data Sets of RegulonDB version 7.4 (Gama-Castro i wsp., 2011).

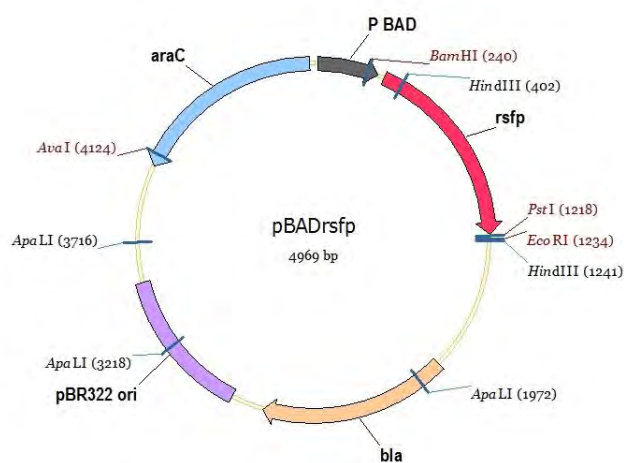
5. Wyniki

5.1. Otrzymanie białka RSFP

5.1.1. Konstrukcja wektora ekspresyjnego pBAD-RSFP

Gen *rsfp* pochodzący z plazmidu pPINK-uv został powielony przy użyciu techniki PCR i wprowadzony do wektora ekspresyjnego pBADMycHisA (4.2.6).

Otrzymany plazmid pBAD-RSFP (4.2.6) (rys. 22) poddano sekwencjonowaniu DNA w celu sprawdzenia prawidłowości sekwencji nukleotydowej genu *rsfp*. Wyniki sekwencjonowania potwierdziły, że gen *rsfp* wprowadzony do wektora nie różni się od natywnego genu *rsfp* (GenBank accession no.: GQ202582).

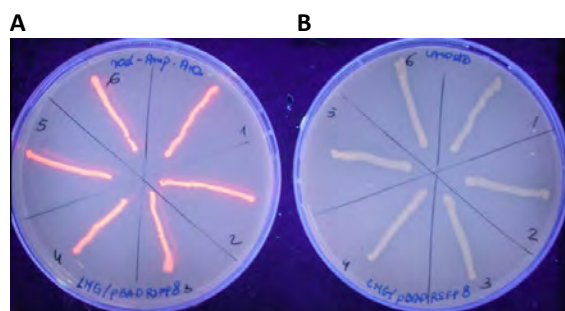


Rys. 22. Mapa plazmidu pBAD-RSFP. Skróty: pBR322 ori, *bla*, *araC*, *rsfp* i P_{BAD} oznaczają odpowiednio: origin replikacji pBR322, gen kodujący β-laktamazę, gen kodujący białko regulatorowe operonu arabinozowego, gen *rsfp* i promotor P_{BAD} (mapę wykonano w programie GENTLE)

5.1.2. Ekspresja genu *rsfp* w komórkach *E. coli* LMG194

Komórki *E. coli* LMG194 transformowano (4.2.2) DNA plazmidowym pBAD-RSFP (4.2.6). Uzyskano rekombinantowy szczep *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP. Komórki wysiano na podłoże LA-RB (4.1.3). Po 18 h inkubacji na powierzchnię jednej z płytek naniesiono 5 ml 20% roztworu arabinozy (4.1.3) celem indukcji ekspresji genu *rsfp* spod promotora arabinozowego. Następnie obie płytki inkubowano przez 4 h w 37°C. Po tym czasie można było zauważyć fluorescencję kolonii *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP w świetle UV (312 nm) na płytce na którą naniesiono roztwór arabinozy, co potwierdziło zdolność komórek do produkcji białka RSFP (rys. 23 A i B).

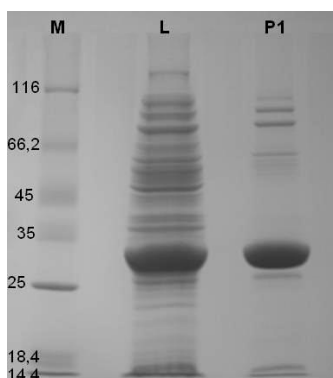
Przeprowadzono ekspresję genu *rsfp* (4.2.10).



Rys. 23. Fluorescencja komórek *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP w świetle UV (312 nm). Na płytkę A naniesiono roztwór arabinozy - kolonie wykazują ekspresję genu *rsfp*. Na płytkę B nie naniesiono roztworu arabinozy.

5.1.3. Oczyszczanie białka RSFP

Białko RSFP zostało oczyszczone z wykorzystaniem techniki FPLC (4.2.11). Wynik separacji elektroforetycznej SDS-PAGE oczyszczonego preparatu białka RSFP przedstawia rysunek 24 (4.2.5). Oczyszczone białko migruje w żelu poliakrylamidowym na wysokości około 30 kDa, co odpowiada masie molowej monomeru RSFP, wynoszącej 32 kDa, oszacowanej na podstawie sekwencji aminokwasowej białka (Gene Bank accession no.: ACS44285). Czystość preparatu białka oszacowano na około 90% (analiza densytometryczna) przy pomocy programu komputerowego Quantity One 4.3.1. Oszacowano także wydajność nadprodukcji białka RSFP w komórkach *E. coli* na około 75 mg L⁻¹ (4.2.12).

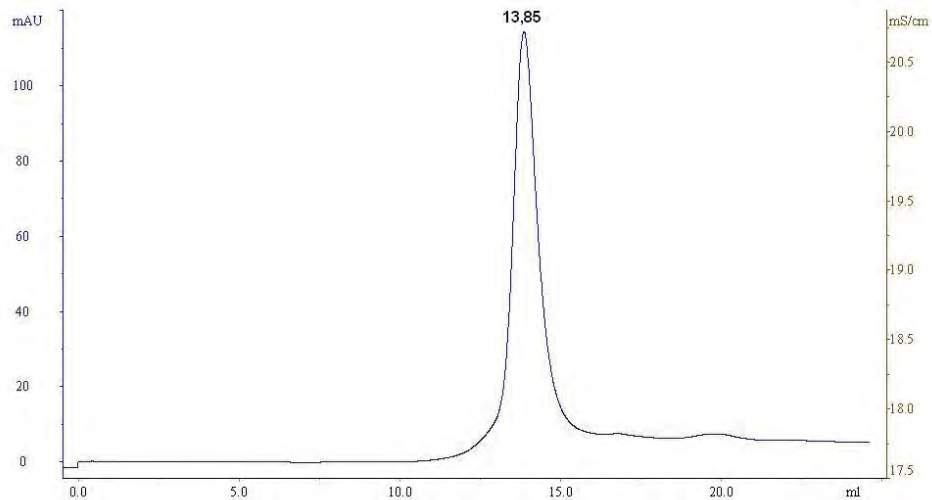


Rys. 24. Wynik rozdziału elektroforetycznego oczyszczonego preparatu RSFP (ścieżka P1), L – lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP; M- Marker masy cząsteczkowej białek (4.1.7).

5.1.3.1. Wyznaczenie masy molekularnej RSFP

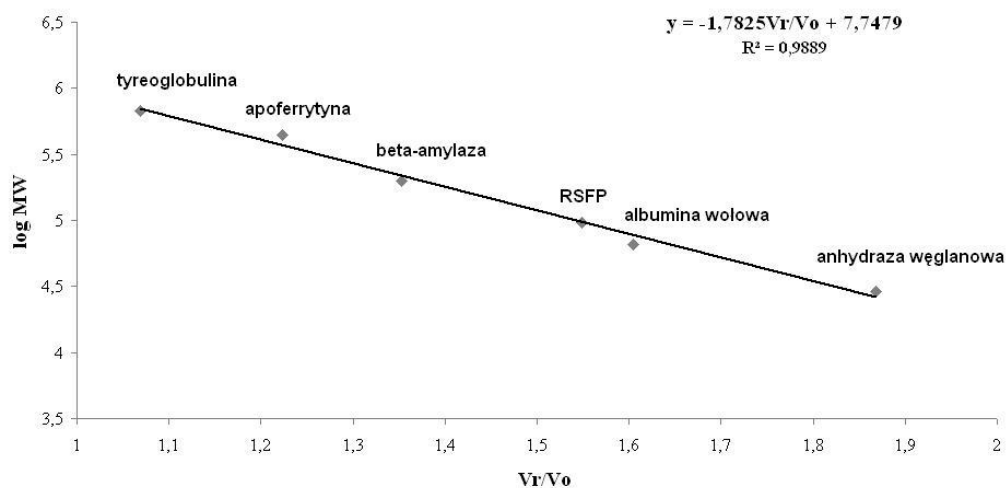
Masę molekularną natywnego białka RSFP wyznaczono wykorzystując analityczną filtrację żelową (4.2.13). Na podstawie uzyskanych wyników (rys. 25) ustalono, że natywne białko RSFP ma masę około 97 kDa, co pozwala na przyjęcie założenia, że jest trimerym składającym się z trzech identycznych podjednostek o masie około 32 kDa każda.

A)



B)

Superdex 200 HR 10/300 GL
AKTAPurifier GEHealthcare



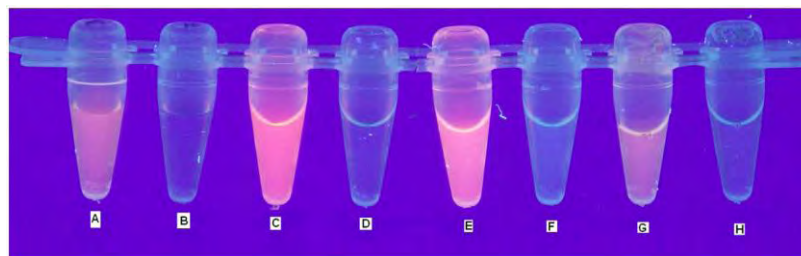
Rys. 25. A) Wykres sączenia molekularnego białka RSFP (V_r RSFP=13,85).

B) Krzywa kalibracyjna $\log MW = f(V_r/V_o)$ kolumny Superdex 200 HR 10/300 GL.

5.1.4. Zbadanie zdolności preparatu białka RSFP do wywoływania fluorescencji rodaminy B

W celu określenia czy obserwowana w świetle UV *in vivo* fluorescencja kolonii *E. coli* wykazujących ekspresję genu *rsfp* rosnących na podłożu w rodaminę B (2.1) związana jest wyłącznie z białkiem RSFP czy też wymagane do jej powstania są dodatkowe składniki (białka *E. coli*) opracowano test „próbówkowy” umożliwiający zbadanie zdolności oczyszczonego preparatu białka RSFP do wywoływania fluorescencji RB *in vitro* (4.2.14). Porównano fluorescencję w świetle UV (312 nm) próbek zawierających następujące roztwory: RB w buforze PBS (A), bufor PBS (B), RB + RSFP w buforze PBS (C), RSFP w buforze PBS (D),

RB + lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP (E), lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP w buforze PBS (F), RB + lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBADMycHisA w buforze PBS (G), lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBADMycHisA w buforze PBS (H). Wynik testu przedstawia rysunek 26. Nie zaobserwowano fluorescencji w próbce zawierającej białko RSFP przy braku RB (próbka D na rys. 26). Fluorescencji nie wykazywał także lizat komórek *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP produkujących białko RSFP oraz lizat komórek *E. coli* LMG194/pBADMycHisA niezdolnych do produkcji białka RSFP (próbki F i H na rys. 26). Próbki zawierające RB w obecności białka RSFP (próbka C na rys. 26) i w obecności lizatu komórek *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP produkujących białko RSFP (próbka E na rys. 26) charakteryzowały się silną fluorescencją, w przeciwieństwie do próbki zawierającej RB w buforze PBS (próbka A na rys. 26) oraz próbki zawierającej RB i lizat komórek *E. coli* LMG194/pBADMycHisA nie produkujących białka RSFP (próbka G na rys. 26).



Rys. 26. Porównanie fluorescencji w świetle UV (312 nm): RB w buforze PBS (A), bufor PBS (B), RB + RSFP w buforze PBS (C), RSFP w buforze PBS (D), RB + lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP (E), lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP w buforze PBS (F), RB + lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBADMycHisA w buforze PBS (G), lizat komórkowy *E. coli* LMG194/pBADMycHisA w buforze PBS (H) (Bartasun i wsp., 2013).

Należy podkreślić, że we wszystkich próbkach wykazujących fluorescencję znajdowała się rodamina B, natomiast w próbkach pozbawionych RB fluorescencja nie została zaobserwowana. W próbkach zawierających białko RSFP i RB obserwowano wyraźny wzrost fluorescencji w porównaniu do próbek zawierających wyłącznie RB, pomimo, że we wszystkich badanych próbkach zawierających RB końcowe stężenie barwnika było takie samo.

Podsumowanie

W układzie arabinozowym możliwe było uzyskanie preparatu rozpuszczalnego białka RSFP, co nie udało się w układzie Tabora-Studiera (Cieśliński i wsp., 2009). Udowodniono, że składnikami koniecznymi do powstawania fluorescencji kolonii *E. coli* wykazującej ekspresję genu *rsfp*, opisaną w rozdziale 2.1, są rodamina B i białko RSFP (Bartasun i wsp., 2013). Zmiana we właściwościach spektralnych rodaminy B możliwa jest do zaobserwowania zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

5.2. Charakterystyka białka RSFP

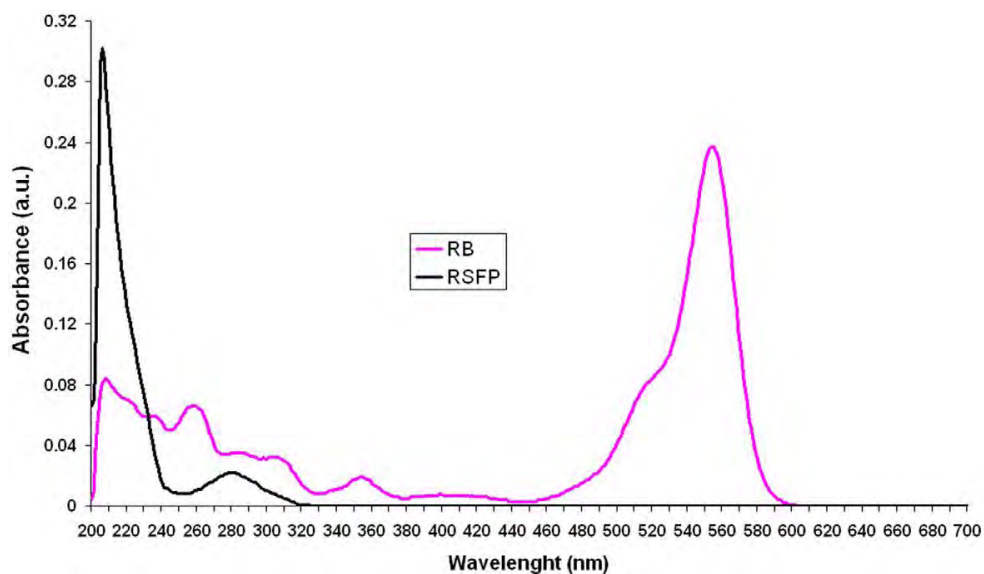
5.2.1. Badanie wpływu obecności białka RSFP na właściwości spektralne rodamininy B

Na podstawie wyników testu próbkiowego (5.1.4) stwierdzono bezpośredni wpływ białka RSFP na fluorescencję rodamininy B, co oznacza, że obecność białka RSFP zmienia właściwości spektralne tego barwnika. W celu określenia kierunku tych zmian oraz ustalenia mechanizmu oddziaływania pomiędzy cząsteczkami białka RSFP a RB, przeprowadzono m.in. badania spektroskopowe RB w obecności i przy braku białka RSFP.

5.2.1.1. Widma absorpcyjne i emisyjne rodamininy B w obecności RSFP

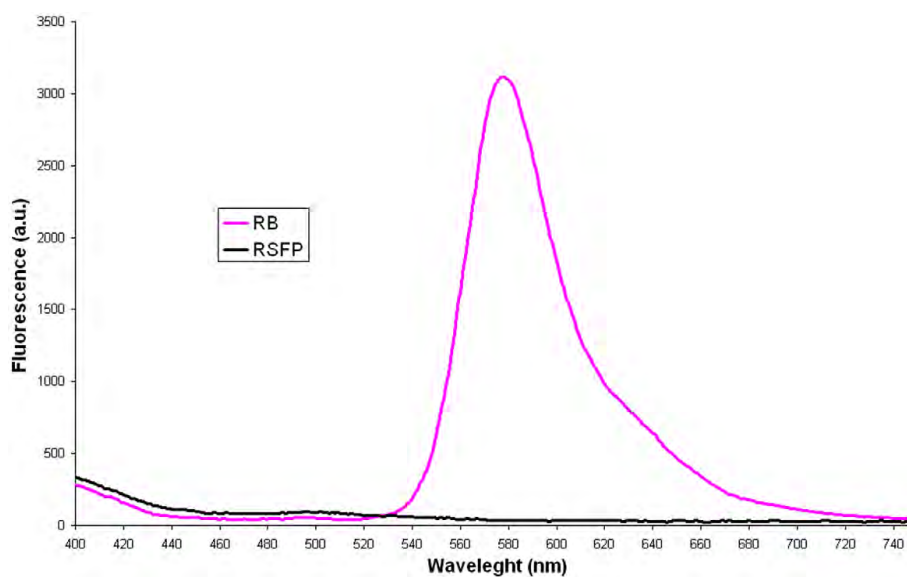
Uzyskano widma absorpcyjne w zakresie długości fal od 200 do 700 nm (zakres UV-VIS) oczyszczonego białka RSFP, rodamininy B oraz rodamininy B w obecności białka RSFP (4.2.15.1).

Oczyszczony preparat białka RSFP (wykres w kolorze czarnym na rys. 27) wykazał najwyższą absorpcję w zakresie od 200 nm do 240 nm, z maksimum przy długości fali 212 nm, charakterystycznym dla wiązań peptydowych obecnych w białkach. Wzrost absorpcji obserwowano także w zakresie długości fali od 260 nm do 320 nm, z maksimum w 280 nm, co świadczy o obecności w białku RSFP aromatycznych reszt aminokwasowych, takich jak tryptofan (Deyl i Miksik, 1998). Natomiast, widmo absorpcyjne roztworu RB w buforze PBS wykazało maksimum absorpcji przy 554 nm (wykres w kolorze różowym na rys. 27). W odniesieniu do wyników testu próbkiowego (5.1.4) oraz obserwacji zjawiska różowej fluorescencji kolonii *E. coli*/pPINK-uv (2.1) warto zauważyć, że absorpcja białka RSFP oraz absorpcja RB przy długości fali 312 nm (długość fali użytej w obu doświadczeniach do wzbudzenia fluorescencji) jest w obu analizowanych przypadkach znacząco niższa niż maksymalna absorpcja obserwowana dla oczyszczonego białka RSFP (212 nm, wykres w kolorze czarnym na rys. 27) oraz RB (554 nm, wykres w kolorze różowym na rys. 27).



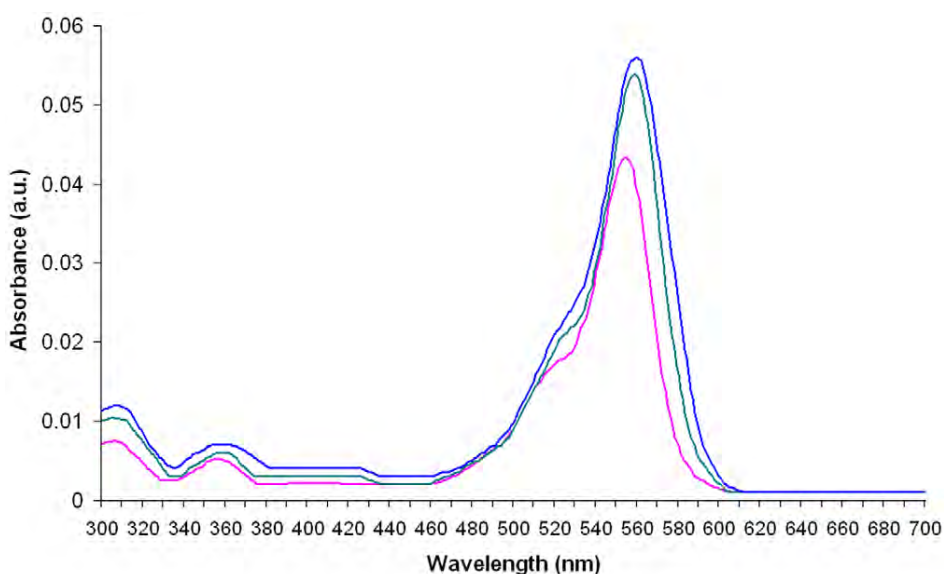
Rys. 27. Widmo absorpcyjne UV-VIS rodaminy B (RB; 1,75 $\mu\text{g/ml}$) i białka RSFP (0,023 mg/ml).

Uzyskano również widma emisyjne oczyszczonego białka RSFP oraz roztworu RB dla fali wzbudzenia o długości 312 nm (4.2.15.1). Widmo emisyjne białka RSFP uzyskane w tych warunkach przedstawia wykres w kolorze czarnym na rys. 28. Preparat białka RSFP nie wykazuje fluorescencji w zakresie światła widzialnego (400-700 nm). Natomiast, w widmie rodaminy B wzbudzonej falą o tej samej długości obserwuje się wysoką intensywność fluorescencji w zakresie 550 – 640 nm (zakres światła: zielone, żółte, czerwone) o maksimum emisyjnym w 578 nm (wykres w kolorze różowym na rys. 28). Pozwala to na stwierdzenie, że białko RSFP nie jest białkiem autofluorescencyjnym takim jak np. GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) (Chalfie, 1995) i nie posiada grup chromoforowych mogących odpowiadać za zjawisko fluorescencji w zakresie światła widzialnego. Ponadto, wyniki przedstawionych powyżej doświadczeń, potwierdzają wnioski płynące z analizy wyników testu probówkowego (5.1.4).

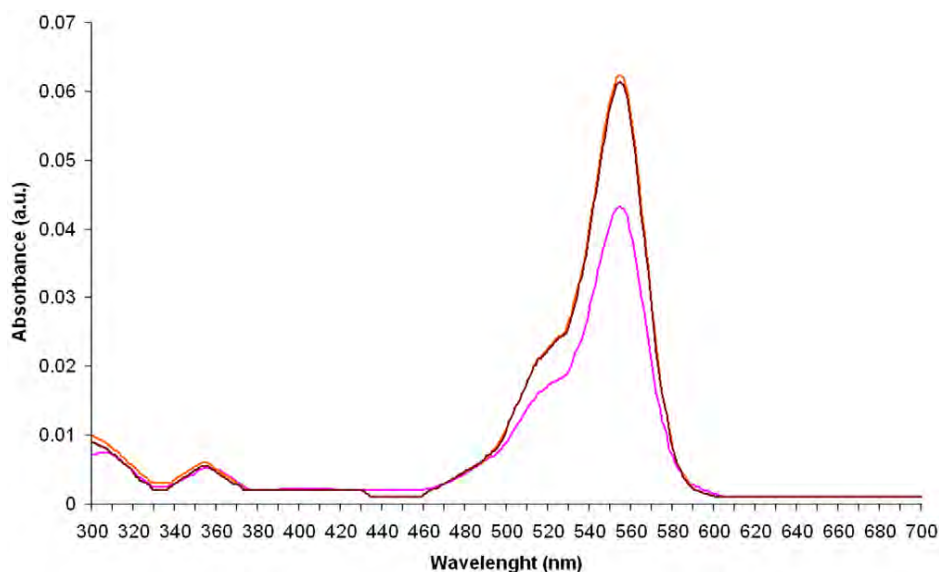


Rys. 28. Widmo emisyjne rodaminy B (RB; 1,225 $\mu\text{g/ml}$) i białka RSFP (0,081 mg/ml).

Zbadano wpływ białka RSFP oraz białek *E. coli* na właściwości spektralne rodaminy B. W tym celu otrzymano widma absorpcyjne RB w obecności oraz przy braku RSFP i białek *E. coli* (4.2.15.1). Obserwuje się przesunięcie widma absorpcyjnego RB w obecności RSFP (wykres w kolorze zielonym i niebieskim na rys. 29) w kierunku fal dłuższych (przesunięcie batochromowe) w stosunku do widma absorpcyjnego czystej RB (wykres w kolorze różowym na rys. 29 i 30) lub rodaminy B w obecności lizatu komórek *E. coli* (wykres w kolorze brązowym i pomarańczowym na rys. 30). Ponadto, maksimum absorbancji dla RB w próbkach zawierających lizat komórek *E. coli* lub dla czystej RB występuje w 554 nm, co zgodne jest z danymi literaturowymi dla roztworu RB w wodzie (Kemnitz i wsp., 1986). Na tej podstawie stwierdzić można, że białka *E. coli* pozostające po oczyszczeniu w roztworze RSFP nie mają wpływu na obserwowane zjawisko fluorescencji oraz na przesunięcie widma absorpcyjnego RB w obecności RSFP, a także, że białka obecne w komórkach klonu *E. coli*/pPINK-uv (2.1) nie miały istotnego wpływu na zmianę właściwości spektroskopowych RB.



Rys. 29. Widma absorpcyjne UV-VIS rodaminy B: wykres w kolorze różowym – RB (0,35 $\mu\text{g/ml}$) w PBS; wykres w kolorze zielonym i niebieskim – RB (0,35 $\mu\text{g/ml}$) w obecności RSFP. Stężenie białka RSFP w pierwszej próbce (wykres w kolorze zielonym) było dwa razy wyższe niż stężenie RSFP (0,023 mg/ml) w drugiej próbce (wykres w kolorze niebieskim).

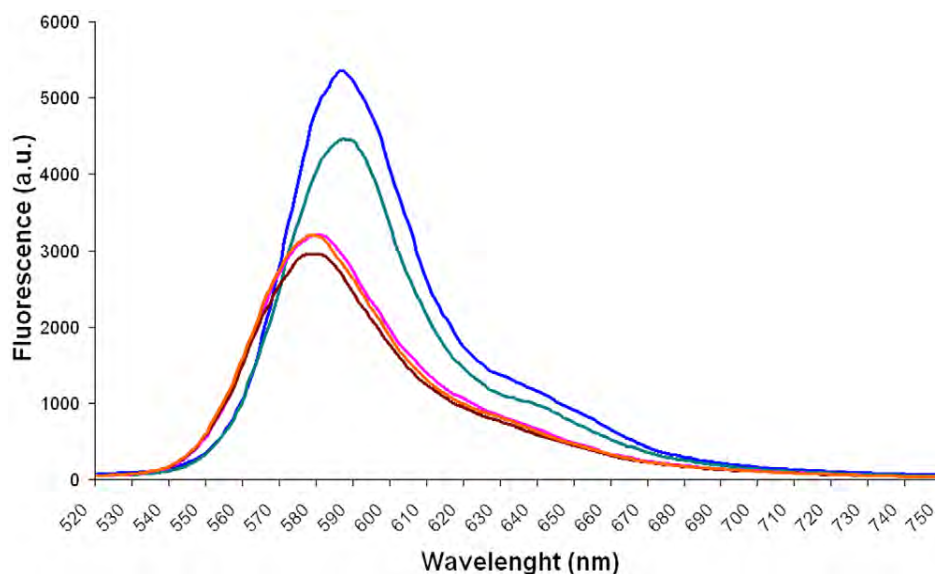


Rys. 30. Widma absorpcyjne UV-VIS rodaminy B: wykres w kolorze różowym – RB (0,35 $\mu\text{g/ml}$) w PBS; wykres w kolorze brązowym i pomarańczowym – RB (0,35 $\mu\text{g/ml}$) w obecności lizatu komórkowego *E. coli*. Stężenie białek lizatu komórkowego *E. coli* w pierwszej próbce (wykres w kolorze brązowym) było dwa razy wyższe niż stężenie białek lizatu komórkowego *E. coli* (0,023 mg/ml) w drugiej próbce (wykres w kolorze pomarańczowym).

Analiza widm rodaminy B przedstawionych na rysunkach 29 i 30 wskazuje na wzrost wielkości absorpcji RB w obecności białka RSFP jak również białek lizatu komórkowego *E. coli*. Według Zhao i in. (2009) intensywność absorpcji RB w rozpuszczalnikach polarnych zmienia się wskutek oddziaływania RB z rozpuszczalnikiem. W rozpuszczalniku polarnym cząsteczki RB występować mogą w formie jonu obojnaczego (RB^{\pm}) lub kationu (RB^{+}) zdolnego do oddziaływania z anionem, np. chlorkowym. Jon obojnaczy oraz para kationów mogą tworzyć dimery w roztworach wodnych (Zhao i wsp., 2009; Ramette i Sandell, 1956). Dimery RB tworzone są przez oddziaływanie elektrostatyczne i siły van der Waals'a oraz wiązania wodorowe. Dimery RB uważane są za niezdolne do fluorescencji w rozpuszczalnikach o niskiej lepkości jakim jest woda w temperaturze pokojowej (Kemnitz i wsp., 1986). Dodatek białka RSFP lub białek lizatu komórkowego *E. coli* prawdopodobnie prowadzi do zmiany właściwości fizykochemicznych roztworu zawierającego RB. Zmieniony rozkład ładunku w roztworze oraz osłabione wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody i cząsteczką RB powodują rozpad dimeru barwnika (Zhao i wsp., 2009). Wyższe stężenie monomerów RB w roztworze może prowadzić do wzrostu intensywności absorpcji barwnika w roztworze zawierającym dodatek oczyszczonego białka RSFP lub białek *E. coli* (rys. 29 i 30).

Uzyskano widma emisyjne preparatu rodaminy B oraz rodaminy B w obecności białka RSFP oraz białek lizatu *E. coli* (4.2.15.1). Analiza widm emisyjnych RB w obecności RSFP (wykres w kolorze niebieskim i zielonym na rys. 31) wskazuje na przesunięcie widm w kierunku fal

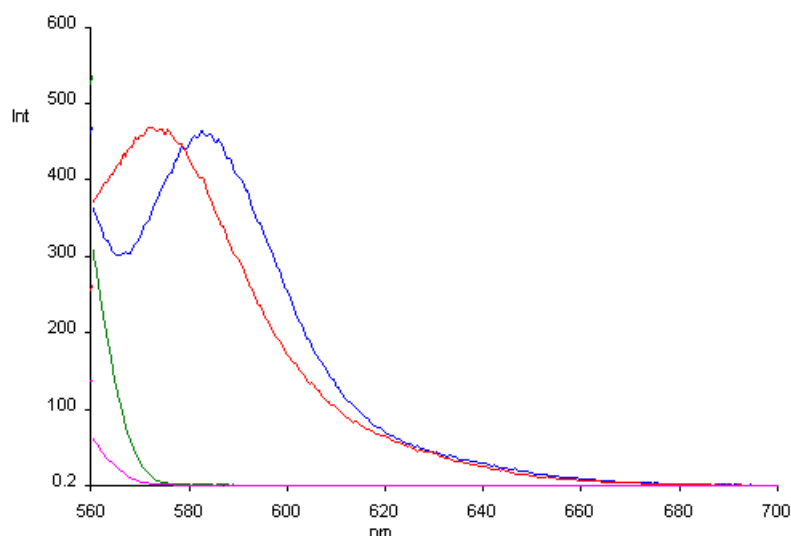
dłuższych w porównaniu do widma czystej RB lub RB w obecności białek lizatu komórkowego *E. coli* (odpowiednio: wykres w kolorze różowym, pomarańczowym i brązowym na rys. 31).



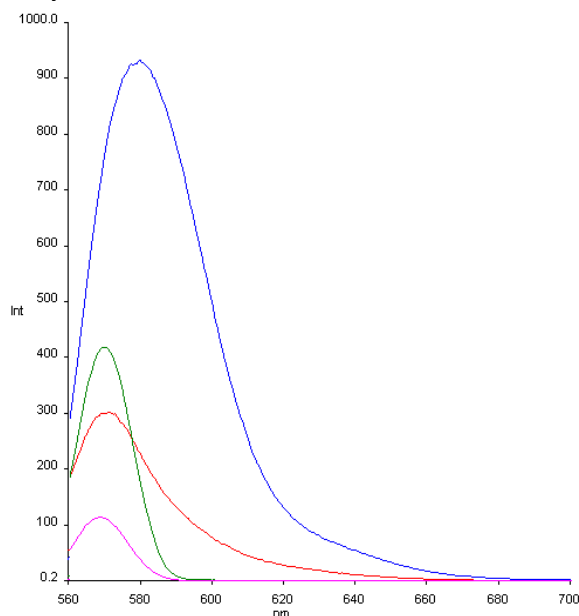
Rys. 31. Widmo emisyjne rodaminy B: RB (1,225 $\mu\text{g/ml}$) w PBS (wykres w kolorze różowym); RB (1,225 $\mu\text{g/ml}$) w obecności białka RSFP i białek lizatu komórkowego *E. coli*. Stężenie białka RSFP (0,162 mg/ml , wykres w kolorze zielonym) i białek lizatu komórkowego *E. coli* (0,162 mg/ml , wykres w kolorze pomarańczowym) było, odpowiednio, dwa razy większe niż stężenie białka RSFP (0,081 mg/ml , wykres w kolorze niebieskim) i białek lizatu komórkowego *E. coli* (0,081 mg/ml , wykres w kolorze brązowym).

Podsumowując, przesunięcie batochromowe (w kierunku fal dłuższych) widm absorpcyjnych i emisyjnych rodaminy B może świadczyć o zmianie polarności środowiska w jakim znalazła się cząsteczka RB wskutek jej transferu w procesie adsorpcji z roztworu wodnego na powierzchnię makromolekuły (Gollnick i wsp., 1981; Kemnitz i wsp., 1983; Kemnitz i wsp., 1986; Van der Auweraer i wsp. 1988; Zhu i wsp., 2009). Podobne wyniki pomiarów absorpcyjności, charakteryzujące się obecnością przesunięcia batochromowego widma uzyskano dla innego niż RB barwnika ksantenowego - eozyny w obecności białka albuminy wołowej (BSA). W tym przypadku także stwierdzono, że zmiany w widmach absorpcyjnych mogą zostać wyjaśnione adsorpcją cząsteczek eozyny na powierzchni BSA, co prowadzi do tworzenia kompleksu BSA – eozyna (Gao i wsp., 2007; Birla i wsp., 2004). Można więc stwierdzić, że obecność przesunięcia widma RB w obecności RSFP w kierunku fal dłuższych (rys. 29 i 31) świadczy o adsorpcji cząsteczek RB na powierzchni białka RSFP. Ponadto, na rysunku 31 zaobserwować można wzrost fluorescencji RB w obecności RSFP oraz brak wzrostu intensywności fluorescencji w obecności białek *E. coli*. Wyniki te są zbieżne z wynikami uzyskanymi w teście próbówkowym (5.1.4; próbki C i E na rys. 26). Wzrost intensywności RB w obecności RSFP jest spowodowany oddziaływaniami pomiędzy cząsteczką RB a cząsteczką RSFP, jakie zachodzą po utworzeniu stabilnego kompleksu.

Obecność przesunięć batochromowych w widmie rodaminy B w obecności RSFP, charakterystycznych dla utworzenia kompleksu RB-RSFP została potwierdzona dodatkowo poprzez uzyskanie widm emisyjnych RB w obecności białka RSFP stosując długość fali wzbudzenia 554 nm, w której występowało maksimum absorpcji RB (wykres w kolorze różowym na rys. 27) oraz 557 nm, w której występowało maksimum absorpcji RB w obecności RSFP (wykres w kolorze zielonym i niebieskim na rys. 29) (4.2.15.2). W obu przypadkach (rys. 32 i 33) następowało przesunięcie wartości maksimum emisji RB w obecności RSFP, w stosunku do widma czystej RB, w kierunku fal dłuższych, co potwierdza teorię adsorpcji cząsteczek RB na powierzchni białka RSFP.



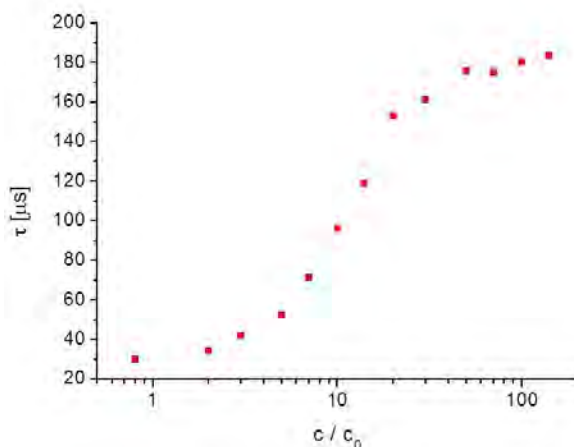
Rys. 32. Widma fluorescencyjne rodaminy B (długość fali wzbudzenia: 554nm): RB w buforze A1 – kolor czerwony; bufor A1 – kolor różowy; RB w buforze A1+RSFP w buforze A1– kolor niebieski; RSFP w buforze A1 – kolor zielony.



Rys. 33. Widma fluorescencyjne rodaminy B (długość fali wzbudzenia: 557 nm): RB w buforze A1 – kolor czerwony; bufor A1 – kolor różowy; RB w buforze A1+RSFP w buforze A1– kolor niebieski; RSFP w buforze A1 – kolor zielony.

5.2.1.2. Badanie oddziaływania rodaminę B z RSFP metodą spektroskopii korelacji fluorescencji

W celu potwierdzenia wiązania cząsteczek RB z białkiem RSFP (5.2.1.1) zastosowano technikę FCS (2.4.1). W badaniu wiązania cząsteczek rodaminę B do białka RSFP tą techniką zastosowano wzrastający stosunek stężenia molowego białka RSFP do stężenia molowego rodaminę B (4.2.15.3). Wykorzystano bardzo niskie stężenie RB, wynoszące 70 nM. Tak niskie stężenie barwnika pozwala na obserwację ruchu jedynie kilku cząsteczek jednocześnie i dokładny pomiar czasu dyfuzji związku w objętości konfokalnej. Im niższe stężenie barwnika fluorescencyjnego, tym wyższa amplituda fluktuacji i tym łatwiejsza do zaobserwowania zmiana w ruchu cząsteczki. Określono średni czas dyfuzji cząsteczki RB w buforze fosforanowym, który wynosił 29 μs . Po dodaniu roztworu białka RSFP do roztworu RB czas dyfuzji barwnika przez objętość konfokalną zmienia się. Wraz ze wzrostem stosunku stężenia molowego białka RSFP (C) do stężenia molowego RB (C_0) czas dyfuzji barwnika wzrasta i w najwyższym punkcie wynosi 185 μs (rys. 34). Wskazuje to na oddziaływanie cząsteczek RB z RSFP i wiązania cząsteczek barwnika z białkiem. Co warto podkreślić, w czasie pomiarów FCS zaobserwowano wysycenie białka RB w zakresie stosunków stężeń molowych C/C_0 : 52, 70, 93, 120. Czas dyfuzji w tym zakresie pozostaje niezmienny lub zmienia się nieznacznie. Świadczy to o tym, że wszystkie cząsteczki RB w badanym roztworze zostały związane przez białko RSFP i w preparacie nie występują już wolne cząsteczki barwnika. Dla stosunku C/C_0 wynoszącego 52 prawdopodobnie wszystkie miejsca wiązania RB w białku RSFP zostały zajęte przez RB. W przypadku wyższego stężenia białka (stosunki stężeń molowych C/C_0 : 52, 70, 93, 120) przypuszczać można, że nie wszystkie miejsca wiązania RB w białku RSFP zajęte są przez cząsteczki barwnika. Ponadto, wynik ten oznacza, że na powierzchni białka RSFP istnieje specyficzne miejsce lub miejsca wiązania dla cząsteczek RB.

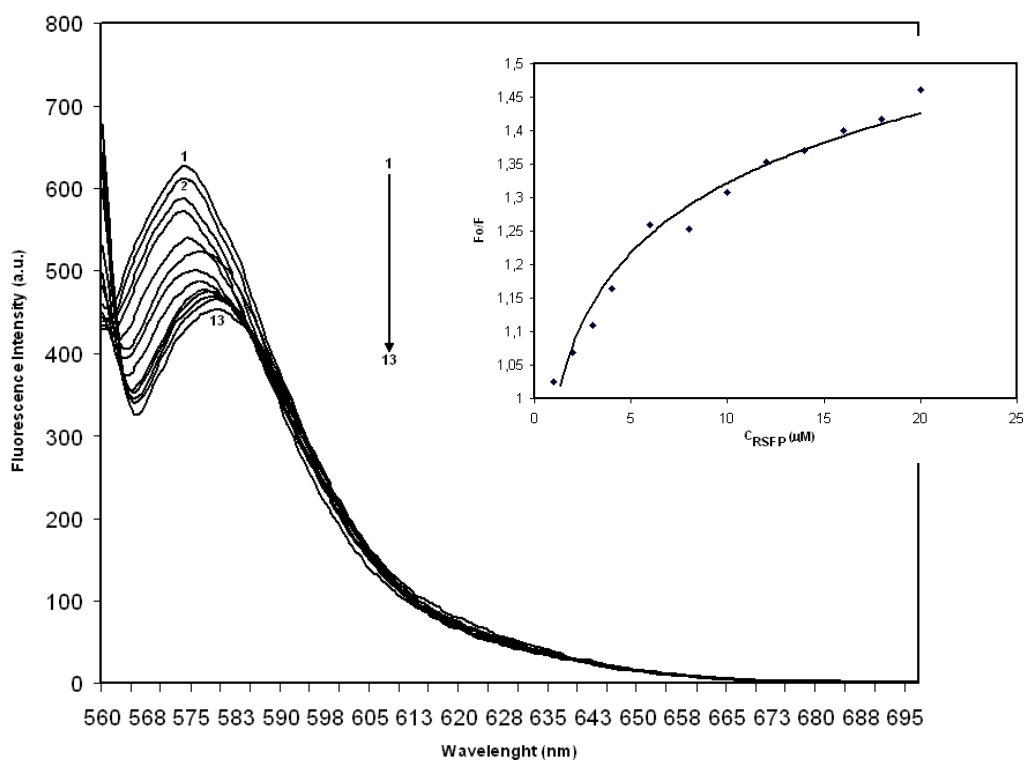


Rys. 34. Wykres zależności czasu dyfuzji τ od stosunku stężenia RSFP do RB C/C_0 (wraz ze wzrostem stężenia RSFP obserwuje się wydłużenie czasu dyfuzji).

5.2.1.3. Wygaszanie fluorescencji rodaminy B przez białko RSFP

Wyniki badań techniką FCS (5.2.1.2) potwierdziły fakt wiązania cząsteczek rodaminy B z białkiem RSFP, wskazały także na istnienie specyficznego miejsca lub miejsc wiązania cząsteczek RB na powierzchni białka RSFP. Kolejnym etapem badań było określenie liczby miejsc wiązania RB, do którego wykorzystano pomiar wygaszania fluorescencji RB przez białko RSFP.

W celu dokładniejszego zrozumienia mechanizmu wiązania RB do białka RSFP wykorzystano metodę opartą o wyznaczenie i analizę przebiegu wykresu Sterna-Volmera dla RB w obecności RSFP. Podobna metoda została zastosowana w badaniu oddziaływań barwnika eozyny z BSA (Birla i wsp., 2004). Uzyskano widma fluorescencyjne RB w obecności wzrastającego stężenia RSFP (4.2.15.4), które przedstawiono na rysunku 35. Ponieważ przy niskich stężeniach białka względem barwnika obserwowano wzrost fluorescencji RB (5.2.1.1), starano się dobrać takie warunki eksperymentu, aby uzyskać wygaszanie fluorescencji barwnika w obecności RSFP. Przy stosunku molowym RSFP-RB 2,5 intensywność emisji RB obniżyła się o około 10%. Przy stosunku molowym RSFP-RB większym od 3,75 zaobserwować można także przesunięcie batochromowe widm.



Rys. 35. Widma emisyjne RB w obecności RSFP: RB (wykres 1), spadek fluorescencji RB w obecności RSFP (wykresy 2-13) (c_{RSFP} : 0,2-32 μ M), λ_{exc} . 554 nm, c_{RB} = 0,8 μ M; ramka pokazuje wykres Sterna-Volmera dla RB w obecności RSFP.

Sporządzono wykres Sterna-Volmera przedstawiający zależność intensywności fluorescencji rodaminy B od stężenia białka RSFP (ramka na rysunku 36). Wykres ten wykazuje odchylenie od linii prostej w kierunku osi x, a taki kształt uzyskanej krzywej wskazuje na istnienie w cząsteczce białka RSFP miejsc wiązania RB charakteryzujących się różną dostępnością dla barwnika (2.4.2.1). Oznacza to, że wygaszanie fluorescencji może mieć charakter mieszany – statyczny i dynamiczny (2.4.2.1), ponieważ cząsteczka RB występuje w dwóch populacjach, które nie są dostępne dla wygaszacza (białka) w takim samym stopniu.

Uzyskane wyniki nie pozwoliły jednak na określenie ilości miejsc wiązania RB w białku RSFP. Z tego względu otrzymano i przeanalizowano struktury krystaliczne RSFP oraz RSFP w kompleksie z RB.

5.2.2. Wyniki badań krystalograficznych białka RSFP

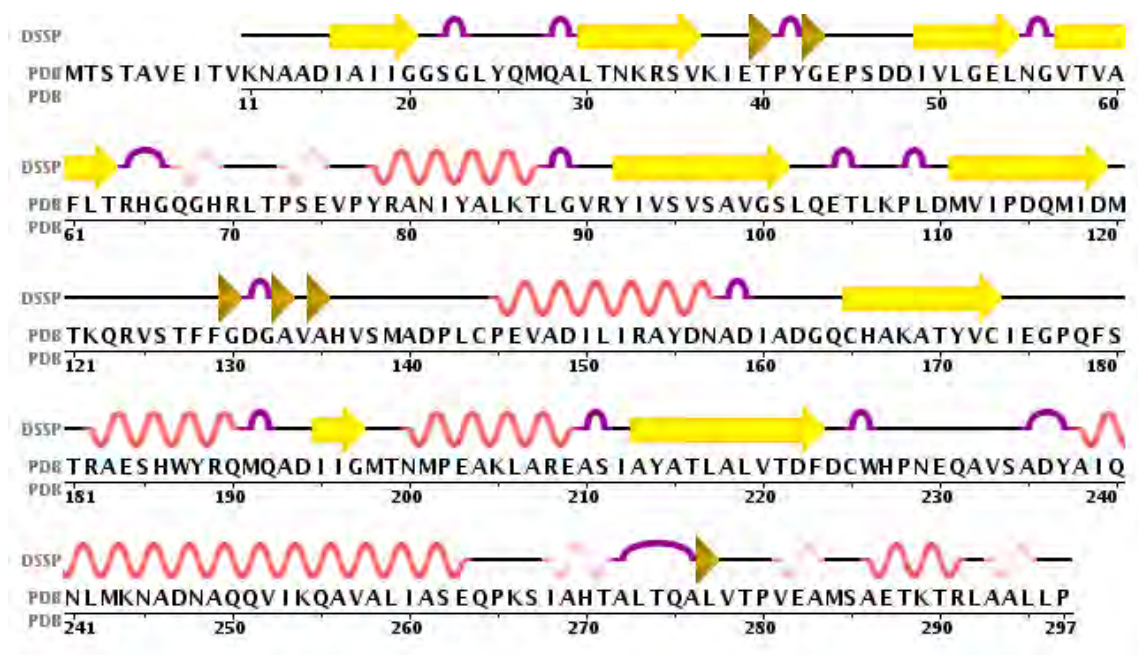
Wykorzystując techniki spektroskopowe dowiedziono, że zachodzi wiązanie cząsteczek rodaminy B z białkiem RSFP oraz stwierdzono istnienie więcej niż jednego miejsca wiązania barwnika na powierzchni białka. W celu określenia lokalizacji i ilości miejsc wiązania RB na powierzchni RSFP we współpracy z dr Anną Bujacz z zespołu prof. Grzegorza Bujacza z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej (4.2.18) otrzymano struktury krystaliczne.

5.2.2.1. Struktura natywnego białka RSFP

Białko RSFP w formie natywnej (PDB ID: 4GLF) zbudowane jest z trzech identycznych podjednostek (rys. 38A) złożonych z α -helis i β -kardtek. W centrum każdego asymetrycznego monomeru znajduje się osiem β -nici. Po jednej stronie tej struktury znajdują się dwie długie α -helisy, zaś po przeciwnej znajduje się pięć α -helis, trzy równoległe β -nici oraz sieć pętli (rys. 36, 37A).

Pętla obejmująca reszty aminokwasowe Met120 – Arg124 i α -helisa zbudowana z reszt aminokwasowych Thr181 - Met191 znajdują się w pobliżu trójrotnej osi symetrii trimeru i oddziałują one ze swoimi odpowiednikami w pozostałych monomerach. Najdłuższa α -helisa (reszty aminokwasowe Asp238 - Ser262) i α -helisa obejmująca reszty aminokwasowe Ile268 – Ala276 znajdują się na powierzchni białka i nadają trimerowi kształt trójkąta (Rys. 39A).

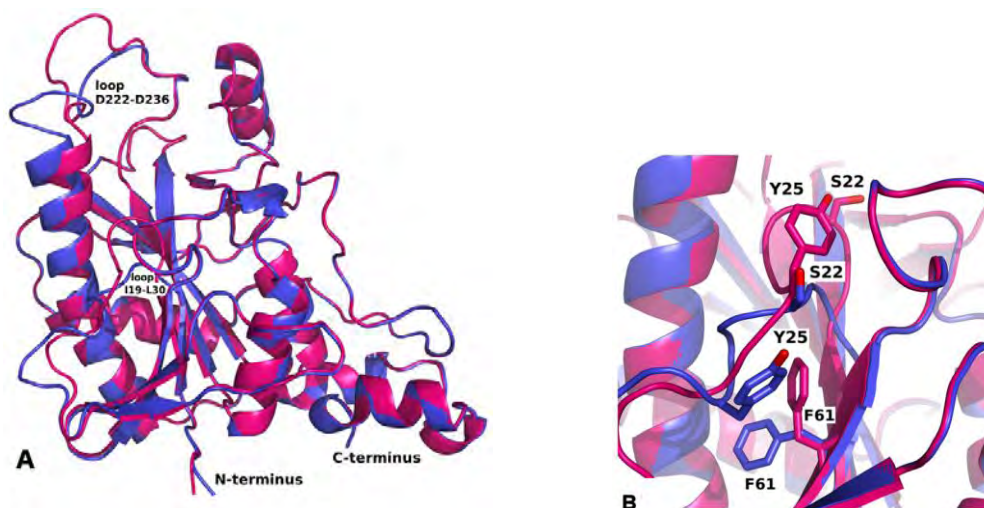
Struktura natywnego białka RSFP jest podobna do trimeru ludzkiej fosforylasy metyloioadenozyny (PDB ID: 1CBO) (2.2.2.1; Appleby i wsp., 1999) oraz fosforylasy metyloioadenozyny pochodzącej z hipertemofilnego archeona *Sulfolobus tokodaii* (PDB ID: 1V4N). Natomiast fosforylaza metyloioadenozyny z *Sulfolobus solfataricus* (PDB ID: 1JDU) ma strukturę homoheksameru, na który składają się dwa trimery (2.2.2.2; Appleby i wsp., 2001).



Rys. 36. Struktura pierwszorzędowa i drugorzędowa białka RSFP (kolorem żółtym oznaczone są motywy β -nici, kolorem różowym – α -helisa, kolorem fioletowym – zwrot).

5.2.2.2. Zmiany konformacyjne białka RSFP po związaniu cząsteczki rodaminy B

Struktura *apo* białka RSFP (PDB ID: 4GLF) i struktura białka RSFP w kompleksie z RB (PDB ID: 4GLJ) są bardzo podobne. Największą zmianę konformacyjną obserwuje się w obrębie pętli obejmującej reszty aminokwasowe Asp222 – Ala236, która w porównaniu ze strukturą *apo* ulega znacznemu przesunięciu (rys. 37A). Największe przesunięcie można zauważyć dla pętli zawierającej reszty aminokwasowe Glu230 – Asp236. Także pętla obejmująca reszty aminokwasowe Ile19 – Leu30 zlokalizowana nad miejscem wiązania RB zmienia kształt po związaniu cząsteczki barwnika (rys. 37B). Reszty aminokwasowe Ser22 i Tyr25 są przesunięte w kierunku kieszeni wiążącej RB. Przesunięcie reszty aminokwasowej Ser22 w porównaniu ze strukturą *apo* RSFP wynosi 8.17 Å. Przesunięcie tej pętli wpływa na zmiany konformacyjne łańcuchów bocznych sąsiadujących reszt aminokwasowych. Największą różnicę można zauważyć dla reszt Met27 i Phe61.

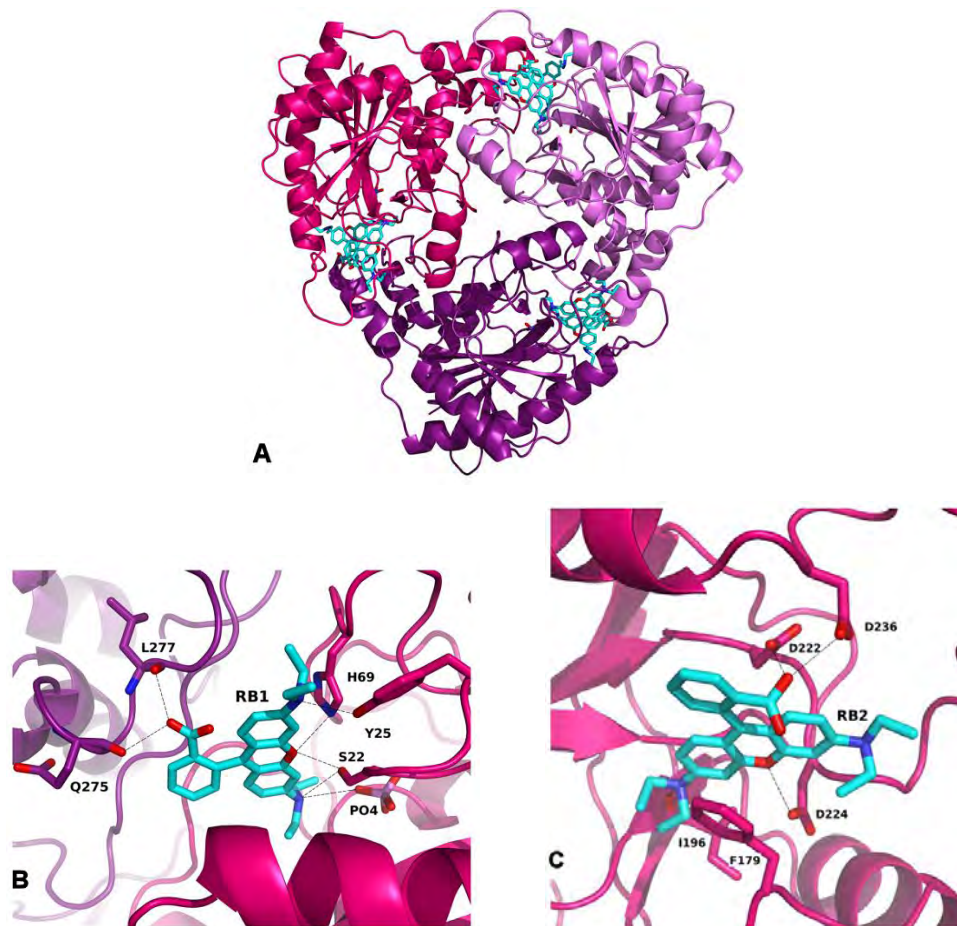


Rys. 37. Porównanie struktury *apo* białka RSFP (kolor różowy) i kompleksu RSFP z RB (kolor niebieski). (A) struktura monomeru, (B) zmiany położenia Ser22, Tyr25 i Phe61 pętli Ile19 – Leu30 wywołane oddziaływaniem jonu fosforanowego i RB.

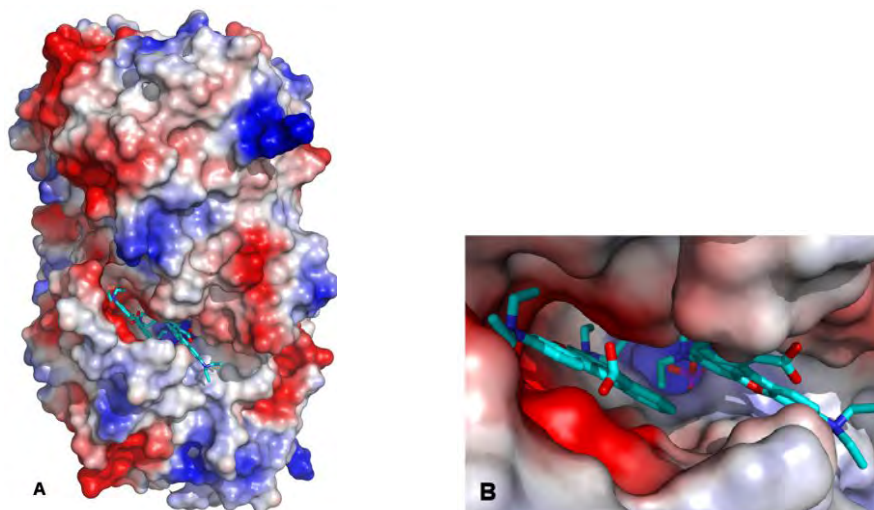
5.2.2.3. Miejsca wiązania rodaminy B w białku RSFP

Miejsce wiązania rodaminy B znajduje się w kieszeni znajdującej się pomiędzy sąsiadującymi ze sobą monomerami RSFP (Fig. 38A, Fig. 39A i 39B). Kieszeń tworzona jest przez pętlę zbudowaną z reszt aminokwasowych Asp222 – Asp236 oraz pętlę obejmującą reszty aminokwasowe Pro177 – Arg182 i dwie pętle sąsiedniego monomeru na które składają się reszty aminokwasowe Val134 – Ala140 i Ile268 – Thr279. W głębi kieszeni znajduje się ruchliwa pętla zbudowana z reszt aminokwasowych Gly20 – Leu30 posiadająca resztę Ser22. Oddziaływanie reszty Ser22 z jonem fosforanowym po związaniu RB wywołuje zmianę konformacji tej pętli w porównaniu ze strukturą *apo* RSFP.

Rozmiary tej kieszeni pozwalają na związanie w jej obrębie dwóch cząsteczek rodaminy B. Cząsteczka RB1 oddziałuje tam z jonem fosforanowym, grupą hydroksylową Ser22 i Tyr25, atomem azotu pierścienia imidazolowego His69 i atomem tlenu łańcucha głównego Leu277 i Gln275. Oddziaływania hydrofobowe zachodzą pomiędzy RB1 i resztami Met243, Leu242, Ile239 i Val276 (rys. 38B). To miejsce wiązania odpowiada miejscu aktywnemu fosforylasy metylotioadenozyny i w przypadku obecności substratu może być miejscem wiązania cząsteczek substratu - metylotioadenozyny. Cząsteczka RB2 oddziałuje z łańcuchami bocznymi reszt Asp222, Asp224 i Asp236, atomem tlenu grupy karbonylowej Ile196 oraz atomem azotu Gly100. Oddziaływania hydrofobowe (asocjacja warstwowa typu π - π) zachodzą pomiędzy cząsteczką liganda i resztą Phe179 (rys. 38C). Dwie cząsteczki RB przedostają się do kieszeni wiążącej poprzez wąski kanał czemu towarzyszy zmiana położenia pętli zamykającej kieszeń (rys. 39A, 39B).



Rys. 38. Oddziaływanie RB z RSFP: (A) trimer RSFP; (B) miejsce wiązania RB1; (C) miejsce wiązania RB2.



Rys. 39. Potencjał elektrostatyczny powierzchni białka RSFP: (A) trimer RSFP; (B) kieszeń wiążąca RB.

Analiza uzyskanej struktury krystalicznej białka RSFP w kompleksie z rodaminą B wskazała na obecność trzech identycznych miejsc wiązania RB znajdujących się na powierzchni białka RSFP (rys. 38A). Co więcej, w każdym z tych miejsc możliwe są dwa równocenne warianty związania cząsteczki barwnika (rys. 39 A i B). Wyniki badań krystalograficznych potwierdzają wyniki uzyskane w eksperymentach wygaszania fluorescencji RB przez białko

RSFP (5.1.4.1) wskazujące na istnienie więcej niż jednego miejsca wiązania RB na powierzchni RSFP.

Podsumowując, na podstawie struktury krystalicznej natywnej cząsteczki białka RSFP nie stwierdzono istnienia w nim grup chromoforowych, które mogłyby być odpowiedzialne za powstawanie zjawiska fluorescencji w zakresie światła widzialnego, co potwierdza wnioski wyciągnięte na podstawie analizy wyników badań spektroskopowych oczyszczonego preparatu białka RSFP (5.2.1). Ponadto, porównanie struktury krystalicznej RSFP (trimery) z strukturą innych trimerycznych enzymów z klasy fosforylaz MTA, ze szczególnym uwzględnieniem położenia i zakonserwowania reszt istotnych dla katalizy reakcji enzymatycznej prowadzonej przez te enzymy, potwierdziło, że białko RSFP jest fosforylazą MTA.

5.2.3. Mutageneza ukierunkowana genu *rsfp*

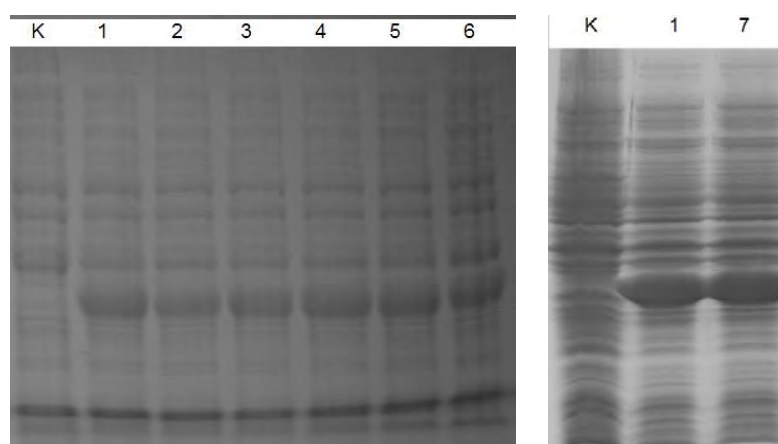
Przeprowadzone wcześniej analizy porównawcze struktur krystalicznych natywnego białka RSFP oraz białka RSFP w kompleksie z rodaminą B wskazały w cząsteczce białka RSFP miejsce wiązania cząsteczek rodminy B. Zjawisko wiązania RB na powierzchni białka stanowi najbardziej prawdopodobne wytłumaczenie obserwowanej akumulacji cząsteczek RB w komórkach *E. coli* ekspresujących gen *rsfp* i fluorescencję tych komórek po ekspozycji na promieniowanie UV. Ponadto, analiza danych uzyskanych podczas badań krystalograficznych białka RSFP w obecności RB pozwoliła na zidentyfikowanie reszt aminokwasowych znajdujących się w miejscu wiązania RB. Jako reszty aminokwasowe kluczowe dla wiązania cząsteczek RB przez białko RSFP wskazano resztę Ser22, Asp222 i Asp224 oraz resztę Phe179. Ponadto, badania homologii sekwencji aminokwasowej białka RSFP z sekwencjami aminokwasowymi znanych fosforylaz metyloioadenozyny, np. ludzkiej MTA-fosforylasy wskazują, że reszty Asp222 i Asp224 zaangażowane w wiązanie cząsteczki RB na powierzchni białka RSFP, odpowiadają resztom kwasu asparaginowego zakonserwowanym w cząsteczkach tej grupy enzymów, ze względu na ich kluczowy udział w katalizowanej przez te enzymy reakcji.

W związku z powyższym, aby jednoznacznie potwierdzić wpływ wskazanych powyżej reszt aminokwasowych w wiązaniu cząsteczek RB do RSFP oraz potwierdzić, że powstanie kompleksu RB z RSFP jest przyczyną obserwowanego zjawiska różowej fluorescencji tego kompleksu, uzyskano szereg wariantów sekwencyjnych białka RSFP i zbadano ich aktywność *in vivo* (badanie fluorescencji kolonii bakteryjnych *E. coli* na podłożu z RB) i *in vitro* (wpływ oczyszczonych preparatów białek na właściwości spektroskopowe RB).

Mutagenezę ukierunkowaną wykonano wykorzystując zestaw „QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit” firmy Stratagene (4.2.9). W sekwencjach nukleotydowych starterów

kodony odpowiadające następującym resztom aminokwasowym Ser22, Asp222, Asp224 oraz Phe179 zostały wymienione na kodon reszty aminokwasowej alaniny. Ponieważ zaobserwowano możliwość istnienia oddziaływań hydrofobowych (asocjacja warstwowa typu π - π) pomiędzy cząsteczką RB i resztą Phe179 w przypadku tej reszty aminokwasowej oprócz wymiany na resztę alaniny, wykonano także mutagenezę mającą na celu wymianę tej reszty na resztę tyrozyny, ze względu na podobieństwo strukturalne cząsteczki fenyloalaniny i tyrozyny (obecność pierścienia aromatycznego).

Wyniki sekwencjonowania DNA potwierdziły obecność mutacji punktowych w sekwencji genu *rsfp*. Wykonano ekspresję genów *rsfp-S22A*, *rsfp-D222A*, *rsfp-D224A*, *rsfp-D222AD224A*, *rsfp-F179A* oraz *rsfp-F179Y* w komórkach *E. coli* LMG194 (4.2.7). W każdym z przypadków potwierdzono obecność w komórkach *E. coli* odpowiednich wariantów białka RSFP (rys. 40).



Rys. 40. Wynik rozdziłu elektroforetycznego lizatów komórkowych:

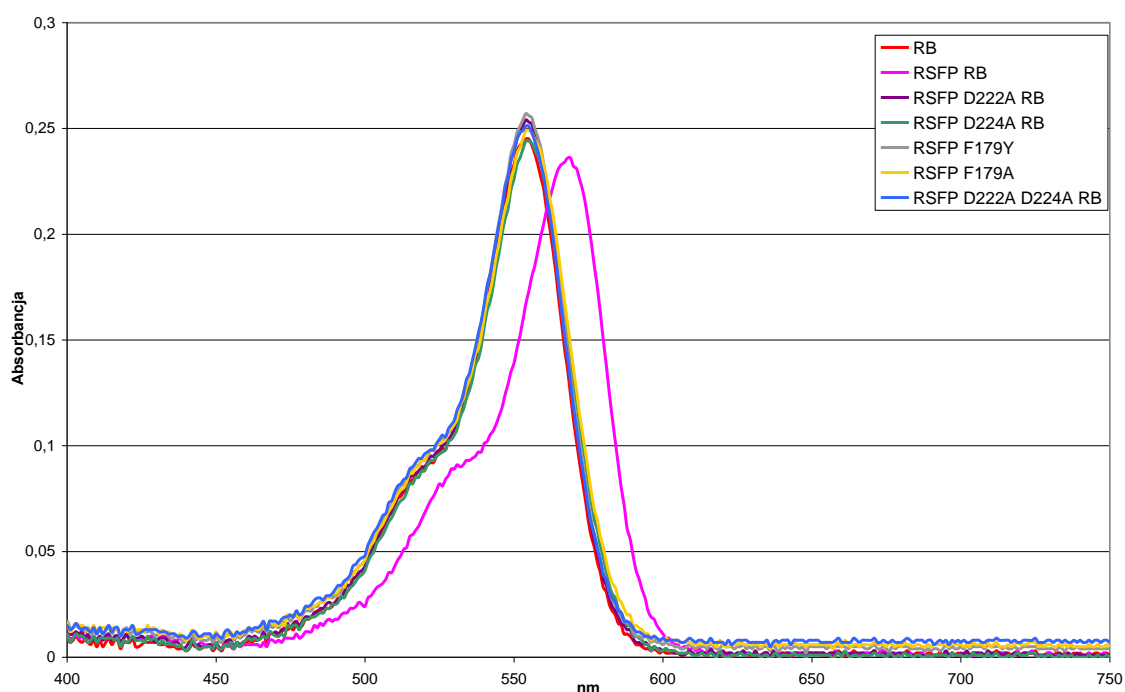
- K *E. coli* LMG194/pBADMycHisA,
- 1. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP
- 2. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-S22A,
- 3. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-D222A,
- 4. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-D224A
- 5. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-D222AD224
- 6. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-F179A
- 7. *E. coli* LMG194/pBAD-RSFP-F179Y

Zmiana reszty aminokwasowej Ser22 na resztę alaniny nie wywołała utraty zdolności do fluorescencji po wzbudzeniu światłem UV komórek *E. coli* XL10-Gold/RSFP-S22A rosnących na podłożu z rodaminą B, co oznacza, że reszta ta nie bierze udziału w procesie wiązania cząsteczek barwnika prowadzącym do zmiany właściwości spektralnych RB. Natomiast po zmianie reszty aminokwasowej Asp222 oraz Asp224 na resztę aminokwasową alaniny oraz zmianie reszty aminokwasowej Phe179 na resztę alaniny oraz resztę tyrozyny, nie obserwowano zjawiska fluorescencji w świetle UV komórek *E. coli* na podłożu z RB, w których zachodziła ekspresja genów: *rsfp-D222A*, *rsfp-D224A*, *rsfp-D222AD224A*, *rsfp-F179A* oraz *rsfp-*

F179Y. Wyniki te wskazują na kluczową rolę tych reszt aminokwasowych w powstawaniu zjawiska fluorescencji komórek *E. coli* ekspresujących gen *rsfp*, rosnących w obecności RB.

5.2.3.1. Widma absorpcyjne rodaminy B w obecności mutein RSFP

Muteiny¹ RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A, RSFP-F179A oraz RSFP-F179Y produkowano w komórkach *E. coli* LMG194 (4.2.10.2), a następnie oczyszczono je za pomocą chromatografii jonowymiennej (4.2.11). Uzyskano widma absorpcyjne UV-VIS rodaminy B w obecności białka RSFP oraz jego wariantów sekwencyjnych: RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A, RSFP-F179A, RSFP-F179Y (4.2.15.5) w celu oceny wpływu poszczególnych zmian reszt aminokwasowych białka RSFP na zdolność wiązania RB (rys. 41).



Rys. 41. Widma absorpcyjne rodaminy B (8 μ M), rodaminy B (8 μ M) w obecności RSFP oraz rodaminy B w obecności mutein RSFP ($C_{\text{białek}} = 0,7$ mg/ml).

Obecność natywnego białka RSFP wywołuje przesunięcie widma absorpcyjnego rodaminy B (wykres w kolorze różowym na rys. 41) w kierunku fal dłuższych (przesunięcie batochromowe), co świadczy o wiązaniu RB przez to białko. W obecności analizowanych wariantów sekwencyjnych białka RSFP nie następuje przesunięcie widma RB, co świadczy o tym, że muteiny te nie są zdolne do związania cząsteczki barwnika, tak aby powstawał wystarczająco stabilny w czasie kompleks RB - muteina RSFP. Warianty białka RSFP: RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A, RSFP-F179A oraz RSFP-F179Y nie są zdolne do

¹ Muteina - wariant sekwencyjny białka; pojęcie wprowadzono w celu uproszczenia tekstu, kierując się obecnością tego terminu w polskich źródłach literaturowych.

oddziaływania z RB, co wyjaśnia brak fluorescencji kolonii *E. coli* ekspresyjnych te muteiny na podłożu z RB w świetle UV o długości 312 nm.

5.2.3.2. Badanie oddziaływania rodaminy B z muteinami RSFP metodą spektroskopii korelacji fluorescencji

W celu zbadania zdolności mutein RSFP do wiązania cząsteczek RB zastosowano również technikę spektroskopii korelacji fluorescencji (4.2.15.3). Wyznaczono czasu dyfuzji rodaminy B w objętości konfokalnej w obecności mutein RSFP (RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A, RSFP-F179A oraz RSFP-F179Y). Zastosowano stosunki stężeń molowych mutein do RB, które powinny pozwolić na związanie wszystkich cząsteczek RB znajdujących się w roztworze na powierzchni każdej z badanych mutein. W tym celu wielkość stosunków stężeń RB do każdej muteiny, określono na podstawie wyników badań techniką FCS wiązania cząsteczek rodaminy B z białkiem RSFP (5.2.2.1).

W wyniku przeprowadzonych pomiarów otrzymano następujące wartości czasu dyfuzji:

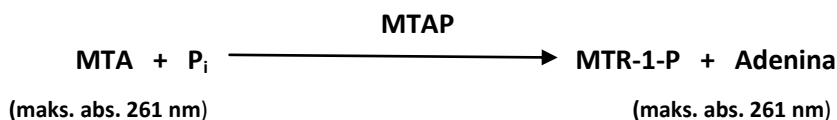
- Dla stosunku $C_{\text{RSFP-D222A}}/C_0$ równego 170: τ_D RB = 30 μs
- Dla stosunku $C_{\text{RSFP-D224A}}/C_0$ równego 315: τ_D RB = 30 μs
- Dla stosunku $C_{\text{RSFP-D222AD224A}}/C_0$ równego 240: τ_D RB = 56 μs
- Dla stosunku $C_{\text{RSFP-F179A}}/C_0$ równego 430: τ_D RB = 30 μs
- Dla stosunku $C_{\text{RSFP-F179Y}}/C_0$ równego 480: τ_D RB = 120 μs .

Ponieważ czas dyfuzji rodaminy B w objętości konfokalnej wynosi 29 μs (5.2.1.2), toteż uznać należy, że muteiny: RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A oraz RSFP-F179A charakteryzujące się takim samym lub zbliżonym czasem dyfuzji nie wykazują zdolności wiązania barwnika. Pomimo, że w eksperymencie celowo zastosowano duży nadmiar każdego z mutein, to czas dyfuzji RB w zbadanych przypadkach nie zmienił się i był taki jak w roztworze pozbawionym białka. Pozwala to na stwierdzenie, że obecność w miejscu wiązania RB reszt aminokwasowych Asp222, Asp224 oraz Phe179 jest konieczna do związania tam cząsteczki RB. Wyniki te potwierdzają wyniki otrzymane w trakcie analizy widm absorpcyjnych RB w obecności białka RSFP oraz jego mutein (5.2.4.1). W przypadku wariantu sekwencyjnego białka RSFP-F179Y zaobserwowano wydłużenie czasu dyfuzji RB (120 μs) w stosunku do czasu dyfuzji czystej rodaminy B (29 μs). Czas dyfuzji RB związanej z RSFP wynosi 185 μs (5.2.1.2). Wzrost czasu dyfuzji RB w obecności RSFP-F179Y mógł być wywołany oddziaływaniem cząsteczki RB z tym białkiem. Jednak oddziaływanie to było na tyle słabe, że zaobserwowanie zmian w widmie absorpcyjnym kompleksu RSFP-F179Y – RB nie było możliwe (rys. 41).

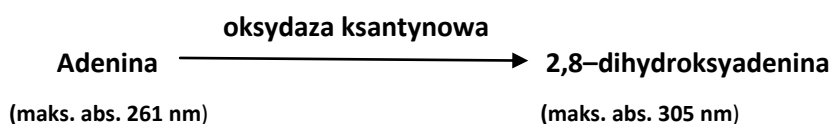
5.2.4. Aktywność enzymatyczna RSFP

Białko RSFP wykazuje 93% podobieństwo do sekwencji aminokwasowej fosforylasy metyloioadenozyny *Psychrobacter arcticus* 273-4, określono więc czy posiada ono charakterystyczną dla tego enzymu aktywność.

Enzym fosforylaza metyloioadenozyny (MTAP) przekształca substrat 5'-deoksy-5'-(metylotio)adenozynę (MTA) w adeninę i metyloiotyrybozo-1-fosforan (MTR-1-P) (2.2.1; Buckoreelall i wsp., 2011).



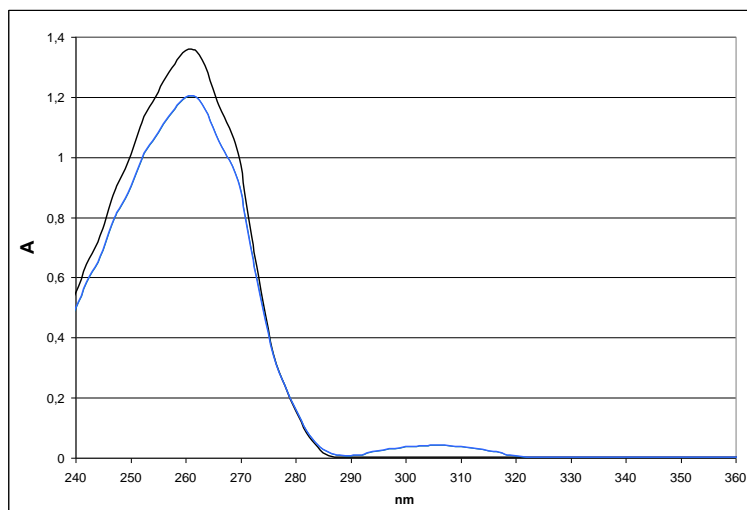
Stwierdzenie przebiegu powyższej reakcji metodami spektroskopowymi (w zakresie UV-VIS) jest w praktyce niemożliwe do wykonania ze względu na pokrywanie się maksimum absorpcji (oraz niemal całego przebiegu widm absorpcyjnych) dla substratu MTA i produktu reakcji – adeniny (oba związki wykazują maksimum absorpcji dla 261 nm). Możliwe jest jednak w tym celu wykorzystanie reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową, w której adenina, produkt reakcji katalizowanej przez MTAP, zostaje przekształcona w 2,8-dihydroksyadeninę o maksimum absorpcyjnym występującym przy fali o długości 305 nm (Buckoreelall i wsp., 2011).



W oparciu o powyższe dane przeprowadzono doświadczenia których celem było sprawdzenie czy białko RSFP wykazuje aktywność MTAP. Zaprojektowano układ składający się z substratu – MTA oraz dwóch enzymów: białka RSFP i oksydazy ksantynowej. W tym celu, wyprodukowano (4.2.10) i oczyszczono białko RSFP (4.2.11), a następnie wykorzystując różnice w przebiegu widm absorpcyjnych MTA oraz 2,8-dihydroksyadeniny sprawdzono czy białko to posiada aktywność enzymatyczną fosforylasy MTA.

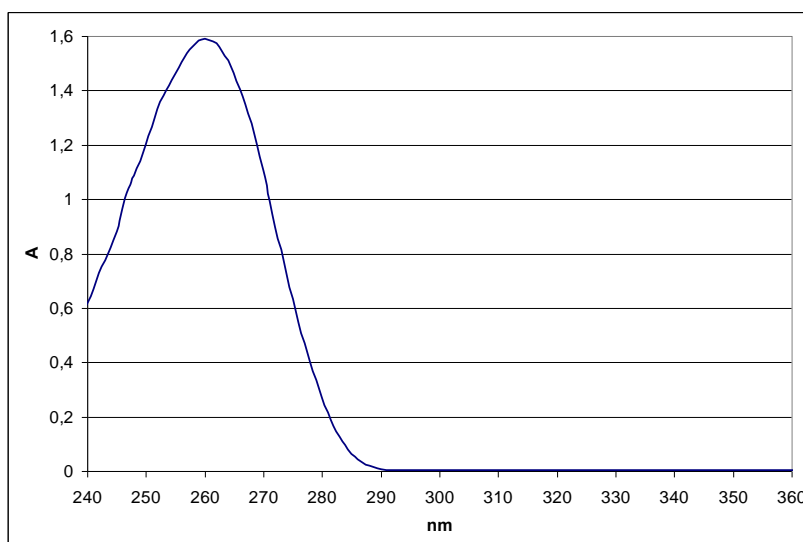
Pierwszym etapem było potwierdzenie zdolności komercyjnie dostępnej oksydazy ksantynowej do przekształcenia adeniny w 2,8-dihydroksyadeninę. W tym celu sporządzono widmo absorpcyjne roztworu adeniny (4.2.16). Stwierdzono, że maksimum absorbancji adeniny (wykres w kolorze czarnym na rys. 42) występuje przy długości fali 261 nm, co zgodne jest z danymi literaturowymi (Buckoreelall i wsp., 2011). Następnie roztwór adeniny poddano reakcji z oksydazą ksantynową (4.2.16). Po 2 h wykonano pomiary uzyskując widmo absorpcyjne dla mieszaniny (wykres w kolorze niebieskim na rys. 42). Na rys. 42 widoczny jest

spadek absorpcji dla długości fali 261 nm, co wiąże się ze zmniejszeniem ilości adeniny w roztworze oraz pojawienie się drugiego sygnału absorpcyjnego dla długości fali 305 nm, co odpowiada maksimum absorpcji 2,8-dihydroksyadeniny. Eksperyment ten pozwolił na opracowanie warunków pomiaru aktywności enzymatycznej RSFP.



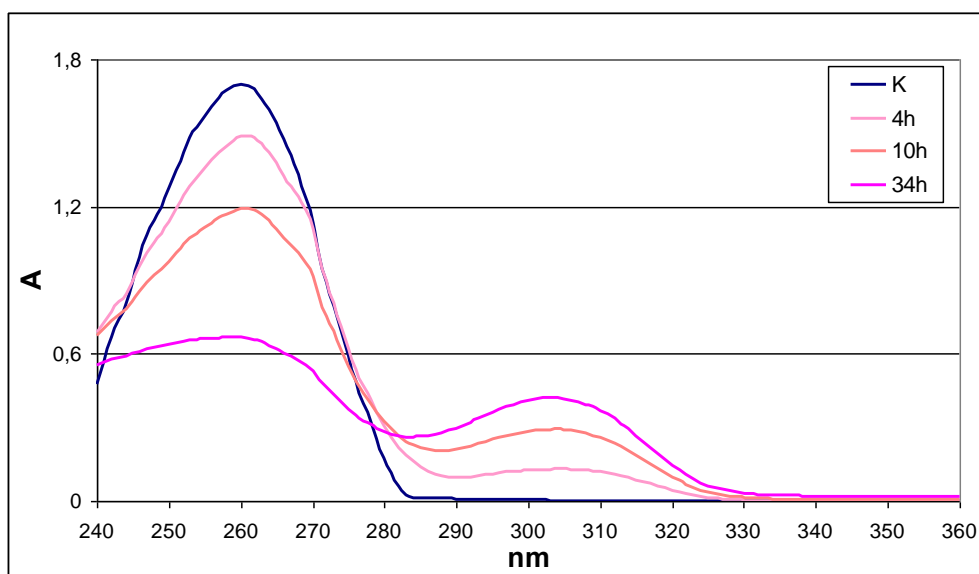
Rys. 42. Widma absorpcyjne adeniny (linia czarna) oraz mieszaniny zawierającej adeninę i oksydazę ksantynową (linia niebieska).

Wykonano widmo absorpcyjne dla roztworu MTA w tych samych warunkach doświadczalnych (4.2.16). Stwierdzono, że roztwór MTA podobnie jak roztwór adeniny osiąga maksymalną wartość absorpcji przy długości fali 261 nm (rys. 43).



Rys. 43. Widmo absorpcyjne MTA.

W celu potwierdzenia obecności lub braku aktywności fosforylasy metyloadenozyny białka RSFP sporządzono mieszaninę reakcyjną zawierającą MTA, oksydazę ksantynową oraz białko RSFP (4.2.16). Przygotowano także mieszaninę kontrolną pozbawioną białka RSFP (4.2.16). Po upływie 4, 10 i 34 h z roztworów obu mieszanin reakcyjnych pobierano próbki i analizowano ich widma absorpcyjne w zakresie długości fali od 240 nm do 360 nm (rys. 44).



Rys. 44. Widma absorpcyjne: K (linia granatowa): mieszaniny zawierającej MTA i oksydazę ksantynową oraz mieszaniny zawierającej MTA, RSFP i oksydazę ksantynową wykonane po 4, 10 i 34 h reakcji.

Wykres w kolorze granatowym na rysunku 44 przedstawia widmo absorpcyjne próbki zawierającej białka RSFP. Jego analiza pozwala na stwierdzenie braku aktywności oksydazy ksantynowej wobec MTA (maksimum absorbancji 261 nm, brak absorpcji w 305 nm). Przebieg tego widma był niemal identyczny po 4, 10 i 34 h, dlatego na rysunku 44 umieszczono tylko jedną krzywą kontrolną. Pozostałe wykresy na rysunku 44 przedstawiają widmo absorpcyjne próbki zawierającej RSFP w obecności oksydazy ksantynowej i MTA po czasie reakcji odpowiednio: 4 h, 10 h i 34 h w temp. pokojowej. Zaobserwować można maksimum absorpcyjne w 261 nm, odpowiadające absorbancji wytworzonej przez RSFP adeniny oraz substratu MTA. Widoczny spadek absorbancji w stosunku do próbki kontrolnej spowodowany jest łącznym spadkiem ilości adeniny i MTA w badanej próbce (MTA zostało przekształcone do adeniny przez RSFP, a adenina przekształcona została przez oksydazę ksantynową do 2,8-dihydroksyadeniny). Następuje wzrost absorbancji w zakresie długości fali od 290 nm do 320 nm, z maksimum absorpcyjnym w 305 nm, odpowiadającemu maksimum absorpcji 2,8-dihydroksyadeniny. Ilość 2,8-dihydroksyadeniny w badanym roztworze wzrasta wraz z wydłużeniem czasu prowadzenia reakcji.

Uzyskane wyniki wskazują, że białko RSFP posiada aktywność fosforylasy metyloadenozyny. W mieszaninie reakcyjnej zawierającej MTA, białko RSFP oraz oksydazę ksantynową przebiegała reakcja fosforylacji MTA, czego skutkiem było uwolnienie metyloadenozyny-1-fosforanu oraz adeniny. Powstająca adenina została następnie przekształcona przez oksydazę ksantynową do 2,8-dihydroksyadeniny.

Podsumowanie

Podsumowując, udowodniono istnienie związku pomiędzy cząsteczkami rodaminę B, białkiem RSFP i występowaniem zjawiska różowej fluorescencji kolonii rekombinantowych komórek *E. coli rsfp+* rosnących na podłożu zawierającym rodaminę B, zachodzącej po oświetleniu ich światłem UV. Uzyskane wyniki stanowią pierwsze doniesienie o specyficznym oddziaływaniu rodaminę B z białkami skutkującym zmianami właściwości spektralnych barwnika i przesunięciem batochromowym jego widm absorpcyjnych i emisyjnych. Oddziaływanie to zostało udowodnione badaniami krystalograficznymi oraz spektrofotometrycznymi. Część wyników przeprowadzonych badań dotyczących wpływu obecności białka RSFP na właściwości spektralne rodaminę B oraz badań krystalograficznych białka RSFP opublikowano w czasopiśmie *PLoS One* (Bartasun i wsp., 2013).

5.3. Zastosowania genu *rsfp* i białka RSFP

Uzyskane wyniki wskazały na możliwość zastosowania genu *rsfp* jako nowego genu reporterowego. Zbadano więc możliwości wykorzystania genu *rsfp* w konstrukcji wektorów pułapkowych służących do poszukiwania sekwencji promotorowych. Sprawdzone przydatność genu *rsfp* w mikroskopii fluorescencyjnej jako genu markerowego do różnicowania komórek rekombinantowych *E. coli*, w których zachodzi ekspresja genu *rsfp* od komórek nierekombinantowych. Ponadto, oceniono także przydatność rekombinantowego szczepu *E. coli* niosącego gen *rsfp* w konstrukcji biosensora komórkowego biodostępnej rodaminy B w środowiskowych próbkach wody.

5.3.1. Gen reporterowy

Gen reporterowy to ściśle zdefiniowana sekwencja nukleotydowa, która wprowadzona do komórki wywołuje łatwą do zmierzenia zmianę w jej fenotypie (Wood, 1995). Gen reporterowy powinien spełniać następujące warunki (Gambhir i wsp., 1999a; Gambhir i wsp., 1999b; Gambhir i wsp., 2000):

1. Nie występuje naturalnie w komórce
2. Jego produkt występuje w komórce dopiero po udanej transformacji czy transfekcji,
3. Produkt genu nie jest toksyczny dla komórki i może być w niej akumulowany, nie wpływa znacząco na funkcjonowanie komórki
4. Substrat służący do wykrywania produktu genu reporterowego nie jest metabolizowany przez komórkę, nie jest także akumulowany przez komórki nie wykazujące ekspresji genu reporterowego
5. Stopień akumulacji substratu odzwierciedla aktywność genu reporterowego
6. Rozmiar genu reporterowego ograniczony jest pojemnością wektora do którego ma być wprowadzony

Znalezienie idealnego genu reporterowego, spełniającego wszystkie wyżej wymienione warunki jest niemożliwe. Dlatego w badaniach naukowych stosuje się wiele różnych genów, wybierając optymalny do danego zadania np. geny kodujące acetylotransferazę chloramfenikolu, β -galaktozydazę, GFP, lucyferazę, fosfatazę alkaliczną, fosfatazę kwaśną.

W ostatnich latach można zaobserwować znaczny postęp w badaniach nad nowymi genami reporterowymi, jak i nad udoskonaleniem już istniejących systemów. Geny reporterowe, ze względu na swoją użyteczność, czułość oraz selektywność są coraz szerzej stosowane w pracy laboratoryjnej. Kompatybilność z systemami biologicznymi bakteryjnymi,

drożdżowymi, roślinnymi i zwierzęcymi, stałe badania nad poprawą czułości, stabilności i ułatwianiem metod detekcji, sprawiają, że techniki wykorzystujące geny reporterowe stały się bardzo popularne. Na dzień dzisiejszy geny reporterowe pełnią istotną rolę w badaniach naukowych dotyczących biologii molekularnej, biochemii, inżynierii genetycznej i medycyny.

Geny reporterowe wykorzystywane są m.in. w takich zagadnieniach jak (Wood, 1995; Welsh, 1997; Soll i wsp., 1998; Naylor, 1999; Roda i wsp., 2004; Allard, 2008):

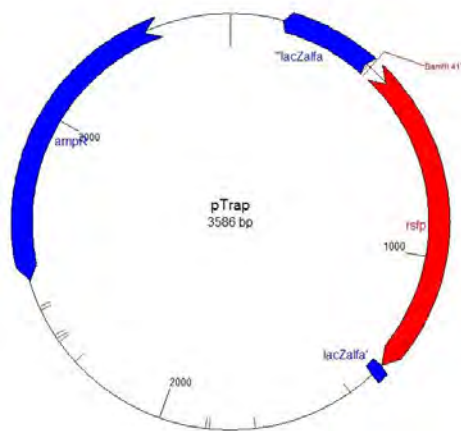
- Badanie transfer i ekspresja genów (np. poszukiwanie i analiza promotorów genów, monitorowanie i obserwacja ekspresji genów);
- Badania nad lekami (np. charakterystyka białek receptorowych i ligandów, badanie wewnątrzkomórkowych mechanizmów sygnałowych, toksykologia, badanie postępu choroby i skuteczności leczenia);
- Biosensory (np. badanie zanieczyszczenia środowiska, ustalanie toksyczności związków chemicznych),
- Indykatory biologiczne (np. wykrywanie obecności obcego DNA w tkankach i wymazach, wykrywanie obecności wirusów na powierzchni skóry, markery genetyczne specyficznych tkanek i organizmów, znakowanie przeszczepionych guzów nowotworowych);
- Testy immunologiczne (np. znakowanie przeciwciał i antygenów cząsteczkami reporterowymi, znakowanie substratów dla enzymów, zastosowanie w technice western-blotting do analizy białek);
- Zastosowania biotechnologiczne (np. kontrola bioprocessów, poszukiwanie inhibitorów enzymów, analiza kwasów nukleinowych).

5.3.1.1. Gen *rsfp* jako gen reporterowy w wektorach pułapkowych

Akumulacja rodaminy B przez komórki *E. coli* oraz związane z tym zjawisko fluorescencji komórek *E. coli* wskazuje na możliwość wykorzystania genu *rsfp* jako nowego genu reporterowego. Oceniono jego przydatność w konstrukcji wektorów pułapkowych typu „promoter-probe”. Technika badania sekwencji promotorowych wykorzystująca geny reporterowe opiera się na włączeniu sekwencji DNA, zawierającej promotor i potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, do wektora "promoter-probe" przed pozbawionym promotora genem reporterowym kodującym łatwo oznaczalny produkt. Powszechnie stosowane w wektorach tego typu geny reporterowe to np. gen β -galaktozydazy, GFP, lucyferazy. Po wprowadzeniu do komórki wektora z sekwencją promotorową przed genem reporterowym może zostać zaobserwowana różnica w wyglądzie kolonii bakteryjnych,

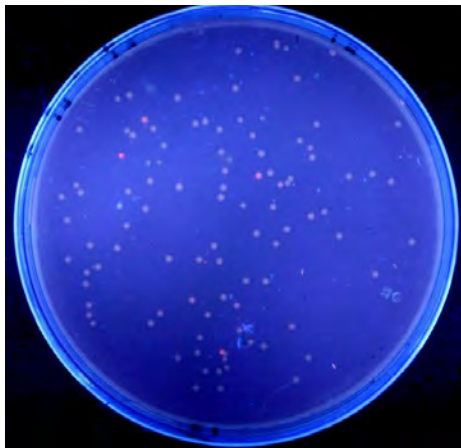
co oznacza ekspresję genu reporterowego, a tym samym obecność sekwencji promotorowej we wprowadzonym fragmencie DNA.

Skonstruowano wektor pułapkowy pTrap (rys. 45), służący do identyfikacji i izolacji sekwencji promotorowych w obrębie DNA genomowego *E. coli* (układ modelowy) oraz możliwości oceny siły sklonowanego promotora (Bartasun i wsp., 2012). Wybór *E. coli* jako organizmu modelowego podyktowany był dostępnością dużej ilości informacji na temat istniejących i potwierdzonych sekwencji promotorowych tego mikroorganizmu zgromadzonych w internetowej bazie RegulonDB (4.3). Wektor pTrap otrzymano poprzez wprowadzenie do plazmidu pUC19 genu *rsfp* w orientacji odwrotnej do promotora laktozowego obecnego w sekwencji DNA wektora pUC19 (4.2.7)



Rys. 45. Mapa plazmidu pTrap. Skróty: ampR, *rsfp* i lacZalpha oznaczają odpowiednio: gen kodujący β -laktamazę, gen *rsfp* i α -peptyd β -galaktozydazy.

Po wprowadzeniu fragmentów DNA genomowego *E. coli* TOP10F' przed gen *rsfp* w wektorze pTrap (4.2.8) wyizolowano 13 plazmidów serii pP, których wprowadzenie do komórki *E. coli* DH5 α wywoływało zjawisko różowej fluorescencji kolonii bakteryjnych rosnących na podłożu stałym z rodaminą B (rys. 46).



Rys. 46. Kolonie *E. coli* TOP10F'/pTrap_insert na podłożu LA z rodaminą B (Bartasun i wsp., 2012).

Następnie, komórki *E. coli* DH5 α transformowano DNA plazmidowym pUC19, pTrap oraz plazmidami serii pP, a następnie wysiewano je na podłoże stałe zawierające ampicylinę, IPTG oraz rodaminę B (4.1.3). Kolonie bakteryjne wykazujące fluorescencję w świetle UV przesiano na podłoża stałe z ampicyliną i IPTG, zawierające stopniowo zmniejszające się stężenie RB (od 0,1%; 0,09%; 0,08%; 0,07%; 0,06%; 0,05%; 0,04%; 0,03%; 0,02%; 0,01% do 0,005%). Na podstawie otrzymanych wyników określono optymalne dla zróżnicowania siły promotora stężenie RB w podłożu stałym, wynoszące 0,05%. Różnice w intensywności fluorescencji kolonii bakteryjnych rosnących na tym podłożu były najłatwiejsze do zaobserwowania. Jako najsilniejsze sekwencje promotorowe wskazano te, które niesione były przez komórki, których kolonie wykazywały zjawisko fluorescencji przy najniższych zastosowanych stężeniach RB w podłożu. Oceniono, że najsilniejszą fluorescencję wykazują kolonie *E. coli* DH5 α niosące plazmidy pP4, pP5, pP12 oraz pP13. Jako sekwencje promotorowe o średniej sile zostały oznaczone sekwencje zawarte w plazmidach pP1 oraz pP2, a jako najslabsze w plazmidach pP9 i pP10 (Bartasun i wsp., 2012).

Otrzymano sekwencje nukleotydowe fragmentów DNA genomowego *E. coli* wprowadzone do wektora pTrap. Sekwencje te analizowano programem VecScreen w celu usunięcia fragmentów sekwencji DNA plazmidu pUC19. Następnie porównano je do sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w GenBank (BLAST). Wszystkie zbadane fragmenty DNA były fragmentami DNA genomowego *E. coli* TOP10F' (GenBank accession no. CP001637.1). Dalsza analiza (Tabela 1) wykazała, że jedynie fragmenty DNA zawarte w plazmidach pP2, pP5 i pP7 są pojedynczymi fragmentami DNA genomowego *E. coli*. Pozostałe inserty DNA stanowiły produkt ligacji dwóch, czterech lub siedmiu fragmentów DNA genomowego *E. coli*. Plazmid pP1 zawierał fragment DNA pochodzący z plazmidu F *E. coli*. Aby uniknąć wyników fałszywie pozytywnych sekwencje każdego z wprowadzonych insertów (plazmidy rekombinantowe pP3, pP4, pP6, pP8 oraz pP11) były analizowane osobno przy użyciu programu komputerowego służącego do poszukiwania sekwencji promotorowych (Bartasun i wsp., 2012).

Wyizolowane sekwencje promotorowe analizowano pod kątem podobieństwa do sekwencji kanonicznej (tzw. *consensus*) dla sekwencji promotorowych *E. coli* wykorzystując program BP Prom (4.3). Program ten wskazuje sekwencje promotorowe rozpoznawane przez czynnik σ^{70} polimerazy RNA wykazujący powinowactwo do większości promotorów *E. coli*. Większość analizowanych sekwencji zawierała sekwencje promotorowe (Tabela 1). Zidentyfikowane sekwencje promotorowe zostały porównane z sekwencjami promotorowymi zdeponowanymi w bazie danych RegulonBD (4.3). W kilku przypadkach porównanie nie było możliwe, ponieważ sekwencja analizowanego DNA nie wykazywała homologii z DNA szczepu *E. coli* K-12 MG1655 (NC_000913.2) użytego jako sekwencja referencyjna w bazie RegulonDB

(Tabela 1). Sekwencja promotorowa zawarta w plazmidzie pP1 odpowiada sekwencji promotorowej *PrepE* pochodzącej z plazmidu F. Poza wymienionymi powyżej analizami sekwencji promotorowych, sprawdzono, czy każda z przewidzianych sekwencji promotorowych znajduje się we właściwej orientacji i odległości umożliwiającej poprawne zachodzenie transkrypcji DNA i translacji RNA genu *rsfp* znajdującego się na plazmidzie pTrap. Spośród dwudziestu sześciu sekwencji promotorowych zidentyfikowanych przy użyciu programu BPProm sześć odpowiadało sekwencjom promotorowym *E. coli* zdeponowanym w bazie RegulonDB (Tabela 2). Wartości LDF (ang. *linear discriminant function*) sekwencji promotorowych zidentyfikowanych przez program BPProm (Tabela 1) zostały porównane z wartościami LDF sekwencji promotorowych znajdujących się w bazie danych RegulonDB (Tabela 2). Wysoka wartość tego parametru wskazuje na wysoki stopień podobieństwa zidentyfikowanej sekwencji promotorowej do sekwencji promotorowych, rozpoznawanych przez podjednostkę δ^{70} bakteryjnej polimerazy RNA, już wcześniej scharakteryzowanych. Wyniki analiz przedstawia Tabela 3. Na przykład sekwencja promotorowa P3A może zostać przyporządkowana do sekwencji promotorowej operonu *fdoGHI-fdhE* (Bartasun i wsp., 2012). Podsumowując, udowodniono obecność co najmniej jednej, wysoce prawdopodobnej sekwencji promotorowej w każdym z badanych insertów plazmidów serii pP zdolnych do kontroli ekspresji genu reporterowego *rsfp* w komórkach *E. coli*. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że gen *rsfp* może zostać wykorzystany jako gen reporterowy.

Tabela 1. Przewidziane przez program BPProm sekwencje promotorowe (sekwencja -35 czcionką pogrubioną; sekwencja -10 podkreślona) fragmentów DNA genomowego *E. coli* TOP10F' wprowadzonych do wektora pTrap vector. Próg wartości LDF dla promotorów wynosi 0.20.

Plazmid (długość insertu)	Nazwa Fragmentu (długość fragmentu)	Referencyjna sekw. DNA (Data Base and Accession No.)	Pozycja Insertu/Fragmentu w sekw. Referencyjnej	Stopień podobieństwa [%]	Nazwa Promotora	Region promotorowy przewidziany przez program BPProm	LDF
pP1 (241 pz)	n/a	Plasmid F DNA, complete sequence (GenBank: AP001918.1)	48196 – 48436 pz	100	P1	TTGACTCTTTTTATTTAG <u>GTGACAAT</u> CTAAAAAC	6.71
pP2 (243 pz)	n/a	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. MG1655 chromosome (NCBI Reference Seq. :NC_000913.2)	3188647 – 3188405 pz	100	P2	CTGAAAAGTTGACGGAACAT <u>TTTTAAACT</u> GCGTATTT	5.82
pP3 (820 pz)	"A" (660 pz)	Jak wyżej	4084472 – 4083813 pz	100	P3A	TTGACG AACACCTGTGATATT IGTCACAT TTTCGATTT	4.26
	"B" (164 pz)	Jak wyżej	3596646 – 3596483 pz	100	P3B	TTGGGT TGCCGCCAAAT TGCTAAT ATCGAGTACG	2.33
pP4 (1232 pz)	"A" (1004 pz)	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B (GenBank: CP000948.1)	1362832 – 1363835 pz	100	P4A1	GTGACAT GAACATAACAATCCGCG GGGCAGAT TCTTG CAGC	1.13
					P4A2	TTGACAG CGCGTTTGAACAC GGAAAAGCT GTCCGGCTG	0.73
					P4A3	TTGATA AAAACACTATCAACG AGCCATAAT AAATCTGC	5.45
	"B" (231 pz)	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. MG1655 chromosome (NCBI Reference Seq. :NC_000913.2)	2218332 – 2218562 pz	100	P4B1	TTGATT GCGGCGCTGAAAGCCAC CCGGTAAACC GCTGGTGC	1.14
pP5 (1643 pz)	n/a	Jak wyżej	1262486 – 1262869 pz	100	P5	TTAATG CTAGCGTTACCGT CCGCTATCGI CTATGTTC	3.23
pP6 (1643)	"A" (1028 pz)	Jak wyżej	934356 – 935387 pz	99	P6A1	CTGAACT GGCTCGTCAGTTT GCGCAA ACTCAACAACA	0.57
					P6A2	TTGGATA AACGCCAATT CCGCGATAAT CCGTCGCC	2.15
	"B" (129 pz)	Jak wyżej	630166 – 630215 pz	100	P6B	TCGCCA CGAAGGATT CCATTAACAT CCCACCGT	0.57
	"C" (312 pz)	Jak wyżej	1530734 – 1530986 pz	98	P6C	TTTTCAG GGATACGGCACATT GCTATTAATA TTTTGACGA	3.45
	"D" (182 pz)	Jak wyżej	1659822 - 1660003 pz	100	P6D	TTTACAT GGACAGATGCCAT CGACCAT GGTACGGA	0.55

Tabela 1. c.d.

Plazmid (długość insertu)	Nazwa Fragmentu (długość fragmentu)	Referencyjna sekw. DNA (Data Base and Accession No.)	Pozycja Insertu/Fragmentu w sekw. Referencyjnej	Stopień podobie- ństwa [%]	Nazwa Promotora	Region promotorowy przewidziany przez program BPProm program	LDF
pP7 (970)	n/a	Jak wyżej	375863 – 376832 pz	100	P7.1	TACACCTACGGCGTTTACAGGTATACTCGCTAAAA	3.16
					P7.2	TTGCCAATGGCGATATTGGTTTAACTTCACTGACG	2.91
					P7.3	TTCACGCCGCATCCGGCAGTCGTCTATTATCAACGCAT	6.48
pP8 (1431 pz)	"A" (169 pz)	Jak wyżej	1132280 – 1132448 pz	100	P8A	TCGAAAACAGTCACCGAACCTTTTTGTTATAGCTATCCGCA	1.22
	"B" (156 pz)		290913 – 291068 pz	100	P8B	TTGTTGTGTGACGAAAGCGGAACTATCCGGCTCTG	0.62
	"C" (124 pz)		2153008 – 2153131 pz	100	P8C	TTGTTTTCGCTATTCAGCACCCAGACAAAATGGCCTTCA	1.16
	"D" (315 pz)	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B (GenBank: CP000948.1)	1361456 – 1361770 pz	100	P8D	TTTTCTCCCGTTTCCGGTTTGTCTAAAATCCATGCTG	4.28
	"E" (683 pz)	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. MG1655 chromosome (NCBI Reference Seq. :NC_000913.2)	3945561 – 3946243 pz	100	P8E1	TCGAACTGTAAGCCTGTATGGGCATCTGATTTTGA	1.70
					P8E2	TCTCCGCAAATTATTTGTCTTATGATTTAAATGT	6.91
pP9 (351 pz)	"A" (253 pz)	Jak wyżej	251828 – 252080 pz	100	P9A	TGGAAAGACAACCTGGTGCTGGGATTATGATGTATACTA	2.54
	"B" (102 pz)		2298943 – 2299044 pz	100	-	Ilość przewidzianych sekwencji promotorowych= 0	-
pP10 (278 pz)	"A" (81 pz)	Jak wyżej	3514801 – 3514881 pz	100	-	Jak wyżej	-
	"B" (201 pz)		621454 – 621654 pz	100	P10B	TTGCCATCAAATATTTTAAATACCTATTCTTAGGCTGC	4.46
pP11 (340 pz)	"A" (254 pz)	Jak wyżej	328532 – 328785 pz	100	P11A	TTATTGATTGGACGTTCAATATAAAATGTGTCTTA	3.02
	"B" (90 pz)		3355641 – 3355730 pz	100	-	Ilość przewidzianych sekwencji promotorowych = 0	-

Tabela 2. Wynik porównania sekwencji promotorowych zidentyfikowanych przy użyciu programu BPProm z danymi zdeponowanymi w bazie danych RegulonDB

Plazmid	Ilość przewidzianych regionów promotorowych w badanym insercie	Nazwa Promotora [BPProm]	LDF [BPProm]	Promotor rzeczywisty [RegulonDB]	Referencyjna sekw. DNA (Data Base and Accession No.) [RegulonDB]	Pozycja +1 bp [RegulonDB]	Piśmiennictwo [RegulonDB]
pP1	1	P1	6.71	repE	Plazmid F DNA, complete sequence (GenBank: AP001918.1)	48425	Wada i wsp. 1987
pP5	1	P5	3.23	hemAp2	<i>E. coli</i> str. K-12 substr. MG1655 chromosome (NCBI Reference Seq. :NC_000913.2)	1262806	Choi i wsp. 1996 Verkamp i wsp. 1989
pP6	4	P6C	3.45	pptAp7	Jak wyżej	1530882	Huerta i wsp. 2003
pP9	1	P9A	2.54	yafNp	Jak wyżej	251969	Christensen-Dalsgaard et. al. 2010 Zaslaver i wsp. 2006
pP10	1	P10B	4.46	fepDp1	Jak wyżej	621457	Shea i wsp. 1991
pP11	1	P11A	3.02	betTp	Jak wyżej	328639	Lamark i wsp., 1996

Tabela 3. Sekwencje promotorowe o wysokim stopniu prawdopodobieństwa (czcionka pogrubiona) oraz sekwencje promotorowe dające wynik negatywny (czcionka zwykła) wskazane w analizie sekwencji DNA wybranych insertów/fragmentów DNA wymienionych w Tabeli 1 i 2.

Plazmid	Nazwa Promotora [BProm]	LDF	Domniemana sekwencja promotorowa zlokalizowana jest pomiędzy dwiema sąsiadującymi ORF/genami	Domniemana sekwencja promotorowa zlokalizowana jest na tej nici w tym samym kierunku co następujący po niej ORF/gen	Nazwa ORF/genu	Odległość pomiędzy promotorem a ORF/genem	Nazwa ORF/genu
pP2	P2	5.82	Nie (zachodząca na gen <i>yqjH</i>)	Tak	<i>yqjI</i>	117 pz	<i>yqjI</i>
	P3A	4.26	Tak	Tak	<i>fdoG</i>	223 pz	<i>fdoGHI-fdhE</i>
pP3	P3B	2.33	Nie (częściowo zachodząca na gen <i>livJ</i> gene i region: RIP259)	Nie	n/a	n/a	n/a

Tabela 3. c.d.

Plazmid	Nazwa Promotora [BProm]	LDF	Domniemana sekwencja promotorowa zlokalizowana jest pomiędzy dwiema sąsiadującymi ORF/genami	Domniemana sekwencja promotorowa zlokalizowana jest na tej nici w tym samym kierunku co następujący po niej ORF/gen	Nazwa ORF/genu	Odległość pomiędzy promotorem a ORF/genem	Nazwa ORF/genu
p4	p4A1	1.13	Tak	Tak	<i>ecdH10B_1333</i>	35 pz	<i>ecdH10B_1333</i>
	p4A2	0.73	Nie (zachodząca na <i>ECDH10B_1333</i> ORF)	Tak	<i>ecdH10B_1334</i>	562 pz	<i>ecdH10B_1334</i>
	p4A3	5.45	Tak	Tak	<i>ecdH10B_1334</i>	102 pz	<i>ecdH10B_1334</i>
	p4B1	1.14	Nie (zachodząca na gen <i>bgIX</i>)	Tak	<i>osmF</i>	1826 pz	n/a
p6	p6A1	0.57	Nie (zachodząca na gen <i>ftsK</i>)	Tak	<i>lolA</i>	2070 pz	n/a
	p6A2	2.15	Nie (zachodząca na gen <i>ftsK</i>)	Tak	<i>lolA</i>	801 pz	n/a
	p6B	0.57	Nie (zachodząca na gen <i>cstA</i>)	Nie	n/a	n/a	n/a
p7	p7.1	3.16	Tak	Tak	<i>yaiL</i>	34 pz	<i>yaiL</i>
	p7.2	2.91	Nie (zachodząca na gen <i>yaiL</i>)	Nie	n/a	n/a	n/a
	p7.3	6.48	Tak (częściowo zachodząca na region REP32)	Nie	n/a	n/a	n/a
p8	P8A	1.22	Nie (zachodząca na gen <i>flgE</i>)	Nie	n/a	n/a	n/a
	P8B	0.62	Nie zachodząca na gen <i>yagJ</i>)	Nie	n/a	n/a	n/a
	P8C	1.16	Nie (zachodząca na gen <i>mdtA</i>)	Nie	n/a	n/a	n/a
	P8D	4.28	Nie (zachodząca na ORF 15)	Nie	n/a	n/a	n/a
	P8E1	1.70	Nie (zachodząca na gen <i>hdfR</i>)	Tak	<i>yifE</i>	461 pz	<i>yifE</i>
	P8E2	6.91	Tak	Tak	<i>yifE</i>	85 pz	<i>yifE</i>

5.3.2. Mikroskopia fluorescencyjna

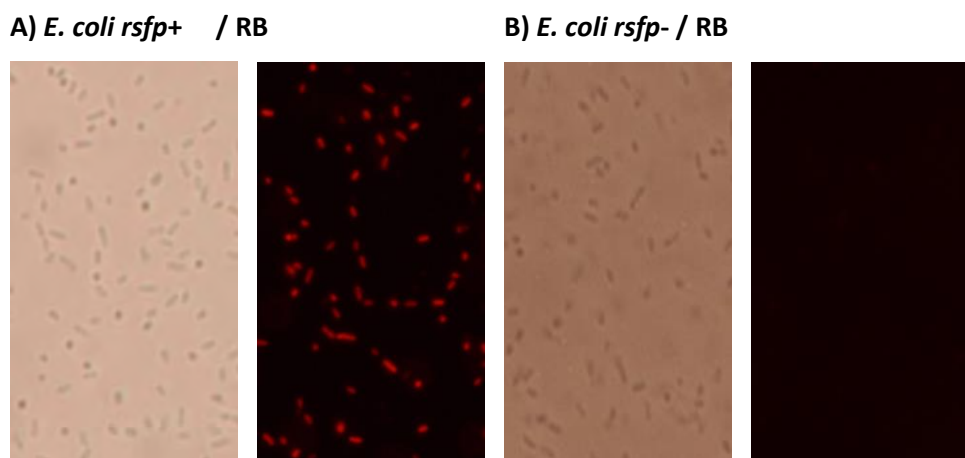
Mikroskopia fluorescencyjna to rodzaj mikroskopii świetlnej, w której wykorzystuje się zjawisko fluorescencji cząsteczek zwanych fluorochromami. Fluorochromy są zdolne do emisji światła zachodzącej w ciągu nanosekund po wzbudzeniu. W technice tej, światło wzbudzenia po skupieniu na badanym preparacie, kierowane jest do systemu filtrów i możliwe do obserwacji stają się tylko wzbudzone nim obiekty emitujące fluorescencję (Lichtman i Conchello, 2005).

Mikroskopia fluorescencyjna jest szeroko stosowana w badaniach biologicznych, np. w wykrywaniu i badaniu lokalizacji białek i innych cząsteczek w komórkach i tkankach, znakowaniu organelli komórkowych, diagnostyce wielu chorób i badaniu działania leków oraz w immunofluorescencji (Kałużny, 2011). Mikroskopia fluorescencyjna wykorzystywana jest także w szybkim wykrywaniu mikroorganizmów. Barwniki fluorescencyjne wiążą się z kwasami nukleinowymi i/lub białkami komórek bakteryjnych, co umożliwia np. określenie ich lokalizacji (wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowo) (Drevets i Elliott, 1995), śledzenie mikroorganizmów środowisku (Unge i wsp., 1999) i znakowanie szczepów rekombinantowych (Timms-Wilson i Bailey, 2001). W tym celu komórki bakteryjne mogą być barwione bezpośrednio poprzez kontakt z fluorochromem (Drevets i Elliott, 1995; Hara-Kaonga i Pistole, 2007; Betscheider i Jose, 2009). Oranż akrydynowy barwi zarówno komórki żywe jak i martwe, a rodamina B wykorzystana zostać może do barwienia martwych komórek bakteryjnych (Whitehead i wsp., 2009). Inną metodą jest wykorzystanie przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie wykazujących powinowactwo do specyficznych antygenów bakteryjnych, co umożliwia identyfikację drobnoustroju (Luhrmani wsp., 2001; Ferrari i wsp., 2003; Bruno i wsp., 2001). Rozwój technik inżynierii genetycznej pozwolił na stworzenie szczepów rekombinantowych znakowanych fluorescencyjnie umożliwiających badanie m.in. ekspresji genów. Stosowane w tej metodzie geny reporterowe to GFP (Timms-Wilson i Bailey, 2001; Unge i wsp., 1999), lucyferaza (Unge i wsp., 1999; Hakkila i wsp., 2002; Karsi i Lawrence, 2007), białko DsRed (Jakobs i wsp., 2000).

5.3.2.1. Zastosowanie białka RSFP w barwieniu komórek *E. coli* rodaminą B

W badaniu możliwości zastosowania białka RSFP w barwieniu komórek *E. coli* rodaminą B wykorzystano plazmid pP5, skonstruowany na bazie DNA plazmidu pTrap, zawierający fragment DNA genomowego *E. coli* TOP10F' niosący sekwencję promotorową (5.3.1.1) Zastosowanie tego plazmidu zapewnia wysoką, konstytutywną ekspresję genu *rsfp*. Wykonano

preparaty mikroskopowe komórek *E. coli* TOP10F' transformowanych DNA plazmidu pUC19 (*E. coli rsfp-*) oraz DNA plazmidu pP5 (*E. coli rsfp+*) hodowanych w obecności RB (4.2.17). Zdjęcia przygotowanych preparatów przedstawia rysunek 47.



Rys. 47. Fotografie preparatów mikroskopowych: a) komórek *E. coli rsfp+* (panel lewy – preparat w świetle widzialnym, panel prawy – preparat po wzbudzeniu światłem zielonym) oraz b) komórek *E. coli rsfp-* (panel lewy – preparat w świetle widzialnym, panel prawy – preparat po wzbudzeniu światłem zielonym).

Komórki *E. coli rsfp+* rosnące w obecności rodaminy B wykazują zjawisko fluorescencji po wzbudzeniu światłem zielonym i są widoczne pod mikroskopem fluorescencyjnym jako czerwone pałeczki. (rys. 47a). Spowodowane jest to akumulacją barwnika wewnątrz komórek bakteryjnych poprzez wiązanie się z białkiem RSFP. Komórki szczepu kontrolnego *E. coli rsfp-*, rosnące w obecności RB, poddane ekspozycji na światło zielone nie są widoczne pod mikroskopem (rys. 47b) (Bartasun i wsp., 2012).

5.3.3. Biosensory komórkowe

Wzrost zanieczyszczenia środowiska wywołany działalnością człowieka powoduje konieczność opracowywania nowych, skutecznych metod wykrywania oraz usuwania szkodliwych związków chemicznych. Konwencjonalne techniki analiz jakościowych i ilościowych zanieczyszczeń, charakteryzujące się dużą dokładnością i czułością oznaczeń, są drogie i skomplikowane. Nie zawsze możliwe jest także oznaczenie frakcji biodostępnej zanieczyszczeń (Matejczyk, 2004; Belkin, 2003). Oznaczanie zanieczyszczeń może być oparte na wykorzystaniu systemów biologicznych np. biosensorów. W metodach biologicznych nie oznacza się poziomu konkretnego związku chemicznego a wpływ tego związku na organizm, organelle lub enzym (Belkin, 2003).

Biosensor to urządzenie analityczne będące połączeniem czynnika biologicznego – bioreceptora oraz czynnika przetwarzającego informacje i wywołującego proporcjonalną do stężenia wykrywanej substancji odpowiedź (Lei i wsp., 2006). Jest to rodzaj sondy

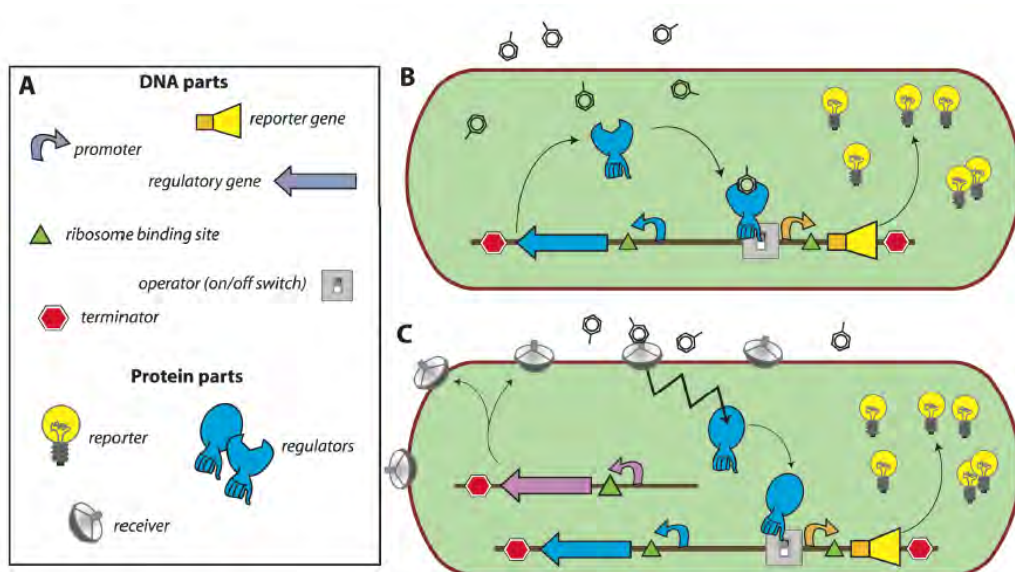
wykrywającej i zapisującej informacje związane ze zmianami fizjologicznymi i biochemicznymi w układzie. W skład biosensora wchodzi biologiczny system rozpoznawania wrażliwy na znajdującą się w środowisku substancję (analit) oraz układ przetwarzający uzyskiwany sygnał biologiczny na sygnał elektroniczny. Umożliwia on szybkie i dokładne oznaczenie wielu substancji, nawet na bardzo niskim poziomie (Matejczyk, 2010).

Najczęściej stosowanymi w konstrukcji biosensorów czynnikami biologicznymi są enzymy, ze względu na wysoką specyficzność substratową. Z powodu wysokich kosztów, jak również znacznej wrażliwości i braku stabilności *in vitro*, ich zastosowanie jest ograniczone (Su i wsp., 2011). Ponad 90% enzymów stanowią enzymy wewnątrzkomórkowe, stąd zastosowanie całych komórek w wielu procesach przemysłowych daje lepsze rezultaty niż użycie oczyszczonych enzymów. Użycie żywych komórek eliminuje potrzebę oczyszczenia preparatu enzymu, pozostawiając enzym w jego naturalnym środowisku – komórce, co zwiększa jego stabilność i chroni przed inaktywacją. Zastosowanie całych komórek pozwala także na wykorzystanie kilku enzymów jednocześnie (D'Suozza, 2001). Określenie biodostępności, toksyczności oraz genotoksyczności zanieczyszczeń nie jest możliwe na drodze analiz chemicznych, zastosowanie komórek żywych pozwala na obserwowanie wpływu tych związków na funkcjonowanie komórki (Belkin, 2003). W przeciwieństwie do innych biologicznych metody wykrywania, techniki wykorzystujące całe, żywe komórki pozwalają na określenie aktywności badanej próbki, lecz nie na identyfikację zawartych w niej związków. Odpowiedź komórek na analit może być zaobserwowana jako zmiany wzoru i tempa ekspresji genów, szybkości metabolizmu, żywotności, co pozwala na określenie ogólnego wpływu badanego związku. Nie jest to możliwe przy zastosowaniu metod chemicznych. Ponadto, wykorzystanie żywych komórek pozwala na obniżenie ilości stosowanych reagentów oraz monitorowanie efektu biologicznego w czasie rzeczywistym, bez konieczności wstępnej obróbki próbek np. barwienia czy hybrydyzacji (Elad i wsp., 2010).

Pośród potencjalnych biosensorów, mikroorganizmy stanowią grupę charakteryzującą się wieloma właściwościami użytecznymi w projektowaniu biocujników, pośród których wymienić należy m.in. zdolność do wykrywania i metabolizowania szerokiej gamy związków chemicznych, łatwość ulegania modyfikacjom genetycznym, możliwość wykorzystania w środowiskach o różnym pH i temperaturze (Lei i wsp., 2006; D'Suozza, 2001). Ponadto, mikroorganizmy, takie jak algi, bakterie i grzyby są łatwe do uzyskania w znacznych ilościach. W porównaniu do komórek organizmów wyższych komórki drobnoustrojów wykazują większą stabilność *in vitro*. Rozwój biologii molekularnej umożliwił konstruowanie organizmów modyfikowanych genetycznie, co pozwala na projektowanie biosensorów mikrobiologicznych o zmienionej specyficzności i czułości (Su i wsp., 2011). Jako biosensory komórkowe mogą być

wykorzystane zarówno komórki żywe jak i martwe. Żywe mikroorganizmy są zdolne do metabolizowania wielu różnych związków na drodze oddychania tlenowego lub beztlenowego. Produkty metabolizmu takie jak amoniak, dwutlenek węgla, kwasy itp. są substancjami łatwymi w detekcji, jak również poddającymi się łatwo analizie ilościowej. Analiza jakościowa i ilościowa tych metabolitów wykorzystywana jest w przypadkach, gdy asymilacja substratu – analitu może być zmierzona przez określenie biologicznego zapotrzebowania na tlen (BZT) lub jakiegoś innego składnika podłoża, metabolicznie związanego z analitem. Główną wadą biosensorów komórkowych w porównaniu z enzymami jest szybkość dyfuzji analitu do wnętrza komórki. Jednym ze sposobów ominięcia tego problemu jest permeabilizacja komórek metodami fizycznymi, chemicznymi i enzymatycznymi. Powoduje to wytworzenie porów w błonie komórkowej, przez które do cytozolu wniknąć mogą substancje niskocząsteczkowe. Metody te pozwalają na zachowanie składników komórki w nienaruszonym stanie (D'Suozza, 2001).

Najczęściej stosowanym rozwiązaniem w konstrukcji biosensorów jest wykorzystanie genetycznie zmodyfikowanych komórek bakteryjnych, zdolnych do produkcji białek reporterowych. W tego typu systemach, białka reporterowe produkowane są w komórce w wyniku interakcji składników regulatorowych systemu transkrypcyjnego z określonym analitem lub też w wyniku zmian warunków środowiska. Wybór odpowiedniego genu reporterowego podyktowany jest zastosowaniem bioczuJNIka, którego będzie elementem. Powszechnie stosowanymi genami markerowymi są geny kodujące autofluorescencyjne białka, takie jak GFP i DsRed oraz lucyferazy, bakteryjna i eukariotyczna, dla działania których konieczne jest dostarczenie dodatkowego substratu. Innym typem genu reporterowego są geny kodujące białka, których oznaczenie aktywności oparte jest o metody kolorymetryczne lub elektrochemiczne, np. β -galaktozydaza. Mechanizm działania takich systemów przedstawia rys. 48. Elementy DNA potrzebne do skonstruowania systemu sensor-reporter (rys. 48A) to gen reporterowy, gen regulatorowy (niezbędne do wytworzenia sygnału), sekwencja promotorowa, operatorowa, terminatorowa, RBS (konieczne do kontroli ekspresji genów). Ekspresja genu reporterowego podlega kontroli czynników transkrypcyjnych oddziałujących np. z sekwencją promotorową. W układzie takim występować może jedno białko regulatorowe wiążące dany analit, co indukuje ekspresję genu reporterowego (rys. 48B). Jeżeli funkcję sensora i regulatora pełnią dwa białka, wtedy analit wykrywany jest przez białko receptorowe w przestrzeni periplazmatycznej, skąd przekazywany jest sygnał do białka regulatorowego indukującego ekspresję genu reporterowego (rys. 48C). W obu przypadkach mierzona jest aktywność białka reporterowego. Specyficzność rozpoznawania danej substancji zależna jest od aktywności pierwszego białka wiążącego analit (Tecon i van der Meer, 2008).



Rys. 48. Schemat działania biosensora komórkowego (opis w tekście) (Tecon i van der Meer, 2008).

W celu łatwej i efektywnej zmiany sygnału biologicznego na mierzalną wartość fizyczną konieczne jest unieruchomienie składnika biologicznego biosensora. Zapewnia to wyższą stabilność układu oraz dostateczną bliskość pomiędzy czujnikiem i odbiornikiem (Matejczyk, 2010). Tradycyjne metody immobilizacji to: pułapkowanie, kapsułkowanie, unieruchomienie za pomocą wiązań kowalencyjnych, sieciowanie oraz techniki wykorzystujące zjawisko adsorpcji fizycznej. Zakres metod immobilizacji biosensorów jest stale rozszerzany, co pozwala na zastosowanie technik zwiększających stabilność mikroorganizmów pełniących rolę biosensorów (Su i wsp., 2011). Właściwa procedura unieruchomienia powinna umożliwiać równomierne rozmieszczenie czynnika biologicznego, zachowanie odpowiedniej odległości pomiędzy biosensorem i urządzeniem przetwarzającym sygnał oraz zapewnić możliwość długoterminowego przechowywania (Elad i wsp., 2010).

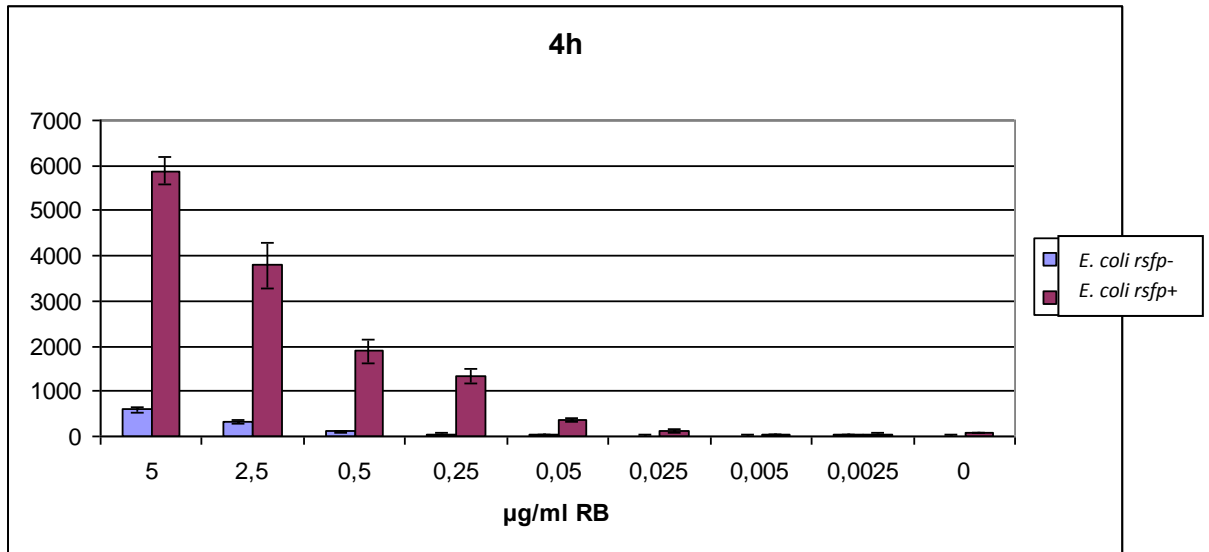
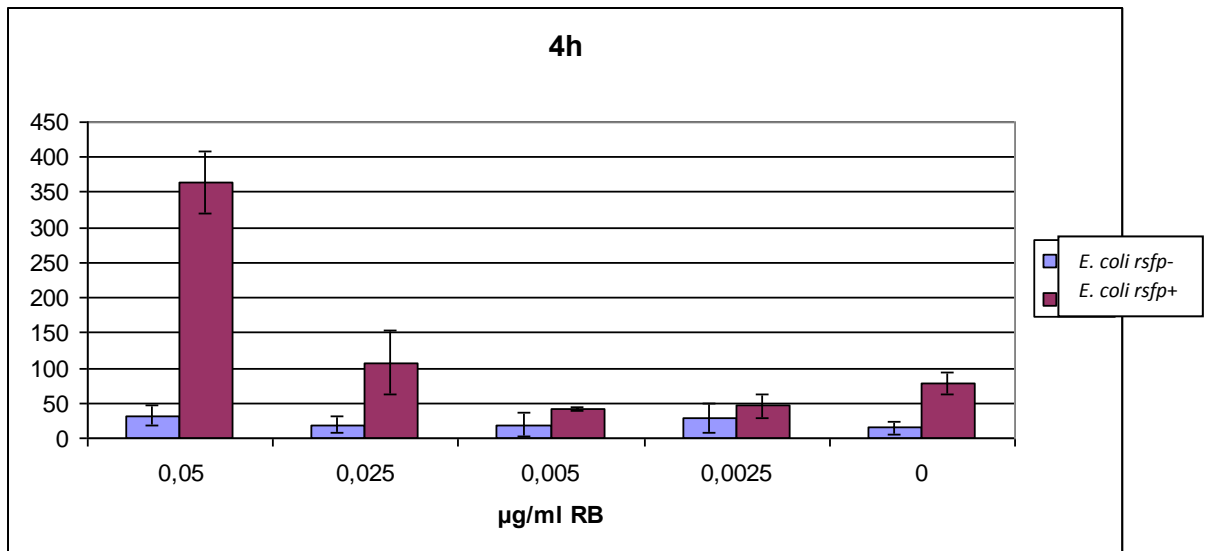
5.3.3.1. Komórki *E. coli rsfp+* w wykrywaniu rodaminy B

Uwolniona do środowiska rodamina B jest obecnie uważana za związek nie biodegradowalny, co oznacza, że pozostaje w nim w postaci wykazującej toksyczność dla organizmów żywych. Obecny rozwój technik analitycznych pozwala na monitorowanie stężenia i obecności RB w środowisku. Metody te nie są jednak miarodajne w przypadku pomiarów biodostępności RB. Na dzień dzisiejszy najlepszą metodą kontroli biodostępność substancji toksycznych obecnych w środowisku jest skonstruowanie np. biosensora komórkowego.

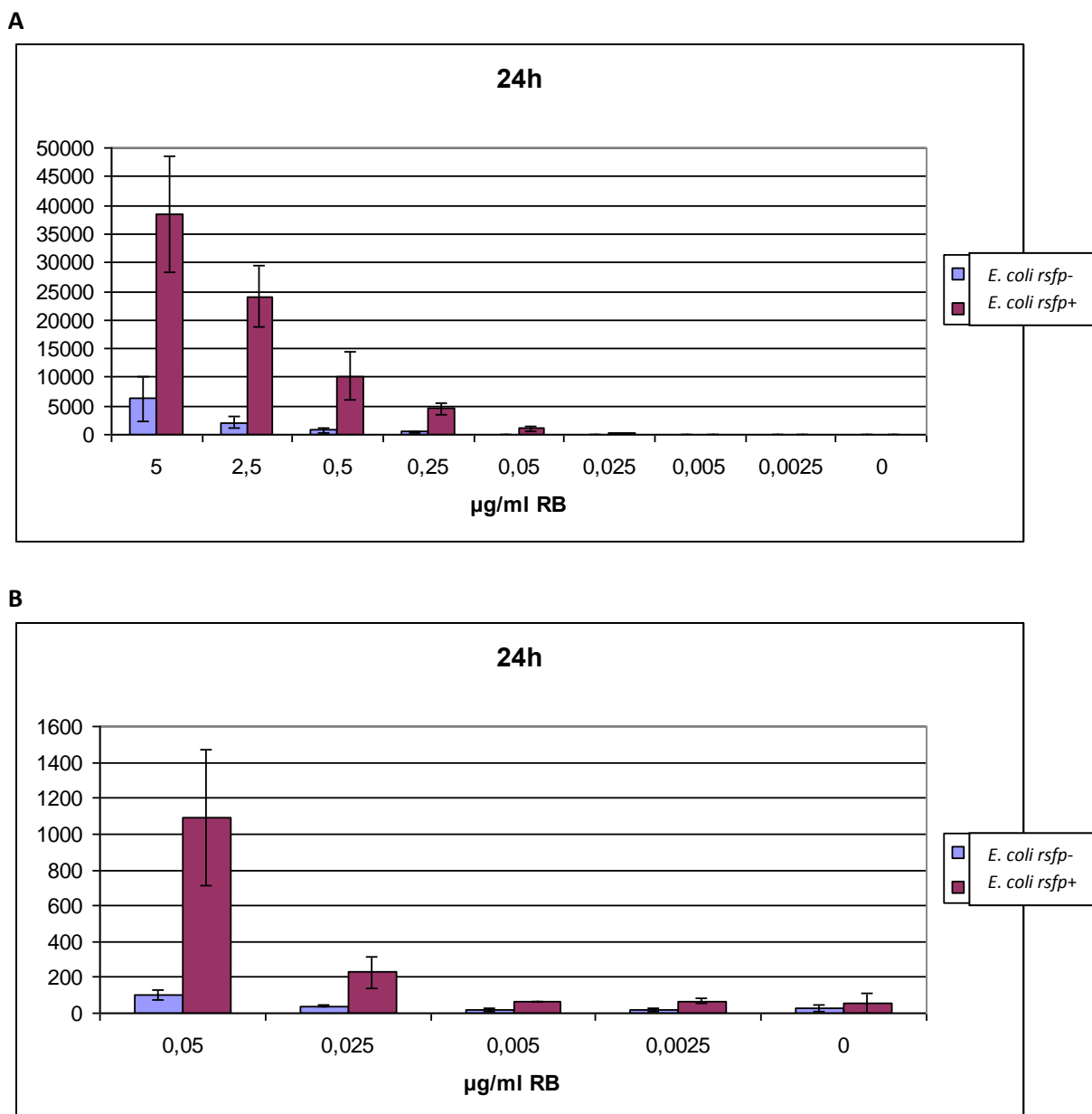
Analizując wyniki z rozdziału dotyczącego zastosowania rekombinantowych komórek *E. coli* szczepu pP5 (5.3.2.1) przeprowadzono badania nad możliwością zastosowania szczepu *E. coli* ekspresyjnego gen *rsfp* w konstrukcji biosensora komórkowego do wykrywania

rodaminy B w próbkach środowiskowych wody. Sprawdzone możliwość zastosowania zjawiska oddziaływania RB z RSFP i jego wpływu na właściwości spektralne RB do konstrukcji biosensora komórkowego pozwalającego badać biodostępność RB w próbkach wody. Zbadano różnice w oddziaływaniu komórek bakteryjnych ekspresujących gen *rsfp* oraz komórek nie niosących tego genu z RB oraz określono przydatność szczepu bakteryjnego ekspresującego gen *rsfp* jako biosensora wykrywania RB. W badaniach wykorzystano szczep *E. coli* TOP10F'/pP5 (*E. coli rsfp+*) zdolny do konstytutywnej produkcji białka RSFP (5.3.1.1) oraz szczep kontrolny *E. coli* TOP10F'/pUC19 (*E. coli rsfp-*). Prowadzono hodowle tych szczepów w obecności RB w pożywce (4.2.1), a następnie przygotowano próby do pomiarów spektrofotometrycznych (4.2.15.6). Przeprowadzono pomiary gęstości optycznej zawiesin bakteryjnych przy długości fali 600 nm i równolegle wykonano pomiary intensywności fluorescencji próbek stosując falę wzbudzenia o długości 553 nm (maksimum absorpcyjne RB) i odczytując wielkość emisji w 585 nm. Pomiar gęstości optycznej był niezbędny, ponieważ pozwala on na przełożenie wielkości zmierzonej intensywności fluorescencji próbki na wartość intensywności fluorescencji jednej komórki bakteryjnej, co z kolei umożliwia określenie tzw. jasności próbki. Jasność próbki stanowi iloraz wartości intensywności fluorescencji danej próbki i wartości gęstości optycznej hodowli, wyznaczanej jako wartość absorpcji próbki przy długości fali 600 nm (wartość standardowa dla pomiarów gęstości optycznej komórek *E. coli*).

Zawiesiny komórek *E. coli rsfp+* wykazują znacznie wyższe wartości jasności niż zawiesiny komórek *E. coli rsfp-* dla każdego z badanych stężeń rodaminy B (rys. 49 i 50). Oznacza to, że białko RSFP wiąże RB, wskutek czego następuje akumulacja barwnika we wnętrzu komórek *E. coli rsfp+*. Proces ten zachodzi ze znacząco niższą wydajnością w komórkach szczepu kontrolnego (adsorpcja niespecyficzna). Wydajność akumulacji RB w komórkach *E. coli* wzrasta wraz z czasem prowadzenia hodowli (wartości jasności znacznie wyższe po 24 h hodowli niż po 4 h; rys. 49 i 50)

A**B**

Rys. 49. Wykres jasności dla szczepu *E. coli rsfp-* oraz *E. coli rsfp+* po 4h hodowli w obecności RB (rys. B stanowi powiększenie skali rysunku A).



Rys. 50. Wykres jasności dla szczepu *E. coli rsfp-* oraz *E. coli rsfp+* po 24h hodowli w obecności RB (rys. B stanowi powiększenie skali rysunku A)

Wykonane badania pozwoliły na określenie progu czułości metody, który wynosił 25 ng/ml rodaminy B. Próg czułości metod analitycznych wynosi 1,2-3 ng/ml (Soylak i wsp., 2011; Taziki i wsp., 2012), jednak w metodach tych oznaczana jest całkowita ilość RB w próbce, nie tylko frakcja biodostępna. Zaproponowana tu metoda pozwala na określenie ilości RB będącej w formie biodostępnej. Po udoskonaleniu procedury szczep *E. coli rsfp+* mógłby znaleźć zastosowanie w konstrukcji biosensora RB znajdującej się we frakcji biodostępnej. Dalsze badania będą prowadziły do miniaturyzacji układu i zwiększenia czułości takiego biosensora komórkowego.

Podsumowanie

Oceniono przydatność genu *rsfp* jako genu reporterowego w konstrukcji wektorów pułapkowych i barwieniu fluorescencyjnym komórek. Wyniki tych badań opublikowano w czasopiśmie *Journal of General and Applied Microbiology* (Bartasun i wsp., 2012). Uzyskano nowy typ biosensora komórkowego umożliwiającego detekcję bardzo niskich stężeń rodaminy B w próbkach środowiskowych wody.

6. Omówienie i dyskusja wyników

Metagenomika pozwala na izolację i badanie genów pochodzących z materiału genetycznego próbek środowiskowych. Obecnie jedynie około 1% mikroorganizmów znajdujących się w środowisku jest hodowalnych w warunkach laboratoryjnych. Stanowi to poważne ograniczenie dla badania genomu oraz pozyskiwania nowych substancji będących produktami metabolizmu organizmów niehodowalnych (Deja-Sikora i wsp., 2007). Metagenomika to technika umożliwiająca izolację całkowitego DNA z danego środowiska (np. z gleby, wód, powietrza) oraz analizę i ekspresję tak pozyskanego materiału genetycznego. Otwiera ona wiele możliwości zarówno dla badań podstawowych jak i mających na celu praktyczne wykorzystanie danej substancji, np. w przemyśle.

Gen *rsfp*, będący przedmiotem tej rozprawy, został wyizolowany w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej w trakcie przeszukiwania biblioteki metagenomowej w kierunku identyfikacji enzymów lipolitycznych aktywnych w niskich temperaturach. W przedstawionej pracy podjęto próbę wyjaśnienia zjawiska fluorescencji rodaminę B w obecności białka RSFP będącego fosforylazą metylotioadenozyny bakterii z rodzaju *Psychrobacter*. Pierwsze doniesienie o zjawisku różowej fluorescencji zachodzącej po wzbudzeniu światłem UV rekombinantowych komórek *E. coli*, rosnących na podłożu zawierającym rodaminę B, niosących gen *rsfp* przedstawione zostało w pracy zespołu badawczego Katedry Mikrobiologii z roku 2009 (Cieśliński i wsp., 2009). Komórki *E. coli* posiadające gen *rsfp*, rosnące na podłożu zawierającym ten barwnik wykazują fluorescencję w świetle UV, w przeciwieństwie do komórek, w których nie zachodzi ekspresja tego genu. Na tym etapie badań ustalono, że niezbędnymi czynnikami do powstania opisanej fluorescencji są rodamina B i produkt ekspresji genu *rsfp*. Jednak dokładna zależność pomiędzy tymi czynnikami i natura tego oddziaływania nie była znana.

W dostępnej literaturze nie opisano do tej pory żadnego oddziaływania fosforylasy metylotioadenozyny z rodaminą B. Z powodu braku danych na temat zjawiska silnej różowej fluorescencji rodaminę B w obecności tego białka po wzbudzeniu światłem UV postanowiono wyjaśnić jego mechanizm. Jako techniki badania oddziaływania białka RSFP z rodaminą B wybrano techniki spektrofotometryczne oraz krystalograficzne. Do badań tych niezbędne było uzyskanie oczyszczonego preparatu białka RSFP, ponieważ wcześniejsze próby uzyskania białka RSFP w komórkach *E. coli* w systemie Tabora-Studiera nie powiodły się (Cieśliński i wsp., 2009). W celu otrzymania białka RSFP w formie rozpuszczalnej skonstruowano plazmid rekombinantowy pBAD-RSFP umożliwiający wydajną ekspresję genu *rsfp* w komórkach *E. coli*

LMG194 w systemie arabinozowym, a następnie białko oczyszczono wykorzystując chromatografię jonowymienną.

Zbadano wpływ obecności białka RSFP na widma absorpcyjne i fluorescencyjne rodaminy B. Techniki pomiarów absorpcji i fluorescencji były wcześniej wykorzystywane w badaniu oddziaływań cząsteczek rodaminy B z powierzchnią gliny, kwarcu, nanocząsteczek złota, szkła i BSA (Gollnick i wsp., 1981; Kemnitz i wsp., 1983; Kemnitz i wsp., 1986; Van der Auweraer i wsp., 1988; Birla i wsp., 2004; Gao i wsp., 2007). Uzyskano widma absorpcyjne i emisyjne rodaminy B w obecności i przy braku białka RSFP. Dowiedziono, że rodamina B w obecności białka RSFP, jak również lizatu komórkowego zawierającego białko RSFP wykazuje zjawisko fluorescencji po wzbudzeniu światłem UV o długości fali 312 nm. Poziom fluorescencji przy tej długości fali wzbudzenia w przypadku roztworu rodaminy B jest znacznie niższy. Preparat białka RSFP nie wykazuje fluorescencji w zakresie światła widzialnego (400-700 nm), co oznacza, że białko RSFP nie jest białkiem autofluorescencyjnym takim jak np. GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*) (Chalfie, 1995) i nie posiada grup chromoforowych mogących odpowiadać za powstawanie zjawiska fluorescencji. Powstająca fluorescencja musi być zatem wynikiem interakcji zachodzących pomiędzy białkiem RSFP a cząsteczkami rodaminy B. Analiza widm absorpcyjnych i emisyjnych wykazała, że cząsteczki rodaminy B wiążą się z białkiem RSFP. Zjawisko akumulacji rodaminy B w komórkach bakteryjnych w obecności białka RSFP oraz dane literaturowe na temat wpływu zjawiska adsorpcji na właściwości spektralne barwnika (Gollnick i wsp., 1981; Kemnitz i wsp., 1983; Kemnitz i wsp., 1986; Van der Auweraer i wsp. 1988; Zhu i wsp., 2009) świadczą o tym, że cząsteczki rodaminy B są wiązane na powierzchni białka RSFP, czego konsekwencją jest przesunięcie batochromowe (w kierunku fal dłuższych) widma absorpcyjnego barwnika. W obecności białka RSFP następuje wzrost wartości absorbancji rodaminy B przy długości fali 312 nm i zwiększona emisja promieniowania barwnika po wzbudzeniu falą światła o tej długości w porównaniu do absorpcji i emisji dla czystego barwnika. Poziom absorpcji rodaminy B lub rodaminy B w obecności białek nie oddziałujących z nią w taki sposób jak RSFP (np. białka lizatu komórek *E. coli rsfp-*) przy długości fali 312 nm jest znacznie niższy niż dla rodaminy B związanej z RSFP. W przypadku wzbudzenia roztworu rodaminy B zawierającego białko RSFP światłem o długości fali 557 nm (wartość odpowiadająca maksimum absorpcji rodaminy B w obecności białka RSFP) występuje ponad trzykrotny wzrost intensywności fluorescencji barwnika w stosunku do intensywności fluorescencji roztworu czystej rodaminy B. Podczas wzbudzania roztworu światłem o długości fali 554 nm następuje przede wszystkim wzbudzenie frakcji cząsteczek rodaminy B nie związanej z RSFP. Poziom intensywności fluorescencji podczas wzbudzania roztworu światłem o długości fali 554 nm (wartość odpowiadająca maksimum absorpcji czystej rodaminy B) był

taki sam jak poziom fluorescencji roztworu czystej rodaminy B. Podczas wzbudzenia roztworu światłem o długości fali 557 nm wzbudzone są kompleksy rodaminy B z białkiem RSFP, które w roztworze rodaminy B i białka RSFP stanowią prawdopodobnie większość obecnych w nim fluoroforów, a także charakteryzują się wyższym poziomem absorpcji i fluorescencji. Występujące przesunięcie batochromowe widm rodaminy B wraz ze wzrastającym stężeniem RSFP wskazuje na tzw. statyczny mechanizm oddziaływania obejmujący tworzenie trwałego kompleksu cząsteczek RSFP-RB. Jednakże, kształt krzywej Sterna-Volmera (nieliniowość wykresu) świadczy o tym, że oddziaływanie rodaminy B z RSFP może przebiegać nie tylko poprzez mechanizm statyczny wiązania cząsteczek rodaminy B, ale także dynamiczny to znaczy poprzez oddziaływania krótkotrwałe na skutek kolizji cząsteczek powiązanej z transferem energii. Cząsteczka rodaminy B występuje w roztworach wodnych w formie jonu obojnaczego, przez co jest zdolna do oddziaływania z białkami. Wcześniejsze doniesienia literaturowe opisują badania oddziaływań rodaminy B z białkami, np. z BSA (Zhu i wsp., 2009; Cai i wsp., 2010; Bhattacharya i wsp., 2011). Nie obserwowano jednak podczas tych badań zjawiska fluorescencji rodaminy B w obecności BSA ani zmian w widmie absorpcyjnym i emisyjnym rodaminy B polegających na przesunięciu batochromowym tych widm. Po związaniu rodaminy B przez białko RSFP zmieniają się jej właściwości spektralne na skutek zmiany środowiska wokół cząsteczki, czego konsekwencją jest zmiana w przebiegu widm absorpcyjnych i emisyjnych. Emisja światła następująca po wzbudzeniu cząsteczki rodaminy B związanej z RSFP falą światła o długości 312 nm jest znacznie wyższa i jej maksimum występuje przy innej długości fali niż dla samej rodaminy B. Wyjaśnia to powstanie zjawiska różowej fluorescencji komórek *E. coli rsfp+* rosnących na podłożu zawierającym rodaminę B zachodzące po wzbudzeniu ich światłem UV.

Uzyskane wyniki oddziaływania rodaminy B z RSFP potwierdzone zostały także przy wykorzystaniu techniki spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS). Badania te potwierdzają, że rodamina B wiąże się z białkiem RSFP i tak utworzony kompleks o większej masie niż cząsteczka rodaminy B porusza się znacznie wolniej w objętości konfokalnej.

Otrzymano struktury krystaliczne białka RSFP będącego w formie *apo*, jak również kompleksu tego białka z rodaminą B. Analiza struktury krystalicznej kompleksu RSFP/RB wskazała na istnienie trzech miejsc wiązania rodaminy B zlokalizowanych w szczelinie pomiędzy sąsiadującymi monomerami trimeru RSFP. Rozmiar tej kieszeni umożliwia wiązanie dwóch cząsteczek rodaminy B. Miejsce to odpowiada centrum aktywnemu fosforylaz metyloadenozyny, więc w obecności substratu zajęte jest przez cząsteczkę MTA. Wyniki badań krystalograficznych białka RSFP w obecności rodaminy B wykazały, że za wiązanie cząsteczki barwnika odpowiedzialne są reszty aminokwasowe kwasu asparaginowego 222,

kwasy asparaginowe 224 oraz feniloalaniny 179. Na drodze mutagenyzy ukierunkowanej wprowadzono w miejscach wymienionych reszt aminokwasowych resztę alaniny lub tyrozyny, generując serie wariantów białka RSFP posiadających pojedyncze różnice w sekwencji aminokwasowej. Obserwacje fluorescencji komórek produkujących nowe warianty białka RSFP w obecności rodamininy B pozwoliły na identyfikację dwóch reszt kwasu asparaginowego (Asp222 i Asp224) i reszty feniloalaniny 179 jako reszt aminokwasowych bezpośrednio odpowiedzialnych za wiązanie rodamininy B i występowanie zjawiska różowej fluorescencji. Ponadto, dalsze analizy porównawcze homologii struktury krystalicznej oraz sekwencji aminokwasowej białka RSFP ze strukturami oraz sekwencjami aminokwasowymi znanych fosforylaz metylootioadenozyny, np. ludzkiej fosforylasy metylootioadenozyny, potwierdziły, że te same reszty kwasu asparaginowego odpowiadają zakonserwowanym resztom katalicznym tego enzymu. Warianty białka RSFP: RSFP-D222A, RSFP-D224A, RSFP-D222AD224A oraz RSFP-F179A nie są zdolne do oddziaływania z rodaminą B, co zostało potwierdzone przez analizy właściwości spektralnych rodamininy B, w tym techniką FCS. W przypadku wariantu sekwencyjnego białka RSFP-F179Y zaobserwowano wydłużenie czasu dyfuzji rodamininy B w objętości konfokalnej w stosunku do czasu dyfuzji czystej rodamininy B, co może być wywołane oddziaływaniem cząsteczki rodamininy B z białkiem RSFP-F179Y. Reszta aminokwasowa tyrozyny podobnie jak reszta aminokwasowa feniloalaniny zawiera pierścień aromatyczny grupy fenylowej, który może umożliwiać oddziaływania hydrofobowe (asocjacja warstwowa typu π - π) pomiędzy resztą aminokwasową a pierścieniem aromatycznym rodamininy B, zachodzące w miejscu aktywnym RSFP. Oddziaływania te są na tyle słabe, że zaobserwowanie zmian w widmie absorpcyjnym nie jest możliwe. Technika FCS jest techniką dokładniejszą i bardziej czułą niż pomiary UV-VIS i pozwala na zmierzenie ruchu pojedynczej, fluoryzującej cząsteczki. Przeprowadzone tą techniką eksperymenty pozwoliły na zaobserwowanie oddziaływania rodamininy B z białkiem RSFP-F179Y, niewykrywalnego inną techniką.

Przedstawione wyżej wyniki, pozwalają stwierdzić, że reszty aminokwasowe kwasu asparaginowego 222 i 224 białka RSFP biorą udział w związaniu i utrzymaniu cząsteczki rodamininy B w centrum aktywnym. Pomiędzy resztą Phe179 a cząsteczką rodamininy B zachodzą oddziaływania hydrofobowe (asocjacja warstwowa typu π - π), którym towarzyszyć może transfer energii pomiędzy pierścieniami aromatycznymi tych cząsteczek (Lu i wsp., 2009), skutkujący zmianą właściwości spektralnych rodamininy B i wzrostem intensywności fluorescencji cząsteczki rodamininy B związanej przez białko.

W niniejszej pracy, potwierdzono, że białko RSFP wykazuje aktywność fosforylaza metylo tioadenozyny i zdolne jest do przekształcenia 5'-deoksy-5'-(metylo tio)adenozyny w metylo tioarybozo-1-fosforan oraz adeninę.

Geny kodujące fosforylazę metylo tioadenozyny występują we wszystkich organizmach żywych. Enzym ten odpowiedzialny jest głównie za pierwszy etap odzyskiwania metioniny po odłączeniu tej reszty aminokwasowej od S-adenozylometioniny (Sekowska i wsp., 2004). Gen kodujący ten enzym obecny w zdrowych komórkach człowieka jest jednym z genów cytohomeostatycznych (ang. *housekeeping genes*). Enzym MTAP odpowiedzialny jest za utrzymanie prawidłowego poziomu zawartości związków siarki w komórce. Ilość tego enzymu w komórkach nowotworowych różnego typu jest znacznie niższa niż w komórkach zdrowych (Behrmann i wsp., 2003; Berasain i wsp., 2004; Subhi i wsp., 2004; Hellerbrand i wsp., 2006; Marcé i wsp., 2006). Choć brak aktywności MTAP wydaje się być konsekwencją, a nie przyczyną kancerogenezy, z całą pewnością stwierdzić należy, że zaburza to metabolizm puryn w komórce. Przy braku MTAP komórki nie są zdolne do wytworzenia nukleotydów adeninowych i odzysku metioniny (Chen i wsp., 1997). Z drugiej strony komórki nowotworowe pozbawione MTAP wykazują znacznie wyższą wrażliwość na chemoterapeutyki i z tego względu poszukiwane są inhibitory tego enzymu, które mogłyby zostać wykorzystane w terapii chorób nowotworowych (Appleby i wsp., 1999). Białko RSFP wykazuje wysoki stopień podobieństwa strukturalnego do ludzkiej fosforylaza metylo tioadenozyny. Podobnie jak białko RSFP ludzka MTAP jest trimerem złożonym z identycznych podjednostek. Monomer białka RSFP ma zbliżoną masę do monomeru ludzkiej MTAP. W centrum każdego asymetrycznego monomeru ludzkiej MTAP znajduje się osiem struktur β -nici (analogicznie do centrum monomeru białka RSFP). Ludzka fosforylaza metylo tioadenozyny zawiera trzy miejsca aktywne, które zlokalizowane są w obszarze pomiędzy sąsiadującymi monomerami. Zarówno lokalizacja, jak i struktura tego centrum aktywnego jest podobna w obu opisywanych białkach. Za oddziaływanie z cząsteczką substratu w obu białkach zaangażowane są dwie reszty aminokwasowe kwasu asparaginowego oraz reszta aminokwasowa fenyloalaniny (Appleby i wsp., 1999). Rodamina B została uznana za związek toksyczny i potencjalnie kancerogenny (Kaji i wsp., 1991a; Kaji i wsp., 1991b; Jain i wsp., 2007), jednak dokładny mechanizm wpływu tego barwnika na komórki żywe nie jest znany. Na podstawie badań przedstawionych w niniejszej pracy, polegających na analizie widm absorpcyjnych i emisyjnych rodminy B w obecności RSFP oraz badaniach FCS i krystalograficznych, można wysunąć hipotezę, że za toksyczne właściwości rodminy B w stosunku do komórek ludzkich odpowiedzialne może być wiązanie tego barwnika przez MTAP. Oddziaływania zachodzące pomiędzy rodaminą B a białkami mogą być kluczowe w wyjaśnieniu jej szkodliwości. Zajęcie centrum aktywnego

przez cząsteczki barwnika konkurujące z wiązaniem tam cząsteczki substratu prowadzić może do obniżenia lub zahamowania aktywności MTAP, co zaburza jeden z podstawowych szlaków metabolicznych w komórce. Z tego powodu podjęte zostać powinny badania mające na celu otrzymanie ludzkiego enzymu MTAP (np. w komórkach *E. coli* LMG194 w systemie arabinozowym) i zbadanie jego oddziaływania z rodaminą B w sposób podobny do opisanego w tej pracy doktorskiej. Pomóc to może w zrozumieniu biodystrybucji, metabolizmu i efektu farmakologicznego rodminy B na komórki ludzkie.

Geny reporterowe są szeroko stosowane z wektorach pułapkowych służących do szybkiego i prostego poszukiwania sekwencji promotorowych oraz oceny ich siły. W wektorach pułapkowych znalazły zastosowanie geny reporterowe takie jak: gen *gfp* z *Aequorea victoria* kodujący zieloną proteinę fluoryzującą (Miller i wsp., 2000; Pothier i wsp., 2007; Rasko i wsp., 2007), gen *lacZ* *E. coli* kodujący β -galaktozydazę (Fan i wsp., 2009; Li i wsp., 2007b; Zhang i wsp., 2007), a także gen *luxAB* kodujący lucyferazę *Vibrio fischeri* (Aoki i wsp., 2002; Kunert i wsp., 2000). Także geny nadające komórkom oporność na antybiotyki stosowane są w konstrukcji wektorów typu promoter-trap, np. gen *cat* kodujący acetylotransferazę chloramfenikolu (Jeong i wsp., 2006; Das Gupta i wsp., 1993; Marraccini i wsp., 1993; Kili i wsp., 1999). Nadal poszukuje się nowych genów reporterowych. Jednym z nowych genów reporterowych stosowanych w wektorach pułapkowych jest gen pochodzący z *Plesiomonas* sp. szczepu M6 kodujący hydrolazę parationu metylu (Cui i wsp., 2004). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają przydatność genu *rsfp* i rodminy B jako elementów nowego systemu reporterowego mogącego znaleźć zastosowanie w konstrukcji wektorów pułapkowych służących do izolowania sekwencji promotorowych. Wektor pTrap umożliwia odnalezienie sekwencji promotorowych rozpoznawalnych przez czynniki transkrypcyjne *E. coli*. Należy przeprowadzić dalsze badania nad jego zastosowaniem tak, aby możliwe stało się określenie siły odnalezionego promotora niezależnie od ilości komórek i tempa ich wzrostu, na przykład z wykorzystaniem technik densytometrycznych. Wektor pTrap może być użytecznym narzędziem biologii molekularnej zapewniającym możliwość łatwej detekcji ekspresji genu *rsfp* na podstawie fluorescencji kolonii bakteryjnych. Główną zaletą tego systemu, w porównaniu do obecnie stosowanych genów reporterowych *lacZ* i *cat*, jest możliwość łatwej obserwacji zmian poziomu ekspresji genu *rsfp* zarówno przez obserwację kolonii bakteryjnych okiem nieuzbrojonym, jak i przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej. Z drugiej strony, w przeciwieństwie do systemów opartych na autofluorescencyjnym białku GFP, konieczność użycia dodatkowego składnika jakim jest rodamina B, stanowi główną wadę zaproponowanej techniki. Jednakże, pomimo tej

niedogodności, systemy oparte na genie *rsfp* i rodaminie B mogą stanowić pole do dalszych badań.

Komórki bakteryjne *E. coli rsfp+* rosnące w obecności rodaminy B, obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym, po wzbudzeniu światłem zielonym, wykazują silną fluorescencję w przeciwieństwie do komórek *E. coli rsfp-*. Komórki *E. coli rsfp+* są łatwo odróżnialne na czarnym tle, podczas gdy komórki *E. coli rsfp-* są niewidoczne. Wyniki te świadczą o tym, że gen *rsfp* może znaleźć zastosowanie jak gen reporterowy w mikroskopii fluorescencyjnej do rozróżniania komórek rekombinantowych *E. coli*, w których zachodzi ekspresja genu *rsfp* od komórek nierekombinantowych.

Rodamina B jako barwnik stosowany w przemyśle tekstylnym i papierniczym stanowi zagrożenie dla środowiska, głównie dla wód powierzchniowych. Związek ten nie ulega biodegradacji w środowisku. W ostatnich latach rozpoczęto intensywne badania nad opracowaniem systemów monitoringu stężenia rodaminy B w środowisku, ze szczególnym uwzględnieniem wód powierzchniowych. W niniejszej pracy potwierdzono przydatność rekombinantowego szczepu *E. coli* niosącego gen *rsfp* w wykrywaniu biodostępnej rodaminy B w środowiskowych próbkach wody w zakresie stężeń $2,5 \times 10^{-4}$ – 5,0 µg/ml. Wykonane badania pozwoliły na określenie progu czułości takiej metody, który wynosił 25 ng/ml RB. Próg czułości metod analitycznych wynosi 1,2-3 ng/ml (Pourreza i wsp., 2008; Soylak i wsp., 2011; Taziki i wsp., 2012). W metodach analitycznych oznaczana jest całkowita ilość rodaminy B w próbce, nie tylko frakcja biodostępna. Po udoskonaleniu procedury szczep *E. coli* ekspresyjny gen *rsfp* mógłby znaleźć zastosowanie w konstrukcji biosensora biodostępnej rodaminy B. Podjęte zostaną w przyszłości badania mające na celu zwiększenie czułości tej metody oraz stworzenie mikrochipu na którym immobilizowane będą komórki *E. coli rsfp+*. Uzyskane dane stanowią będą element zgłoszenia patentowego.

8. Literatura

1. Ahmad A, Kurkina T, Kern K, Balasubramanian K. Applications of the static quenching of rhodamine B by carbon nanotubes. *Chemphyschem*. 2009; 10(13):2251-5.
2. Albers E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB Life*. 2009; 61(12):1132-42.
3. Allard STM. *Bioluminescent reporter genes*, e-notes, Promega, 2008.
4. Aoki S, Kondo T, Ishiura M. A promoter-trap vector for clock-controlled genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Microbiol Methods*. 2002; 49(3):265-74.
5. Appleby TC, Erion MD, Ealick SE. The structure of human 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase at 1.7 Å resolution provides insights into substrate binding and catalysis. *Structure*. 1999; 7(6):629-41.
6. Appleby TC, Mathews II, Porcelli M, Cacciapuoti G, Ealick SE. Three-dimensional structure of a hyperthermophilic 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem*. 2001; 276(42):39232-42.
7. Avila MA, García-Trevijano ER, Lu SC, Corrales FJ, Mato JM. Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(11):2125-30.
8. Bartasun P, Cieśliński H, Bujacz A, Wierzbicka-Woś A, Kur J. A study on the interaction of rhodamine B with methylthioadenosine phosphorylase protein sourced from an Antarctic soil metagenomic library. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55697.
9. Bartasun P, Cieśliński H, Kur J. An examination of an Antarctic soil metagenomic-derivate putative methylthioadenosine phosphorylase gene as a novel reporter gene for promoter trapping. *J Gen Appl Microbiol*. 2012; 58(5):387-95.
10. Behrmann I, Wallner S, Komyod W, Heinrich PC, Schuierer M, Buettner R, Bosserhoff AK. Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol*. 2003; 163(2):683-90.
11. Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Opin Microbiol*. 2003; 6(3): 206-12.
12. Berasain C, Hevia H, Fernández-Irigoyen J, Larrea E, Caballería J, Mato JM, Prieto J, Corrales FJ, García-Trevijano ER, Avila MA. Methylthioadenosine phosphorylase gene expression is impaired in human liver cirrhosis and hepatocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1690(3):276-84.
13. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, Lubin M. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: current strategies. *Cancer Biol Ther*. 2011; 11(7):627-32.
14. Betscheider D, Jose J. Nile blue A for staining *Escherichia coli* in flow cytometer experiments. *Anal Biochem*. 2009; 384: 194-196.
15. Bhattacharya R, Mukherjee D, Bhattacharyya D. Quantification of protein-bound sodium dodecyl sulfate by Rhodamine B: a method for identification of kinetically stable proteins. *Anal Biochem*. 2011; 417(1):17-24.

16. Birla L, Cristian AM, Hillebrand M. Absorption and 499 steady state fluorescence of interaction between eosin and bovine serum albumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2004; 60: 551-556.
17. Blanco CA, Perera O, Ray JD, Taliercio E, Williams III L. Incorporation of rhodamine B into male tobacco budworm moths *Heliothis virescens* to use as a marker for mating studies. *J Insect Sci.* 2006; 5: 1-10.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
19. Bruno JG, Ulvick SJ, Uzzell GL, Tabb JS, Valdes ER, Batt CA. Novel Immuno-FRET assay method for *Bacillus* spores and *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287: 875–880.
20. Buckoreelall K, Wilson L, Parker WB. Identification and Characterization of Two Adenosine Phosphorylase Activities in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 2011; 193(20): 5668–5674.
21. Bumeliene Z, Sereikaite I, Bumelis VA, Smirnovas V, Gedminiene G, Braziunaite L, Bajorunaite E. Determination of the Dissociation Constant and Stoichiometry of a Complex of the Protein Interferon α -2b with Cibacron Blue F3G-A. *J Anal Chem.* 2003; 58(11): 1038-1042.
22. Burghardt TP, Lyke JE, Ajtai K. Fluorescence emission and anisotropy from rhodamine dimers, *Biophys Chem.* 1996; 59: 119-31.
23. Cai HH, Zhong X, Yang PH, Wei W, Chen J, Cai J. Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2010; 372 (1-2):35-40.
24. Chalfie M. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol.* 1995; 62: 651–656.
25. Chen ZH, Olopade OI, Savarese TM. Expression of methylthioadenosine phosphorylase cDNA in p16-, MTAP- malignant cells: restoration of methylthioadenosine phosphorylase-dependent salvage pathways and alterations of sensitivity to inhibitors of purine de novo synthesis. *Mol Pharmacol.* 1997; 52(5):903-11.
26. Choi P, Wang L, Archer CD, Elliott T. Transcription of the glutamyl-tRNA reductase (*hemA*) gene in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: role of the hemA P1 promoter and the *arcA* gene product. *J Bacteriol.* 1996; 178(3):638-46.
27. Christensen-Dalsgaard M, Jørgensen MG, Gerdes K. Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol Microbiol.* 2010; 75(2):333-48.
28. Cieśliński H, Długotecka A, Kur J, Turkiewicz M. An MTA phosphorylase gene discovered in the metagenomic library derived from Antarctic top soil during screening for lipolytic active clones confers strong pink fluorescence in the presence of rhodamine B. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299(2):232-40.
29. Cui ZL, Zhang XZ, Zhang ZH, Li SP. Construction and application of a promoter-trapping vector with methyl parathion hydrolase gene *mpd* as the reporter. *Biotechnol Lett.* 2004; 26: 1115-1118.
30. Das Gupta SK, Bashyam MD, Tyagi AK. Cloning and Assessment of Mycobacterial Promoters by Using a Plasmid Shuttle Vector. *J Bacteriol.* 1993; 175(16): 5186–5192.
31. Das SK, Bhowal J, Das AR, Guha AK. Adsorption behavior of rhodamine B on *Rhizopus oryzae* biomass. *Langmuir.* 2006; 22 (17): 7265-72.

32. Deja-Sikora E, Sikora M, Gołębiowski M, Tretyn A. Biblioteki metagenomowe jako źródło genów przydatnych w biotechnologii. *Biotechnol.* 2007; 4: 125-139.
33. Deyl Z, Miksik I. Peptides. In: Tagliaro F, Tesarova E. *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences.* Elsevier, Amsterdam. 1988: 465–523.
34. Doose S, Neuweiler H, Sauer M. Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: a reporter for conformational dynamics of macromolecules. *Chemphyschem.* 2009; 10(9-10): 1389-98.
35. Drevets DA, Elliott AM. Fluorescence labelling of bacteria for studies of intracellular pathogenesis. *J Immunol Methods.* 1995; 187: 69-79.
36. D'Souza SF. Microbial biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2001; 16(6): 337-53.
37. Elad T, Lee JH, Gu MB, Belkin S. Microbial cell arrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2010; 117: 85-108.
38. El-Rayyes AA, A. Al-Betar, Htun T, Klein UKA. Fluorescence emission from rhodamine-B lactone adsorbed at solid catalysts. *Chem Phys Lett.* 2005; 414: 287-291.
39. Fan XY, Ma H, Guo J, Li ZM, Cheng ZH, Guo SQ, Zhao GP. A novel differential expression system for gene modulation in *Mycobacteria*. *Plasmid.* 2009; 61(1):39-46.
40. Federici MM, Stadtman ER. Interaction of Cibacron Blue F3GA with glutamine synthetase: use of the dye as a conformational probe. 2. Studies using isolated dye fractions. *Biochemistry.* 1985; 24(3):661-6.
41. Ferrari BC, Attfield PV, Veal DA, Bell PJ. Application of the novel fluorescent dye Belgian red to the differentiation of *Giardia* cysts. *J Microbiol Methods.* 2003; 52: 133-135.
42. Gama-Castro S, Salgado H, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Muñoz-Rascado L, Solano-Lira H, Jimenez-Jacinto V, Weiss V, García-Sotelo JS, López-Fuentes A, Porrón-Sotelo L, Alquicira-Hernández S, Medina-Rivera A, Martínez-Flores I, Alquicira-Hernández K, Martínez-Adame R, Bonavides-Martínez C, Miranda-Ríos J, Huerta AM, Mendoza-Vargas A, Collado-Torres L, Taboada B, Vega-Alvarado L, Olvera M, Olvera L, Grande R, Morett E, Collado-Vides J. RegulonDB version 7.0: transcriptional regulation of *Escherichia coli* K-12 integrated within genetic sensory response units (Gensor Units). *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Database issue):D98-105.
43. Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. *Nucl Med Biol.* 1999a; 26: 481-490.
44. Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Imaging gene expression: Principles and assays. *J Nucl Cardiol.* 1999b; 6: 219-233.
45. Gambhir SS, Herschman HR, Cherry SR., Barrio JR, Satyamurthy N, Toyokuni T, Phelps ME, Larson SM, Balaton J, Finn R, Sadelain M, Tjuvajev J, Blasberg R. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia.* 2000; 2: 118-138.
46. Gao D, Tian Y, Liang F, Jin D, Chen Y, Zhang H, Yu A. Investigation on the pH-dependent binding of Eosin Y and bovine serum albumin by spectral methods. *J Luminiscence* 2007; 127:515-522.
47. Gollnick K, Franken T, Fouda MFR. Triplet quantum yield determination by photosensitized oxygenation in the presence of heavy atom additives: Rhodamine B in methanol. *Tetrahedron Lett.* 1981; 22: 4049–4052.
48. Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem.* 2003; 37(Pt 1):63-71.

49. Hakkila K, Maksimow M, Karp M, Virta M. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE gfp* and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal Biochem.* 2002; 301: 235–242.
50. Hara-Kaonga B, Pistole TG. A dual fluorescence flow cytometric analysis of bacterial adherence to mammalian host cells. *J Microbiol Methods.* 2007; 69: 37–43.
51. Hellerbrand C, Mühlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, Weiss T, Schölmerich J, Bosserhoff AK. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2006; 27:64-72.
52. Hii SL, Yong SY, Wong CL. Removal of rhodamine B from aqueous solution by sorption on *Turbinaria conoides* (Phaeophyta). *J Appl Phycol.* 2009; 21: 625-631.
53. Hu YJ, Liu Y, Zhang LX, Zhao RM, Qu SS. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. *J Mol Structure.* 2005; 750(1-3): 174-178.
54. Huerta AM, Collado-Vides J. Sigma70 promoters in *Escherichia coli*: specific transcription in dense regions of overlapping promoter-like signals. *J Mol Biol.* 2003; 333(2):261-78.
55. IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 16, Some Aromatic Amines and Related Nitro Compounds (Hair Dyes, Colouring Agents and Miscellaneous Industrial Chemicals). 1978; 16: 221.
56. Jain R, Mathur M, Sikarwar S, Mittal A. Removal of the hazardous dye rhodamine B through photocatalytic and adsorption treatments. *J Environ Manage.* 2007; 85(4):956-64.
57. Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, Jovin TM, Hell SW. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Letters.* 2000; 479: 131-135.
58. Jeong DW, Choi YC, Lee JM, Kim JH, Lee JH, Kim KH, Lee HJ. Isolation and characterization of promoters from *Lactococcus lactis ssp. cremoris* LM0230. *Food Microbiol.* 2006; 23(1):82-9.
59. Ju DJ, Byun IG, Park JJ, Lee CH, Ahn GH, Park TJ. Biosorption of a reactive dye (Rhodamine-B) from an aqueous solution using dried biomass of activated sludge. *Bioresour Technol.* 2008; 99: 7971-75.
60. Kaji T, Kawashima T, Sakamoto M, Kurashige Y, Koizumi F. Inhibitory effect of rhodamine B on the proliferation of human lip fibroblasts in culture. *Toxicology.* 1991a; 68(1):11-20.
61. Kaji T, Kawashima T, Sakamoto M. Rhodamine B inhibition of glycosaminoglycan production by cultured human lip fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991b; 111: 82-9.
62. Kaji T, Kawashima T, Yamamoto C, Sakamoto M. Rhodamine B inhibits collagen synthesis by human lip fibroblasts in culture. *Toxicol Lett.* 1992; 61: 81-7.
63. Kałużny A, Mikroskopia fluorescencyjna w badaniach struktury i funkcji komórek. 2011; E-artykuł, Uniwersytet Jagielloński.
64. Karsi A, Lawrence ML. Broad host range fluorescence and bioluminescence expression vectors for Gram-negative bacteria. *Plasmid.* 2007; 57: 286-95.
65. Kawski A. Fotoluminescencja roztworów. Warszawa, PWN 1992.
66. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* 2000; 1(4):349-84.

67. Kemnitz K, Murao T, Yamazaki I, Nakashima N, Yoshihara K. Picosecond fluorescence measurement of submono- and mono-layer of adsorbed rhodamine B on a single crystal of naphthalene and on glass. *Chem Phys Lett.* 1983; 101: 337–340.
68. Kemnitz K, Tamai N, Yamazaki I, Yoshihara K. Fluorescence decays and spectral properties of rhodamine B in submono- mono- and multilayer systems. *J Phys Chem.* 1986; 90: 5094–5101.
69. Kili AO, Herzberg MC, Meyer MW, Zhao X, Tao L. Streptococcal Reporter Gene-Fusion Vector for Identification of *in Vivo* Expressed Genes. *Plasmid.* 1999; 42: 67-72.
70. Kim J, Kim MA, Min SY, Jee CD, Lee HE, Kim WH. Downregulation of methylthioadenosin phosphorylase by homozygous deletion in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011; 50(6):421-33.
71. Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53(1):211-3.
72. Kunert A, Hagemann M, Erdmann N. Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems *Gfp* and *LuxAB*. *J Microbiol Methods.* 2000; 41:185-194.
73. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd 502 ed. Springer; 2006. Rozdział 8.8.: 288-289.
74. Lamark T, Rokenes TP, McDougall J, Strom AR. The complex bet promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J Bacteriol.* 1996; 178:1655-1662.
75. Lei Y, Chen W, Mulchandani A. Microbial biosensors. *Anal Chim Acta.* 2006; 568(1-2): 200-10.
76. Li JC, Li N, Wu QH, Wang Z, Ma JJ, Wang C, Zhang LJ. Study on the interaction between clozapine and bovine serum albumin. *J Mol Struct* 2007a; 833:184–188.
77. Li W, Li HX, Ji SY, Li S, Gong YS, Yang MM, Chen YL. Characterization of two temperature-inducible promoters newly isolated from *B. subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007b; 358(4):1148-53.
78. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* 2005;2(12):910-9.
79. Lindsey GD. Rhodamine B: A systemic fluorescent marker for studying mountain beavers (*Aplodontia rufa*) and other animals. *Northwest Sci.* 1983; 57: 16-21.
80. Liu SP, Liu Q. Resonance Rayleigh-scattering method for the determination of proteins with some monoazo dyes of chromotropic acid. *Anal Sci.* 2001; 17(2):239-42.
81. Lu J, Li H, Yao B, Zhao B, Weng C, Lei G, Shen P, Xie Z, Tan S. Synergetic effect of efficient energy transfer and 3D pi-pi stack for white emission based on the block copolymers containing nonconjugated spacer. *J Phys Chem B.* 2009; 113(13):4203-8.
82. Lubin M, Lubin A. Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy. *PLoS One.* 2009; 4(5):e5735.
83. Lührmann A, Streker K, Schuttfort A, Daniels JJ, Haas A. *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a nonendocytic compartment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 7271-7276.
84. Male L, Marritt SJ, Berks BC, Cheesman MR, van Wonderen JH, George SJ, Butt JN. Protein voltammetry and spectroscopy: integrating approaches. *Theor Chem Account.* 2008; 119:107–111.

85. Marcé S, Balagué O, Colomo L, Martinez A, Höller S, Villamor N, Bosch F, Ott G, Rosenwald A, Leoni L, Esteller M, Fraga MF, Montserrat E, Colomer D, Campo E. Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 3754-61.
86. Marchi MC, Bilmes SA, Bilmes GM. Photophysics of Rhodamine B Interacting with Silver Spheroids. *J Colloid Interface.* 1999; 218: 112-117.
87. Marraccini P, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol Biol.* 1993; 23(4):905-9.
88. Matejczyk M. Bakteryjne biosensory. *Post. Mikrobiol.* 2004; 43(2): 155-165.
89. Matejczyk M. Potencjał aplikacyjny biosensorów mikrobiologicznych. *Post. Mikrobiol.* 2010; 49(4): 297-304.
90. Miller WG, Leveau JH, Lindow SE. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000; 13(11):1243-50.
91. Moadhen A, Elhouichet H, Nosova L, Oueslati M. Rhodamine B absorbed by anodic porous alumina: Stokes and anti-Stokes luminescence study. *J Luminesc.* 2007; 126: 789-794.
92. More VR, Mote US, Patil SR, Kolekar GB. Fluorescence Quenching Studies of the Interaction Between Riboflavin and Norfloxacin and Analytical Application in the Determination of Vitamin B2. *Journal of Solution Chemistry.* 2010; 39: 97-107.
93. Moreno-Villoslada I, Jofre M, Miranda V, Chandia P, Gonzalez R, Hess S, Rivas BL, Elvira C, San Roman J, Shibue T, Nishide H. π -Stacking of rhodamine B onto water-soluble polymers containing aromatic groups. *Polymer.* 2006a; 47: 6496-6500.
94. Moreno-Villoslada I, Jofré M, Miranda V, Gonzalez R, Sotelo T, Hess S, Rivas BL. pH dependence of the interaction between rhodamine B and the water-soluble poly(sodium 4-styrenesulfonate). *J Phys Chem B.* 2006b; 110: 11809-12.
95. Namasivayam C, Radhika R, Suba S. Uptake of dyes by a promising locally available agricultural solid waste: coir pith. *Waste Manag.* 2001; 21(4):381-7.
96. Naylor LH. Reporter gene technology: The future looks bright. *Biochem Pharmacol.* 1999; 58: 749-757.
97. Novo M, Granadero D, Bordello J, Al-Soufi W. Host-guest association studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2011; 70 (3-4): 259-268.
98. Oplatowska M, Elliott CT. Development and validation of rapid disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of Methyl Yellow and Rhodamine B dyes in foods. *Analyst.* 2011; 136: 2403-10.
99. Papadopoulou A, Green RJ, Frazier RA. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(1):158-63.
100. Parveen N, Cornell KA. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol Microbiol.* 2011; 79(1):7-20.
101. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Tomás V, Fenoll J. Determination of proteins in serum by fluorescence quenching of rose bengal using the stopped-flow mixing technique. *Analyst.* 2000; 125(3):507-10.

102. Pirkov I, Norbeck J, Gustafsson L, Albers E. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J.* 2008; 275(16):4111-20.
103. Pothier JF, Wisniewski-Dyé F, Weiss-Gayet M, Moëgne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C. Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology.* 2007; 153: 3608-22.
104. Pourreza N, Rastegarzadeh S, Larki A. Micelle-mediated cloud point extraction and spectrophotometric determination of rhodamine B using Triton X-100. *Talanta.* 2008; 77(2): 733–736.
105. Pugmire MJ, Ealick SE. Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases. *Biochem J.* 2002; 361(1):1-25.
106. Quash G, Roch AM, Charlot C, Chantepie J, Thomas V, Hamedi-Sangsari F, Vila J. 4-methylthio 2-oxobutanoate transaminase: a specific target for antiproliferative agents. *Bull Cancer.* 2004; 91(4):E61-79.
107. Ramette RW, Sandell EB. Rhodamine B equilibria. *J Am Chem Soc.* 1956; 78: 4872–4878.
108. Rasko DA, Esteban CD, Sperandio V. Development of novel plasmid vectors and a promoter trap system in *Francisella tularensis* compatible with the pFLN10 based plasmids. *Plasmid.* 2007; 58: 159-166.
109. Rasoulzadeh F, Jabary HN, Naseri A, Rashidi MR. Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009; 72(1):190-3.
110. Roda A, Pasini P, Mirasoli M, Michelini E, Guardigli M. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends in biotechnology.* 2004; 22: 295-303.
111. Sagoo SK, Jockusch RA. The fluorescence properties of cationic rhodamine B in the gas phase, *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 2011, 220(2–3):173-178.
112. Sambrook J, Manniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Manniatis T and Sambrook Editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press Edit Second Edition, New York, 1989.
113. Sanghi S, Mohan D. Quenching of fluorescence of Rhodamine 610 in binary and ternary mixture solutions. *J Photochem Photobiol A.* 1998; 116: 75-78.
114. Sekowska A, Déneraud V, Ashida H, Michoud K, Haas D, Yokota A, Danchin A. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiol.* 2004; 4:4:9.
115. Sekowska A, Kung HF, Danchin A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000; 2(2):145-77.
116. Sekowska A, Mulard L, Krogh S, Tse JK, Danchin A. MtnK, methylthioribose kinase, is a starvation-induced protein in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:15.
117. Shakir K, Elkafrawy AF, Ghoneimy HF, Elrab Beheir SG, Refaat M. Removal of rhodamine B (a basic dye) and thoron (an acidic dye) from dilute aqueous solutions and wastewater simulants by ion flotation. *Water Res.* 2010; 44: 1449-61.
118. Shapiro SH, Wessely Z. Rhodamine B fluorescence as a stain for amniotic fluid squames in maternal pulmonary embolism and fetal lungs. *Ann Clin Lab Sci.* 1988; 18: 451-454.
119. Shea CM, McIntosh MA. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1991; 5: 1415-1428.

120. Soll DR, Srikantha T. Reporters for the analysis of gene regulation in fungi pathogenic to man. *Curr Opin Microbiol.* 1998; 1: 400-405.
121. Soylak M, Unsal YE, Yilmaz E, Tuzen M. Determination of rhodamine B in soft drink, waste water and lipstick samples after solid phase extraction. *Food and Chemical Toxicology.* 2011; 49(8): 1796-1799.
122. Su L, Jia W, Hou C, Lei Y. Microbial biosensors: a review. *Biosens Bioelectron.* 2011; 26(5):1788-99.
123. Subhi AL, Tang B, Balsara BR, Altomare DA, Testa JR, Cooper HS, Hoffman JP, Meropol NJ, Kruger WD. Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 7290-6.
124. Taziki M, Shemirani F, Majidi B. Robust ionic liquid against high concentration of salt for preconcentration and determination of rhodamine B. *Separ Pur Tech.* 2012; 97: 216-220.
125. Tecon R, Van der Meer JR. Bacterial Biosensors for Measuring Availability of Environmental Pollutants. *Sensors.* 2008; 8(7): 4062-4080.
126. Timms-Wilson TM, Bailey MJ. Reliable use of green fluorescent protein in fluorescent pseudomonads. *J Microbiol Methods.* 2001; 46: 77-80.
127. Truant J, Brett W, Thomas W, Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine, *Henry Ford Hosp Med Bull,* 1962,10: 287-296.
128. Unge A, Tombolini R, Mølbak L, Jansson JK. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 813-821.
129. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.* New York: Wiley-VCH. 2001. rozdział 4.
130. Van der Auweraer M, Verschuere B, De Schryver FC. Absorption and Fluorescence Properties of Rhodamine B Derivatives Forming Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir.* 1988 ; 4: 583–588.
131. Verkamp E, Chelm BK. Isolation, nucleotide sequence, and preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 *hemA* gene. *J Bacteriol.* 1989; 171:4728-4735.
132. Wada C, Imai M, Yura T. Host control of plasmid replication: requirement for the sigma factor sigma 32 in transcription of mini-F replication initiator gene. *PNAS USA.* 1987; 84:8849-8853.
133. Wang CC, Masi AN, Fernández L. On-line micellar-enhanced spectrofluorimetric determination of rhodamine dye in cosmetics, *Talanta.* 2008; 75: 135-140.
134. Welsh S, Kay SA. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr Opin Biotechnol.* 1997; 8:617-622.
135. Wessely Z, Shapiro SH, Klavins JV, Tinberg HM, Identification of Mallory Bodies with rhodamine B fluorescence and other stains for keratin, *Biotech Histochem* 1981, 56:169-176.
136. Whitehead KA, Benson P, Verran J. Differential fluorescent staining of *Listeria monocytogenes* and a whey food soil for quantitative analysis of surface hygiene. *Int J Food Microbiol.* 2009; 135: 75–80.
137. Wood KV. Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol.* 1995; 6: 50-58.

138. Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, Liebermeister W, Surette MG, Alon U. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods*. 2006; 3: 623-328.
139. Zhang AL, Liu H, Yang MM, Gong YS, Chen H. Assay and characterization of a strong promoter element from *B. subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354: 90-95.
140. Zhang Y, Porcelli M, Cacciapuoti G, Ealick SE. The crystal structure of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase II from *Sulfolobus solfataricus*, a thermophilic enzyme stabilized by intramolecular disulfide bonds. *J Mol Biol*. 2006; 357(1):252-62.
141. Zhao X, Zhou S, Chen M, Wu L. Supramolecular, architecture, spectroscopic properties and stability of C.I. Basic Violet 10 (Rhodamine B) at high concentration. *Dyes Pigm*. 2009; 80: 212–218.
142. Zhu J, Li JJ, Zhao JW. Spectral characters of Rhodamine B as a multiinformation fluorescence for bovine serum albumin. *Sens Actuators B Chem*. 2009; 138:9-13.
143. Zong W, Liu R, Sun F, Wang M, Zhang P, Liu Y, Tian Y. Cyclic voltammetry: a new strategy for the evaluation of oxidative damage to bovine insulin. *Protein Sci*. 2010; 19(2):263-8.

9. Dorobek naukowy

Publikacje

1. Bartasun P*, Cieśliński H*, Bujacz A, Wierzbicka-Woś A, Kur J. A study on the interaction of rhodamine B with methylthioadenosine phosphorylase protein sourced from an Antarctic soil metagenomic library. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55697.
2. Bartasun P, Cieśliński H, Kur J. An examination of Antarctic soil metagenomic- derivate putative methylthioadenosine phosphorylase gene as a novel reporter gene for promoter trapping, *J Gen Appl Microbiol*. 2012; 58(5):387-95.
3. Wierzbicka-Woś A*, Bartasun P*, Cieśliński H, Kur J. Cold-adapted glycosyl hydrolase family 1 with β -D-glucosidase, β -D-fucosidase and β -D-galactosidase activity received with metagenomic technique – gene cloning, overexpression, purification and characterization. *BMC Biotechnol*. 2013; 13(1):22.

* - Equal contributors

Doniesienia konferencyjne

1. Bujacz A, Cieśliński H, Bartasun P, Crystal structure of methylthioadenosine phosphorylase from Antarctic soil metagenomic library. *BioTechnologia*. 2013. 94(1): 70
1. Bartasun P, Cieśliński H, Bujacz A, Wierzbicka-Woś A, Kur J. Examination of the role of selected amino acids residues in binding of rhodamine B to metagenome-derived MTA phosphorylase based on the crystal structure and mutations. 47th Meeting of the Polish Biochemical Society, Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, Poznań, Poland, September 11th – 14th, 2012 (*Acta Bioch. Pol.* Vol. 59, Supplement Supplement 3, 2012: 31)
2. Bartasun P, Cieśliński H, Kur J. A bioavailability assay of rhodamine B in environmental water samples with using a whole cell biosensor recombinant strain *E.coli*/RB+. 27th Meeting of the Polish Society of Microbiologists, Lublin, Poland, September 5th – 8th, 2012
3. Wierzbicka-Woś A, Bartasun P, Cieśliński H, Kur J. Production, purification and characterization of enzyme MKg isolated from metagenomic DNA. 27th Meeting of the Polish Society of Microbiologists, Lublin, Poland, September 5th – 8th, 2012
4. Bujacz A, Cieśliński H, Bartasun P. Structural investigation of methylthioadenosine phosphorylase interactions with rhodamine B. 54th Polish Crystallographic Meeting, Wrocław, Poland, July 5th – 9th, 2012
5. Cieśliński H, Bartasun P, Bujacz A, Wierzbicka A, Kur J. Investigation of interaction between xanthene dye rhodamine B and metagenomic-derived methylthioadenosine phosphorylase RSFP. 2nd Congress of Biochemistry and Cell Biology, 46th Meeting of the Polish Biochemical Society and 11st Conference of the Polish Cell Biology Society, Kraków, Poland, September 5th – 9th, 2011 (*Acta Bioch. Pol.* Vol. 58, Supplement 2, 2011: 193)
6. Bartasun P, Cloning, purification and properties of RSFP protein derived from an Antarctic soil metagenomic library. *Biotechnology Summer School*, Gdańsk - Sobieszewo, Poland, October 27th – 28th, 2010

10. Indeks skrótów

Amp – ampicylina

BSA – ang. *Bovine Serum Albumin*, albumina surowicza krwi wołowej

C_k – stężenie końcowe

DMSO – dimetylosulfotlenek

DTT – ditiotreitol

EDTA - wersenian disodowy

FCS – ang. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Spektroskopia korelacji fluorescencji

FPLC – ang. *Fast Protein/Performance Liquid Chromatography*, szybka, białkowa/szybko-sprawna chromatografia cieczowa

GFP – ang. *Green Fluorescent Protein*, Białko zielonej fluorescencji

IPTG – izopropylo-beta –D- tiogalaktopiranozyd

kDa – kilo Dalton, jednostka masy atomowej

LDF – ang. *Linear Discriminant Function*

M – stężenie molowe

MCS – miejsce wielokrotnego klonowania zawierające zgrupowane obok siebie sekwencje nukleotydów rozpoznawane jako miejsca cięcia DNA dla określonych enzymów restrykcyjnych

MTA – 5'-metylotioadenozyna

MTAP – fosforylaza 5'-metylotioadenozyny

MTR-1-P – metylotiorybozo -1- fosforan

ORF – ang. Open Reading Frame – otwarta ramka odczytu

PCR – ang. *Polymerase Chain Reaction* - łańcuchowa reakcja polimerazy

pz – par zasad

RB – rodamina B

RSFP – ang. *Rhodamine B Sensitive Fluorescent Phosphorylase*

rsfp – ang. *Rhodamine Sensitive Fluorescent Phosphorylase* - gen kodujący fosforylaze nukleozydów purynowych szczepu *Psychrobacter arcticus* 273-4

SDS – ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – ang. *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Tris – 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopiranozyd

Nazwa aminokwasu	Skrót nazwy
alanina	A, Ala
arginina	R, Arg
asparagina	N, Asn
kwas asparaginowy	D, Asp
cysteina	C, Cys
glutamina	Q, Gln
kwas glutaminowy	E, Glu
glicyna	G, Gly
histydyna	H, His
izoleucyna	I, Ile
leucyna	L, Leu
lizyna	K, Lys
metionina	M, Met
fenyloalanina	F, Phe
prolina	P, Pro
seryna	S, Ser
treonina	T, Thr
tryptofan	W, Trp
tyrozyna	Y, Tyr
walina	V, Val