Politechnika Gdańska Wydział Chemiczny Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

Modyfikacja właściwości syntazy glukozamino-6-fosforanu z *Candida albicans* poprzez ukierunkowaną mutagenezę

mgr inż. Karolina Kwiatkowska-Semrau

PROMOTOR: prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski

Gdańsk 2014

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi Panu prof. dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu za pomoc, opiekę oraz cenne wskazówki podczas wykonywania i redagowania tej pracy.

Dziękuje również dr inż. Katarzynie Banaszak, prof. dr hab. Wojciechowi Rypniewskiem i dr inż. Markowi Wojciechowskiemy za owocną współpracę. Doktorantom i Pracownikom Katedry Technologii Leków i Biochemii za niezapomniałą atmosferę, życzliwość i pomoc.

> Moim najbliższym za wsparcie w chwilach wzątpienia, a w szczególności Jarkowi za uśmiech każdego dnia.

Spis Treści

INDEKS SKRÓTÓW	6
1. STRESZCZENIE	8
2. WPROWADZENIE	10
2.1. Fizjologiczne znaczenie syntazy GlcN-6-P	
2.2. Syntaza glukozamino-6-fosforamu – dotychczasowy stan wiedzy	
2.2.1. Ogólna charakterystyka enzymu	
2.2.2. Budowa enzymu	
2.2.2.1. Pierwszorzędowa struktura enzymu	
2.2.2.2. Struktura przestrzenna syntazy GlcN-6-P	
2.2.2.3. Struktura oligomeryczna syntazy GlcN-6-P	
2.2.3. Mechanizm katalizowanej reakcji	
2.2.4. Regulacja aktywności syntazy GlcN-6-P.	
2.2.4.1. Regulacja syntazy GlcN-6-P u prokanotów	
2.2.4.2. Regulacja syntazy Glev-o-1 u cukanolow	
2.2.2.1. Miejsce wiazania UDP-GlcNAc przez Gfa1 <i>C. albicans</i>	
2.2.5.1. Zmiany struktury białka po związaniu UDP-GlcNAc	
3. CEL PRACY	43
4. MATERIAŁY I METODY 4.1. Materiały podstawowe i aparatura	44
4.1.1. Szczepy drobnoustrojów	
4.1.2. DNA plazmidowe	
4.1.3. Wzorce masowe	
4.2. Podłoża i warunki hodowli	47
4.2.1. Podłoża	
4.2.2. Hodowla w podłożu płynnym	
4.2.3. Hodowla na podłożu stałym	
4.3. Techniki izolacji, charakterystyki i obróbki DNA	
4.3.1. Elektroforeza w żelu agarozowym	
4.3.2. Izolacja DNA	
4.3.2.1. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli płynnej	
4.3.2.2. Izolacja tragmentow DNA z zelu agarozowego	
4.5.5. Hawleine DNA enzymann resu ykcyjnynn	
4.3.5. Amplifikacja fragmentu DNA <i>CaGFA1</i> -*	
4.4. Transformacia komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	54
4 4 1 Przygotowanie komórek kompetentnych	54
4.4.2. Transformacja komórek kompetentnych	
4.5. Nadprodukcja białek rekombinantowych w systemie Tabora-Studiera	55
4.6. Techniki oczyszczania białka	
4.6.1. Przygotowanie ekstraktu bezkomórkowego	
4.6.2. Metoda wytrąceniowa	
4.6.3. Chromatografia jonowymienna na złożu ResourceQ (IEC)	
4.6.4. Unromatografia metalopowinnowactwa na złożu Ni ² -IDA-agaroza (IMAC)	

4.7. Zatężanie preparatów białkowych przez ultrafiltrację	60
4.8. Wymiana buforu	60
4.9. Chromatografia rozmiarów wykluczających (SEC, filtracja żelowa)	60
4 10 Flektroforeza w żelu poliakrylamidowym	62
4 10 1 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	62
4.10.2. Przygotowanie prób do SDS-PAGE	63
4.10.3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (Native-PAGE)	64
4.10.3.1. Elektroforeza Native-PAGE z wykorzystaniem żelu 2-warstwowego	64
4.10.3.2. Przygotowanie prób do Native-PAGE z 2-warstwowym żelem	64
4.10.3.3. Elektroforeza Native-PAGE z wykorzystaniem żelu wielowarstwowego	65
4.10.4. Metody barwienia żeli poliakrylamidowych	65
4.10.4.1. Barwienie błękitem kumazyny (CBB – Coomassie Brillant Blue)	65
4.10.4.2. Barwienie srebrowe	66
4.11. Oznaczanie stężenia białka – metoda Bradford	66
4.12. Oznaczanie aktywności katalitycznej syntazy GlcN-6-P	67
4.13. Pomiar wielkości cząstek metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, <i>ang.</i> Dynamic Ligh Scattering)	t 68
4.14. Metody krystalizacii białek	69
5. WYNIKI I DYSKUSJA	70
5.1. Konstrukcja rekombinowanej syntazy GlcN-6-P z C. albicans z wewnetrznym mikrofragmenten	1
oligoHis	70
5.1.1. Analiza struktury przestrzennej syntazy GlcN-6-P z C. albicans w celu lokalizacji wprowadzenia	
wewnętrznego fragmentu oligoHis	71
5.1.2. Konstrukcja plazmidu ekspresyjnego pET23b-CaGFA1-K568HS569H	75
5.1.3. Nadprodukcja białka CaGfa1-K568HS569H w komórkach E. coli	77
5.1.4. Oczyszczanie CaGfa1-K568HS569H	79
5.1.6. Wyznaczenie parametrów kinetycznych <i>Ca</i> Gfa1-K568HS569H	81
5.1.7. Inhibicja aktywności <i>Ca</i> Gfa1-K568HS569H przez UDP-GlcNAc	83
5.1.8. Struktura oligomeryczna.	83
5.1.7.2. Określenie masy monomeru C <i>a</i> Gfa1-K568HS569H (SDS-PAGE)	84
5.1.7.2. Okresienie masy natywnego olaika CaOlar-K508h5509h	83
5.2. Próby opracowania warunków krystalizacji syntazy GlcN-6-P z Candida albicans	88
5.2.1. Analiza bioinformatyczna predyspozycji białka do krystalizacji	88
5.2.2. Analiza agregacji białek	91
5.2.3. Próby krystalizacji syntazy GlcN-6-P	92
5.3. Określanie roli reszt istotnych dla tworzenia struktury oraz regulacji aktywności syntazy	
glukozamino-6-fosforanu z <i>C. albicans</i> poprzez ukierunkowaną mutagenezę genu kodującego	
ten enzym	96
5.3.1. Ukierunkowana mutageneza obszaru wiązania UDP-GlcNAc	97
5.3.1.1. Analiza struktury przestrzennej syntazy GlcN-6-P w celu wybrania optymalnego kierunku mutagenezy w miejscu wiązania UDP-GlcNAc	97
5.3.1.2. Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych	100
5.3.1.3. Nadekspresja genów kodujących rekombinantową syntazę GlcN-6-P w komórkach E. coli	102
5.3.1.4. Oczyszczanie muteiny CaGfa1-H492FT487IG490LG474L	104
5.3.1.5. Wyznaczanie parametrów kinetycznych <i>Ca</i> Gfa1-G474LT487IG490LH492F	106
5.3.1.7. Inhibicja aktywności <i>Ca</i> Gfa1-G474LT487IG490LH492F przez UDP-GlcNAc	108
5.3.1.6. Struktura oligomeryczna Ca Gfa1-G474LT487IG490LH492F	109
5.3.1.6.1. Masa monomeru (SDS-PAGE)	110
5.3.1.0.2. Masa oligomeru (SEU, Native-PAGE)	111
5.5.2. FIODA ZIMIANY SITUKIUFY I V FZĘUOWEJ SYMIAZY BIUKOZAMINO-O-IOSIOFANU Z Canaida albicans poprze	Z 114
5 3 2 1 Analiza struktury przestrzennej syntazy GleN-6-D w celu wybrania ontymalnego kierunku	114
mutagenezy	114

5.3.2.2. Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych	116
5.3.2.3. Nadekspresja genów kodujących rekombinantową syntazę GlcN-6-P w komórkach E. col	i 119
5.3.2.4. Oczyszczanie otrzymanych mutein	121
5.3.2.4. Wyznaczanie parametrów kinetycznych	123
5.3.2.5. Inhibicja aktywności katalitycznej mutein przez UDP-GlcNAc	126
5.3.2.6. Struktura oligomeryczna	127
5.3.2.6.1. Masa monomeru (SDS-PAGE)	128
5.3.2.6.2. Masa oligomeru (SEC, Native-PAGE)	129
6. PODSUMOWANIE	138
LITERATURA	142
DOROBEK NAUKOWY	150

INDEKS SKRÓTÓW

aa	aminokwasy, reszty aminokwasowe
Amp	Ampicylina
ang.	z angielskiego
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BSA	albumina wołowa
BSS	odczynnik Bradforda stężony
BWS	odczynnik Bradforda roboczy
CaGFA1	gen kodujący syntazę GlcN-6-P z Candida albicans
CaGfa1	syntaza GlcN-6-P z Candida albicans
<i>Ca</i> Gfa1-*, (<i>Ca</i> Gfa1)	rekombinant syntazy GlcN-6-P z <i>Candida albicans</i> (z mutacjami punktowymi wymienionymi w dalszej części opisu)
<i>Ca</i> Gfa1k, <i>Ca</i> Gfa1k	starter do reakcji PCR na podstawie genu <i>CaGFA1</i> (m-matrycowy, k-komplementarny do matrycy)
<i>Ca</i> Gfa1-K568HS569H (<i>Ca</i> Gfa1-KHSH)	syntaza GlcN-6-P z <i>C. albicans</i> z mikro fragmentem oligoHis (Lys568His i Ser569His)
CaGfa1-KHSH-*	syntaza GlcN-6-P z <i>C. albicans</i> z mikro fragmentem oligoHis z dodatkowymi mutacjami punktowymi (wymienionymi w dalszej części opisu)
<i>Ca</i> Gfa1- G474LT487IG490LH492F	syntaza GlcN-6-P z <i>C. albicans</i> z wymienionymi resztami w obszarze wiązania UDP-GlcNAc (Gly474Leu, Thr487Ile, Gly490Leu i His492Phe)
<i>Ca</i> Gfa1- R394IR442ID524AS525AS527A	syntaza GlcN-6-P z <i>C. albicans</i> z wymienionymi resztami w obszarze kontaktu między podjednostkami (Arg394Ile, Arg442Ile, Asp524Ala, Ser525Ala i Ser527Ala)
<i>Ca</i> Gfa1-KHSH- R394IR442ID524AS525AS527A	syntaza GlcN-6-P z <i>C. albicans</i> z mikro fragmentem oligoHis i z wymienionymi resztami w obszarze kontaktu między podjednostkami (Arg394Ile, Arg442Ile, Asp524Ala, Ser525Ala i Ser527Ala)
CBB	błękit kumazyny (Coomasie Brillant Blue R-250)
C _k	stężenie końcowe
dGAH-His ₆ C	domena GAH syntazy GlcN-6-P z C. albicans z fragmentem heksaHis na C-końcu
DLS	
dNTP	dynamiczne rozpraszanie światła (ang. Dynamic Light Scattering)
	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów
DTT	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan)
DTT EcGLMS	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i>
DTT EcGLMS EcGlmS	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i>
DTT EcGLMS EcGlmS EDTA	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
DTT EcGLMS EcGlmS EDTA FPLC	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa
DTT EcGLMS EcGlmS EDTA FPLC	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography)
DTT <i>EcGLMS</i> <i>Ec</i> GlmS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan
DTT EcGLMS EcGlmS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P GAT	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan domena glutaminazowa syntazy GlcN-6-P
DTT <i>EcGLMS</i> <i>Ec</i> GlmS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P GAT Glc-6-P	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan domena glutaminazowa syntazy GlcN-6-P glukozo-6-fosforan
DTT EcGLMS EcGlmS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P GAT Glc-6-P GlcN-6-P	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan domena glutaminazowa syntazy GlcN-6-P glukozo-6-fosforan
DTT EcGLMS EcGImS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P GAT Glc-6-P GlcN-6-P IC ₅₀	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan domena glutaminazowa syntazy GlcN-6-P glukozo-6-fosforan glukozamino-6-fosforan stężenie związku hamujące w 50% aktywność enzymu
DTT EcGLMS EcGImS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P GAT Glc-6-P GlcN-6-P IC ₅₀ IEC	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan domena glutaminazowa syntazy GlcN-6-P glukozo-6-fosforan stężenie związku hamujące w 50% aktywność enzymu chromatografia jonowymienna
DTT EcGLMS EcGlmS EDTA FPLC Fru-6-P, F6P GAT Glc-6-P GlcN-6-P IC ₅₀ IEC IMAC	dynamiczne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> Dynamic Light Scattering) mieszanina deoksyrybonukleotydów ditiotreitol (treo-2,3-dihydroksy-1,4-ditiobutan) gen kodujący syntazę GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> syntaza GlcN-6-P z <i>Escherichia coli</i> sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego średniociśnieniowa chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> Fast Protein Liquid Chromatography) D-fruktozo-6-fosforan domena glutaminazowa syntazy GlcN-6-P glukozo-6-fosforan glukozamino-6-fosforan stężenie związku hamujące w 50% aktywność enzymu chromatografia jonowymienna chromatografia metalopowinnowactwa

IPTG	izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd
kDa	kilodalton (jednostka masy cząsteczkowej)
K _i	stała inhibicji
K _M	stała Michaelisa
MW	masa cząsteczkowa (wyrażona w kDa)
Native-PAGE	elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach niedenaturujących
OD	gęstość optyczna (ang. optical density)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polimerase Chain Reaction)
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu
pz	par zasad
R _e	ruchliwość elektroforetyczna
RN-aza A	rybonukleaza A
rpm	liczba obrotów na minutę
SAXS	małokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich (<i>ang</i> . Small Angle X-ray Scattering)
SDS	sól sodowa siarczanu dodecylu
SDS-PAGE	elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących
SEC	chromatografia rozmiarów wykluczających (filtracja żelowa)
TAE	bufor Tris-octanowy (do elektroforezy agarozowej)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
Tris	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
U	jednostka aktywności enzymatycznej
UDP-GlcNAc	urydynodifosfo-N-acetylo-D-glukozamina
V _{max}	maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej

1. STRESZCZENIE

W niniejszej pracy przedstawiono badania poświęcone syntazie glukozamino-6fosforany z *Candida albicans*. Jest to enzym odpowiedzialny za biosyntezę glukozamino-6fosforanu, który w dalszym szlaku wykorzystywany jest m. in. przez komórki grzybowe do syntezy ściany komórkowej. Dodatkowo zaobserwowano zależność aktywności enzymatycznej ludzkiej syntazy GlcN-6-P w cukrzycy typu II. W związku z powyższym enzym ten został zaproponowany jako cel molekularny, a ciągłe prowadzenie badań mających na celu dokładne poznanie cząsteczki i mechanizmów zachodzących w enzymie, jest niezwykle istotne dla racjonalnego projektowania inhibitorów o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu zakażeń drobnoustrojami i cukrzycy typu II.

Głównym celem projektu było poznanie funkcjonalności niektórych elementów strukturalnych syntazy glukozamino-6-fosforanu z *Candida albicans* oraz konstrukcja formy białka umożliwiającej jego efektywne oczyszczanie dla potrzeb prac nad krystalizacją i określeniem struktury przestrzennej całej cząsteczki enzymu. W szczególności skupiono się nad dwoma istotnymi obszarami w cząsteczce enzymu: 1) obszar kontaktu między poszczególnymi podjednostkami tworzącymi dimer, a następnie tetramer; 2) miejsce wiązania fizjologicznego inhibitora UDP-GlcNAc.

Po analizie struktury tetrameru domen ISOM CaGfa1 wytypowano reszty aminokwasowe potencjalnie odpowiedzialne za tworzenia wiązań między poszczególnymi łańcuchami i wymieniono je podczas mutagenezy na możliwie izosteryczne reszty nie mogące tworzyć wiązań wodorowych: Arg394Ile, Arg442Ile, Asp524Ala, Ser525Ala i Ser527Ala. Otrzymany rekombinant w dominującej ilości występował jako dimer, a tylko w śladowych ilościach zachował strukturę tetrameru. Dodatkowo muteina utraciła wrażliwość na działanie UDP-GlcNAc podczas, gdy aktywność katalityczna została zachowana, ale na dużo niższym poziomie. Z kolei w wyniku analizy miejsca wiążącego fizjologiczny inhibitor UDP-GlcNAc, przeprowadzono mutagenezę ukierunkowaną reszt formujących kieszeń białkową: Gly474Leu i Gly490Leu oraz reszt odpowiedzialnych za wiązanie cząsteczki inhibitora: Thr487Ile i His492Phe. Otrzymana muteina zgodnie z założeniem utraciła wrażliwość na UDP-GlcNAc. Natomiast zaskakującym rezultatem była zmiana w oligomeryzacji enzymu, gdyż zaobserwowano trzy formy muteiny: tetramer, dimer i monomer (dwie pierwsze struktury aktywne katalitycznie, a trzecia - nieaktywna). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono zależność między analizowanymi obszarami, które

prawdopodobnie ze względu na niewielką odległość między sobą pośrednio wpływają na wzajemną funkcjonalność.

W zakresie badań krystalograficznych przeprowadzono analizę bioinformatyczna syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, w wyniku której stwierdzono, że enzym ten jest cząsteczką zawierającą wiele elastycznych elementów, które powodują dużą ruchliwość białka. W związku z czym proces krystalizacji dodatkowo jest utrudniony. Kolejną niedogodnością w krystalizacji jest konieczność otrzymania wysoce homogennego i aktywnego preparatu białkowego. Podczas, gdy syntaza GlcN-6-P charakteryzuje się długim procesem oczyszczania składającym się z wielu etapów. W celu ułatwienia i skrócenia protokołu izolacji enzymu, skonstruowano wersję rekombninanta *Ca*Gfa1 z mikro fragmentem oligoHis. Fragment heksaHis składa się z dwóch triad z sąsiadujących monomerów: His568-His569-His596 (His596 naturalnie występujący w genie, natomiast dwie pozostałe His wprowadzono podczas mutagenezy w pozycję Lys568 i Ser569) i powstaje w strukturze 3D. Wykreowanie przestrzennego fragmentu oligoHis umożliwiło szybkie i efektywne oczyszczanie enzymu z wykorzystaniem chromatografii metalopowinnowactwa.

Krystalizację syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* prowadzono w szczególności dla *Ca*Gfa1-K568HS569H, ale również dla enzymu typu dzikiego *Ca*Gfa1 i dla domeny glutaminazowej *Ca*Gfa1 (dGAH-His₆C). W wyniku licznych prób krystalizacji otrzymano wiele drobnych kryształów, dla których warunki krystalizacji należy w dalszym ciągu optymalizować w celu otrzymania kryształów o jakości umożliwiającej badania rentgenograficzne.

2. WPROWADZENIE

2.1. Fizjologiczne znaczenie syntazy GlcN-6-P

Enzym zwany zwyczajowo syntazą GlcN-6-P bierze udział w szlaku biosyntezy heksozamin (HBP – *ang. Hexosamine Biosynthesis Pathway*), który stanowi odgałęzienie glikolizy. Powstały produkt - UDP-GlcNAc, w zależności od organizmu gospodarza, wykorzystywany jest następująco:

- > bakterie tworzenie peptydoglikanu, lipopolisacharydów i kwasów tejchojowych,
- grzyby biosynteza chityny i mannoprotein (Rys. 1),
- ssaki biosynteza glikoprotein, glikolipidów oraz mukopolisacharydów [Milewski 2002, Buse 2006].

UDP-GlcNAc uczestniczy w tworzeniu makromolekuł, które są ważnymi składnikami ścian komórkowych zarówno prokariotów jak i eukariotów. Występowanie i prawidłowe funkcjonowanie syntazy GlcN-6-P jest konieczne dla bakterii i grzybów. Usunięcie genu kodującego to białko, daje efekt letalny [Freese i in. 1970, Sarvas 1971, Wu i in. 1971, Whelan i in. 1975, Imada i in. 1977]. Jednakże w przypadku bakterii występuje ewentualność zajścia mutacji supresorowej, która umożliwia innemu enzymowi - deaminazie GlcN-6-P, przejęcie funkcji syntazy GlcN-6-P [Vogler i in. 1989].

U grzybów dimorficznych podczas transformacji morfologicznej zawartość chityny ulega zmianie. Wahania ilości chityny związane są ze zmianami aktywności syntazy GlcN-6-P. Co więcej inhibicja tego enzymu w komórkach *Candida albicans* skutkuje zahamowaniem transformacji morfologicznej formy grzybowej (Y) w mycelialną (M) [Chiew i in. 1980, Milewski i in. 1986, Milewski i in. 1999, Gabriel i in. 2004].

Fizjologiczne znaczenie tego enzymu wśród ssaków okazuje się bardziej skomplikowane. Nie ma żadnych wątpliwości, że enzym ten jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, ale jego krótkotrwała inhibicja nie wywołuje toksycznych skutków. Organizmy wyższe są w stanie przeżyć kilkunastogodzinne, a nawet wielodniowe, zahamowanie syntezy glikoprotein. Przeżycie organizmów ssaczych, podczas krótkotrwałej inhibicji syntazy GlcN-6-P, jest możliwe ze względu na dłuższy okres życia komórek ssaczych, dłuższy czas półtrwania białka Gfa i bardzo efektywną ekspresję genu *GFA* w komórkach [Bates i in. 1966, Chmara i in. 1986, Marshall i in. 1991]. Udowodniono również, że w poszczególnych tkankach tego samego organizmu występują znaczne różnice w aktywności syntazy GlcN-6-P. Najwyższą aktywność u szczurów odnotowano

w gruczołach podjęzykowych i przyszczękowych, w okrężnicy, grasicy oraz w wątrobie. Z kolei średnią aktywność wykazują: płuca, mózg i śledziona, a stosunkowo niską stwierdzono w mięśniach, nerkach i erytrocytach. Ciekawą kwestią okazało się odkrycie, że aktywność enzymu w gruczołach przyżuchwowych u samców jest 10 razy mniejsza niż u samic. Ponadto poziom aktywności syntazy GlcN-6-P pod wpływem testosteronu może się zmieniać w niektórych tkankach. Wahania poziomu aktywności tego enzymu są zauważalne podczas rozwoju prenatalnego i postnatalnego. Znaczny wzrost aktywności syntazy GlcN-6-P występuje w zarodkach, ale za to względnie niski poziom zaobserwowano w wątrobie noworodków. Wykazano, że aktywność tego białka szybko wzrasta w trakcie wczesnego rozwoju postnatalnego, a następnie spada [Richards i in. 1973, Bai i in. 1976, Tsuiki i in. 1976, Hosoi i in. 1978, Rukmini i in. 1983, Adler 1984].

Aktywność enzymu w szlaku biosyntezy aminocukrów pośrednio wpływa również na poziom glukozy w komórce. Klinicznie stwierdzono, że u osób chorych na cukrzycę typu II, aktywność syntazy GlcN-6-P jest zwiększona i przyczynia się do wzrostu insulinooporności [Marshall i in. 1991, Rossetti i in. 1995, Hebert i in. 1996, McClain i in. 1996, Yki-Järvinen 1996, Oki i in. 1999, Niimi i in. 2001, Buse 2006, Nakaishi i in. 2009]. Uważa się, że jest to efekt odwracalny, a zahamowanie aktywności enzymu umożliwi powrót do fizjologicznego stanu organizmu.

Różnice we właściwościach i znaczeniu fizjologicznym syntazy GlcN-6-P w różnych komórkach stanowią podstawę dla opinii wskazujących na możliwość wykorzystania tego enzymu jako celu molekularnego w chemoterapii przeciwgrzybowej oraz w terapii objawowej cukrzycy typu II, o ile zostaną opracowane jego selektywne inhibitory [Milewski i in. 1988, Voger i in. 1989, Marshall i in. 1991, Rossetti i in. 1995, Hebert i in. 1996, McClain i in. 1996, Yki-Järvinen i in. 1996, Oki i in. 1999, Borowski 2000, Brownlee 2001, Niimi i in. 2001, Milewski 2002, Chou 2004, Wojciechowski i in. 2005, Buse 2006, Nakaishi i in. 2009, Banerjee i in. 2011, Gupta i in. 2011]. Sprzyjać temu celowi powinno jak najlepsze poznanie struktury i właściwości tego białka, nad czym prowadzone są intensywne prace w kilku ośrodkach badawczych.



Rys. 1. Umiejscowienie reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P w szlaku biosyntezy makromolekuł z wyszczególnieniem szlaku biosyntezy i biodegradacji chityny w komórkach grzybów. Enzymy biorące udział w szlaku: I - heksokinaza, II - izomeraza fosfoglukozowa, III – syntaza GlcN-6-P, IV – deaminaza GlcN-6-P, V - N-acetylotransferaza GlcN-6-P, VI - deacetylaza GlcNAc-6-P, VII - mutaza fosfoacetyloglukozaminy, VIII – pirofosforylaza UDP-GlcNAc, IX – syntaza chitynowa, X - chitynaza, XI – chitobiaza, XI - kinaza GlcNAc, XII – N acetyloheksozaminidaza

2.2. Syntaza glukozamino-6-fosforamu – dotychczasowy stan wiedzy

2.2.1. Ogólna charakterystyka enzymu

Enzym amidotransferaza L-glutamina: D-fruktozo-6-fosforan (EC 2.6.1.16), zwyczajowo nazywana syntazą glukozamino-6-fosforanu, katalizuje pierwszą i limitującą reakcję w szlaku biosyntezy chityny, w którym głównym intermediatem jest UDP-GlcNAc. Syntaza GlcN-6-P katalizując przekształcanie Fru-6-P do GlcN-6-P, wykorzystuje L-Gln jako donor jonu amonowego (Rys. 2). Katalizowana przez ten enzym reakcja jest nieodwracalna i nie wymaga ATP, ani żadnych innych kofaktorów [Zalkin 1985, Durant i in. 2008].



Rys. 2. Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P.

Ze względu na aktywność katalityczna syntaza GlcN-6-P zaklasyfikowana jest do rodziny amidotransferaz glutamino-zależnych klasy II (Gn-AT). Jest to grupa enzymów, dla których w centrum katalitycznym kluczową rolę odgrywa reszta cysteinylowa znajdująca się na N-terminalnym końcu łańcuch polipeptydowego [Massière i in. 1998]. Syntaza GlcN-6-P katalizuje dwie sprzężone ze sobą reakcje enzymatyczne. W pierwszym kroku następuje transfer grupy aminowej ugrupowania amidowego L-glutaminy na cząsteczkę fruktozo-6-fosforanu. Natomiast w drugiej reakcji dochodzi do izomeryzacji powstającego fruktozoimino-6-fosforanu do glukozamino-6-fosforanu. Aktywność Gn-AT jest zależna od jonu amonowego, którego źródłem dla syntazy GlcN-6-P jest tylko L-glutamina. Enzym wykazuje dużą specyficzność w stosunku dla L-glutaminy, jako donora grupy aminowej oraz dla fruktozo-6-fosforanu jako akceptora [Isupov i in. 1996]. Miejsce, w którym następuje związanie oraz hydroliza L-Gln do L-Glu i amoniaku nazywane jest domeną glutaminazowa (GAT – glutamine amide transfer domain). Natomiast obszar wiążący substrat akceptorowy i katalizujący przeniesienie cząsteczki amoniaku nazywa się domeną izomerazową (ISOM). Wśród Gn-AT domeny GAT wykazują wysoką homologiczność, chociaż zidentyfikowano obszary o nieznanej funkcji występujące tylko w eukariotycznej wersji białka, natomiast domeny akceptorowe, do których należy ISOM, znacząco różnią się budową [Buchanan 1973, Zalkin 1993, Isupov i in. 1996, Massière i in. 1998, Milewski 2002].

Ze względu na dominującą ilość reszt aminokwasowych o charakterze kwasowym nad zasadowymi w sekwencji aminokwasowej, syntaza GlcN-6-P wykazuje charakter kwaśny i pI dla tego białka waha się w granicach 4,1 – 5. Ponadto enzym ten jest stosunkowo "powolny", gdyż wartości liczby obrotów nie przekraczają 10^2 s⁻¹ [Milewski 2002]. Wartości K_M dla enzymu wynoszą:

• wobec *L*-Gln 0,2 - 3,8 mM

wobec *D*-Fru-6-P 0,2 – 2,9 mM [Huynh i in. 2000, Broschat i in. 2002, Milewski 2002, Olchowy i in. 2006, Floquet i in. 2007, Olchowy i in. 2007, Richez i in. 2007, Luo i in. 2009, González-Ibarra i in. 2010, Valerio-Lepiniec i in. 2010, Czarnecka i in. 2012, Jędrzejczak i in. 2012, Assrir i in. 2014, Wang i in. 2014].

Syntaza GlcN-6-P jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie. Występuje zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Pierwsze publikacje dotyczące izolacji i charakterystyki właściwości enzymu z różnych źródeł ukazały się w latach 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku i dotyczą syntazy GlcN-6-P z komórek *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Neurospora crassa* oraz z komórek wątroby szczura i HeLa [Ghosh i in. 1960, Kornfeld 1967, Winterburn i in. 1971]. W zależności od pochodzenia enzym ten wykazuje pewne różnice m. in. w masie cząsteczkowej. Prokariotyczna syntaza GlcN-6-P w większości przypadków występuje w postaci homodimeru o masie 130 – 150 kDa [Badet i in. 1987, Isupov i in. 1996], natomiast enzym pochodzenia eukariotycznego w formie homotetrameru o masie 320 – 340 kDa [Raczyńska i in. 2007, Luo i in. 2009, Nakaishi i in. 2009, González-Ibarra i in. 2010].

2.2.2. Budowa enzymu

Najlepiej do tej pory scharakteryzowana została syntaza GlcN-6-P z *E. coli* (*Ec*GlmS), dla której określono strukturę przestrzenną kompletnej cząsteczki [Obmolova i in. 1994, Isupov i in. 1996, Teplyakov i in. 1998, Teplyakov i in. 2001, Mouilleron i in. 2006, Durand i in. 2008, Mouilleron i in. 2008]. Natomiast w przypadku enzymu pochodzenia eukariotycznego w ostatnich latach otrzymano m. in. strukturę 3D dla domeny ISOM enzymu ludzkiego (*Hs*Gfat) oraz z *C. albicans* (*Ca*Gfa1) [Raczyńska i in. 2007, Nakaishi i in. 2009]. Poszczególne elementy strukturalne enzymu zostały opisane na postawie syntazy GlcN-6-P z *E. coli*.

2.2.2.1. Pierwszorzędowa struktura enzymu

Z przeprowadzonych analiz baz danych wynika, iż znanych jest co najmniej 3274 sekwencji kodujących syntazę GlcN-6-P. Gen bakteryjny kodujący syntazę GlcN-6-P w literaturze opisywany jest jako *GLMS*, natomiast gen eukariotyczny - *GFA*, a w tym pochodzący z *Candida albicans* – *GFA1* i z komórek ssaczych - *GFAT*.

Różnicę pomiędzy wersjami enzymu z różnych organizmów obserwuje się już na poziomie długości sekwencji aminokwasowej białka. Jednakże reszty aminokwasowe odpowiedzialne za funkcjonalność enzymu są silnie zakonserwowane w sekwencji. Cechą wspólną dla wszystkich syntaz GlcN-6-P jest zachowanie:

- N-terminalnej domeny glutaminazowej (w *E. coli* kodowana przez 1-248 aa, o masie 27 kDa) – odpowiedzialnej za hydrolizę L-glutaminy do kwasu glutaminowego i amoniaku,
- C-terminalnej domeny izomerazowej (w *E. coli* kodowana przez 249-608 aa, o masie 40 kDa) – odpowiedzialnej za wiązanie Fru-6-P i izomeryzację ketoza-aldoza produktu przejściowego [Durand i in. 2008].

W obu domenach występują fragmenty silnie zakonserwowane i obejmujące na ogół reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie substratów oraz za aktywność katalityczną. Domeny GAT i ISOM połączone są linkerem sładającym się z 9 reszt aminokwasowych [Olchowy i in. 2007]. Wieloletnie badania wykazały, że fragment ten odgrywa istotną role w katalizie, poprzez zapewnienie odpowiedniej elastyczności i umożliwienie odpowiedniego przesunięcie względem siebie domen GAT i ISOM [Flaquet i in. 2009]. Kolejnym elementem, charakterystycznym dla syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego jest fragment o zróżnicowanej długości (w zależności od pochodzenia) występujący w obszarze domeny GAT. Właściwa funkcja tego fragmentu nie jest całkowicie poznana. Jego długość oraz skład aminokwasowy, w zależności od pochodzenia enzymu, w dużym stopniu jest zróżnicowana. W zakresie tego fragmentu nie zaobserwowano żadnych specyficznych i silnie zakonserwowanych reszt aminokwasowych. Początkowo przypuszczano, że może być częściowo odpowiedzialny za wiązanie allosterycznego inhibitora UDP-GlcNAc. Jednakże Olchowy i wsp. jednoznacznie stwierdzili, że fragment ten nie odgrywa roli w wiązaniu cząsteczki UDP-GlcNAc [Olchowy i in. 2007].

Różnice w sekwencji aminokwasowej prokariotycznej i eukariotycznej syntazy GlcN-6-P prześledzić można na przykładzie sekwencji *GLMS* z *E. coli* i *GFA1* z *C. albicans* (Rys. 3). Pierwsza z nich składa się z 608, a druga z 712 reszt aminokwasowych. Porównując

obie sekwencje stwierdzono, że 36% sekwencji jest identyczna, a 52% stanowią reszty o podobnym charakterze. Jednak reszty aminokwasowe istotne dla aktywności katalitycznej są zachowane zarówno w *EcGLMS* jak i *CaGFA1*, co sugeruje taki sam mechanizm katalityczny dla obu enzymów.

EcGLMS CaGFA1	CGIVGAIAQRDVAEILLEGLRRLEYRGYDSAGLAVVDAEGHMT CGIFGYVNFLVDKSRGEIIDNLIEGLQRLEYRGYDSAGIAVDGKLTKDPSNGDEEYMDSI ***.*:::::::::::::::::::::::::::::::::	43 60
EcGLMS CaGFA1	RLRRLGKVQMLAQAAEEHPLHGGTGIAHTRWATHGEPSEANAHPHVSEHIV IVKTTGKVKVLKQKIIDDQIDRSAIFDNHVGIAHTRWATHGQPKTENCHPHKSDPKGEFI :: ***::* * :. :********************	94 120
EcGLMS CaGFA1	VVHNGIIENHEPLREELKARGYTFVSETDTEVIAHLVNWELKQGGTLREAVLRA VVHNGIITNYAALRKYLLSKGHVFESETDTECIAKLFKHFYDLNVKAGVFPDLNELTKQV ******* *: .**: * ::*:.* ****** **:*.: ::*: . *.*	148 180
EcGLMS CaGFA1	IPQLRGAYGTVIMDSRHPDTLLAARSGSPLVIGLG	183 240
EcGLMS CaGFA1	FIASDQLALLPVTRR QINHNGATSAAELGFIPVAPGEQNLRTSQSRAFLSEDDLPMPV <mark>EFFLSSDPASVVQHTKK</mark> :.*: *::** ::: *::	202 300
EcGLMS CaGFA1	FIFLEEGDIAEITRRSVNIFDKTGAEVKRQDIES-NLQ YDAGDKGIY RHYMQKEIYE VLFLEDDDIAHIYDGELRIHRASTKSAGESTVRPIQTLEME LNEIMKGPY KHFMQKEIFE .:***:.***.* .:.*. *:* . : *:: :: : ** *:******	258 360
EcGLMS CaGFA1	QPNAIKNTLTGRISHGQVDLSELGPNADELLSKVEHIQILACGTSYNSGMVSRYWFES QPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIR-RCRRIIMIACGTSYHSCLATRSIFEE **:: **: *** * *. * . : : ::* ::******:* :.:* **.	316 419
EcGLMS CaGFA1	LAGIPCDVEIASEFRYRKSAVRRNSLMITLSQSGETADTLAGLRLSKELGYLGSLAICNV LTEIPVSVELASDFLDRRSPVFRDDTCVFVSQSGETADSILALQYCLERGAL-TVGIVNS *: ** .**:**:* *:*.* *:. : :*******:: .*: . * * * :* *	376 478
EcGLMS CaGFA1	PGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAKLSRLKGLDASIEHDIVHG VGSSMSRQTHCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSNDSISRKGRHEEIIKG ***: *::: ***.***********************	436 538
EcGLMS CaGFA1	LQALPSRIEQMLSQDKRIEALAED-FSDKHHALFLGRGDQYPIALEGALKLKEISYIHAE LQKIPEQIKQVLKLENKIKDLCNSSLNDQKSLLLLGRGYQFATALEGALKIKEISYMHSE ** :*.:*:*: ::::: *::: *::: *::: *::****	495 598
EcGLMS CaGFA1	AYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNNELLEKLKSNIEEVRARGGQLYVFADQDAGFVS GVLAGELKHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARDGRPIVICNEGDAIIS . ******* ***:* *:*:***: *: * **:* **.*: *:.::*	555 658
EcGLMS CaGFA1	SDNMH-IIEMPHVEEVIAPIFYTVPLQLLAYHVALIKGTDVDQPRNLAKSVTVE 608 NDKVHTTLEVPETVDCLQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPRNLAKSVTVE 712 .*::* :*:* : : :: .:****::* :*: :* *** **	

Rys. 3. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych syntazy GlcN-6-P pochodzenia prokarriotycznego z *E. coli (EcGLMS)* i eukariotycznego z *C. albicans (CaGFA1)*. Odmena GAT oznaczona żółtym tłem, domena ISOM – miebieskim tłem. Łącznik między obiema domenami i gwarantujący elastyczność cząsteczki oznaczony czerwoną czcionką. Dodatkowy fragment peptydowy, charakterystyczny dla syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukoriotycznego zaznaczony w czarnej ramce. Dokładne opisy poszczególnych elementów w dalszej części pracy. "Gwiazdki" poniżej sekwencji oznaczają identyczne reszty aminokwasowe, "kropki" – podobieństwo. Analizę wykonałam na podstawie programu ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

Zaobserwowano również, że w przypadku sekwencji kodującej syntazę GlcN-6-P w *Histoplasma capsulatum* występują introny [Sachadyn i in. 1998]. W kilku przypadkach wykryto również, że syntaza GlcN-6-P w jednym organizmie jest kodowana przez kilka różnych genów. Sytuacja taka pojawia się np. w bakteriach *Rhizobium leguminosarum*, u myszy, szczurów i ludzi [Durand i in. 2008]. Obecnie jest znanych kilka wersji genu ludzkiego kodującego syntazę GlcN-6-P: *GFAT1*, *GFAT2* i *GFAT1-L* [Oki i in. 1999, Nakaishi i in. 2009] lub *GFAT1* i *GFAT1Alt* [Milewski 2002]. Ich sekwencje są identyczne odpowiednio w 75% lub 79%. Różnice występujące w sekwencji aminokwasowej danych izoenzymów mogą mieć odbicie w powinowactwie do substratów, co w efekcie reguluje szybkość katalizowanej reakcji, w zależności od typu tkanek, w których występują [Durand i in. 2008].

2.2.2.2. Struktura przestrzenna syntazy GlcN-6-P

Struktura przestrzenna domeny GAT syntazy GlcN-6-P z *E. coli*, określona na podstawie analizy rentgenograficznej kryształu, ma charakter typu "sandwich" i jest stabilizowana przez jony sodu (Rys. 4). Składa się ona z dwóch warstw antyrównoległych β -kartek otoczonych dwiema warstwami α -helis. Centrum aktywne, w którym odbywa się hydroliza grupy amidowej L-glutaminy znajduje się w wąskiej przestrzeni pomiędzy końcami β -kartek na N-końcu łańcucha polipeptydowego [Isupov i in. 1996].



Rys. 4. Struktura domeny GAT syntazy GlcN-6-P z *E. coli* [Isupov i in. 1996]. Elementy drugorzędowej struktury oznaczono następująco: zielony - α -helisy, czerwony - β -kartki, niebieski - jon Na⁺. L-Glu znajduje się w centrum aktywnym.

Badania prowadzone nad struktura kompleksów tej domeny z kwasem glutaminowym wykazały, że istotne znaczenie w reakcji hydrolizy ma reszta Cys1, której grupa tiolowa odgrywa rolę czynnika nukleofilowego (Rys. 5). Dodatkowo grupa hydroksylowa z Thr606 (należąca do C-petli z domeny ISOM) tworzy wiązanie z grupą α -aminową Cys1, zwiększając przez to jego zasadowość. Z kolei reszty Arg73 i Asp123 odpowiadają za wiązanie substratu oraz stabilizację reaktywnego kompleksu przejściowego. Reszty 73-79 (petla Q) tworzą tzw. "klapę", która zamyka dostęp do centrum aktywnego po związaniu substratu - L-glutaminy. Związanie substratu wywołuje zmiany konformacyjne zamykające dostęp do centrum aktywnego. Dodatkowo zmiany te powoduja przesunięcie reszty Cys1 do pozycji odpowiedniej do ataku nukleofilowego. Atom azotu grupy amidowej Gly99 i karbonylowy atom tlenu Trp74 z grupą amidową glutaminy tworzą wiązania wodorowe. Natomiast grupa aminowa łańcucha bocznego Asn98 i grupa aminowa Gly99 dodatkowo stabilizują oksyanion tetraedrycznym kompleksie przejściowym. Pętla 25-29 odgrywa ważną rolę W w komunikacji między domenami, a szczególnie Arg26 uczestniczy w przegrupowaniu podczas wiazania do czasteczki akceptora Fru-6-P, a tym samym powoduje obrót Cys1 do aktywnej konformacji [Isupov i in. 1996, Teplyakov i in. 1998, Teplyakov i in. 2001, Moullieron i in. 2006, Moullieron i in. 2010,].



Rys. 5. Porównanie centrum aktywnego domeny GAT syntazy GlcN-6-P z *E. coli* w kompleksie z Fru-6-P (kolor niebieski) i w kompleksie z Glc-6-P oraz z DON (kolor pomarańczowy) [Moullieron i in. 2010].

C-terminalna domena izomerazowa odpowiedzialna jest za przeprowadzanie reakcji izomeryzacji Fru-6-P do GlcN-6-P. W jej skład wchodzą następujące elementy: N-terminalny (241-424 aa) i C-terminalny (425-592 aa) fragment oraz tzw. ogon-C (593 – 608 aa) (Rys. 6) [Isupov i in. 1996]. Fragment N- i C-końcowy domeny ISOM stanowią dwie identyczne pod względem topologii i rozmiaru subdomeny. Każda z subdomen tworzy układ typu "sandwich" $\alpha\beta\alpha$, na który składa się pięć równoległych β -kartek otoczonych α -helisami. Ogon-C jest nieregularną pętlą, umożliwiającą komunikację z domeną glutaminową oraz pełni kluczową rolę w wiązaniu substratu.



Rys. 6. Struktura domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P z *E. coli* w kompleksie z GlcN-6-P i MES [Isupov i in. 1996]. Elementy drugorzędowej struktury oznaczono następująco: zielony - α -helisy, czerwony - β -kartki, niebieski - ogon-C. Helisa CE# pochodzi z drugiej podjednostki dimeru.

Domena izomerazowa wykazuje symetrię, ale mimo tego posiada tylko jedno centrum katalityczne. Rolę katalityczną pełnią głównie reszty Glu488, i Lys603 oraz reszty z sąsiedniej podjednostki Lys503*, His504* i Gly505* (Rys. 7) [Mouilleron i in. 2008]. Szczególną uwagę należy zwrócić m. in. na resztę His504*, gdyż zlokalizowana jest na obrzeżach domeny ISOM, a tym samym w stosunkowo dużej odległości od centrum katalitycznego. Takie ułożenie może tłumaczyć warunek konieczny, że aby katalizowana reakcja zaszła, konieczna jest struktura czwartorzędowa co najmniej dimeru, gdzie His504* z jednego podjednostki uczestniczy w centrum katalitycznym drugiej podjednostki [Floguet i in. 2009]. Z kolei reszty Ala602 i Val605 z ogona-C, razem z resztą Trp74 z domeny GAT kontrolują właściwe tworzenie kanału amonowego [Flouquet i in. 2007]. Za wiązanie

substratu odpowiedzialne są głównie reszty Ser347 i Gln348, a Lys485 dodatkowo powoduje deprotonowanie pierścienia cukrowego. Po związaniu substratu Fru-6-P następuje przesunięcie ogona-C o 20° i w ten sposób zamykane jest centrum aktywne w domenie ISOM. Podczas reakcji, w wyniku zmiany położenia Arg26 jaka zachodzi w domenie GAT, następuje rotacja łańcucha bocznego Ser604 oraz przesunięcie wiązania peptydowego Lys603 [Teplyakov i in. 1998, Mouilleron i in. 2006, Floquet i in. 2009, Mouilleron i in. 2010].



Rys. 7. Porównanie centrum aktywnego domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *E. coli* w kompleksie z Fru-6-P (koloru niebieskiego) i w kompleksie z GlcN-6-P (koloru fioletowego) [Moullieron i in. 2010].

Struktura krystaliczna kompletnej syntazy GlcN-6-P z *E. coli* wskazuje na obecność wewnętrznego hydrofobowego kanału, łączącego centrum aktywne obu domen (Rys. 8). Kanał hydrofobowy ma kluczowe znaczenie w transporcie cząsteczki amoniaku z domeny GAT do domeny ISOM. Amoniak jest jednocześnie produktem reakcji zachodzącej w domenie GAT i substratem do aktywności domeny ISOM, a zatem jego prawidłowy transfer między domenami jest warunkiem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania całego enzymu. Należy pamiętać również, że syntaza GlcN-6-P nie posiada żadnych dodatkowych miejsc wiązania dla NH₃, co oznacza że nie ma możliwości pobierania go z zewnątrz.

Kanał hydrofobowy formowany jest przez struktury z domeny GAT – reszty Arg26 i Trp74, z domeny ISOM – reszty 601-607 (ogon-C) i z sąsiedniej podjednostki ISOM – reszty 503*-505* (petla-His). W E. coli kanał ten wynosi 18Å długości i ok. 6Å szerokości [Teplyakov i in. 2001]. Ważna rolę w jego formowaniu odgrywaja również reszty Leu601, Ala602, Val605, Val607, które odpowiadają ze tworzenie wejścia do miejsca wiązania pierwszego substratu. Po związaniu Fru-6-P dochodzi do zamknięcia pętli-C oraz obrotu domeny GAT względem ISOM. Jeśli centrum aktywne domeny ISOM jest puste kanał nie powstanie. W obecności Fru-6-P, a przy braku L-Gln, kanał jest prawie całkowicie uformowany, a jedyna przeszkoda jaka pozostaje w komunikacji między domenami jest grupa indolowa reszty Trp74. Taki stan, czyli zaczopowanie kanału przy braku L-Gln uniemożliwia enzymowi wykorzystywanie innych źródeł jonu amonowego. Dopiero po związaniu drugiego substratu – L-Gln, następuje przesunięcie reszty Trp74 o 75°, w wyniku czego kanał zostaje otwarty, a amoniak stymulowany resztami Ala602 i Val605 może przejść przez kanał. Zatem reszta Trp74 odgrywa główna rolę w transporcie amoniaku z centrum katalitycznego domeny GAT do centrum domeny ISOM. Mechanizm wiązania substratów i otwarcia-zamknięcia kanału, wywołuje przesunięcia w całej strukturze przestrzennej białka. Domeny GAT wykazuja duża elastyczność w stosunku do domen ISOM, a po zwiazaniu Fru-6-P ich ruch jest ograniczony. Odpowiednią elastyczność między dwoma domenami w monomerze zapewnia łańcuch polipeptydowy występujący na pograniczu obu domen. Z kolei domeny ISOM również wykazują pewne przesunięcia, ale obie domeny ISOM w funkcjonalnym dimerze poruszają się razem i zachowują sztywność rdzenia (Rys. 9) [Teplyakov i in. 1998, Teplyakov i in. 2001, Moullieron i in. 2006, Floquet i in. 2007, Floquet i in. 2009, Moullieron i in. 2010].



Rys. 8. Obraz przestrzenny kanału wewnętrznego *Ec*GlmS: (A) Kanał hydrofobowy na tle monomeru (niebieskie kulki). (B) Kanał uformowany, ale zamknięty - struktura po związaniu Fru-6-P. (C) Kanał otwarty - struktura po związaniu L-Gln. [Moullieron i in. 2010].



Rys. 9. Obraz przestrzenny ruchu całej struktury syntazy GlcN-6-P z *E. coli* wywołany wiązaniem substratów i otwarciem-zamknięciem kanału wewnętrznego [Moullieron i in. 2010]. Domeny ISOM zaznaczone kolorami: żółtym, zielonym, fioletowym i szarym. Domeny GAT - niebieskim i pomarańczowym.

W przypadku syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego na przykładzie *Ca*Gfa1, podobnie jak *Ec*GlmS, każda podjednostka również składa się z dwóch domen: N-terminalna GAT (1-345 aa) i C-terminalna ISOM (346-712 aa) [Olchowy i in. 2007]. Do tej pory dla *Ca*Gfa1 dostępne są dokładne dane strukturalne dotyczące jedynie domeny ISOM [Raczyńska i in. 2007]. Budowa drugorzędowa ISOM *Ca*Gfa1 jest bardzo podobna do struktury domeny izomerazowej opisanej dla *Ec*GlmS, za wyjątkiem helisy CE i CG oraz dodatkowej helisy między nicią C3 (516-519 reszty w *Ec*GlmS) a helisą CF (reszty 525-538 w *Ec*GlmS) (Rys. 10). Całościowo struktura domeny ISOM Gfa1 z *C. albicans* odrobinę różni się od domeny izomerazowej GlmS z *E. coli.* Jednakże reszty z *Ec*GlmS opisane jako istotne dla wiązania substratów i w katalizowanej reakcji mają swoje odpowiedniki w drożdżowej syntazie GlcN-6-P i tak np. reszta odpowiedzialna za wiązanie i odprotonowanie pierścienia cukrowego Lys485 w *Ec*GlmS odpowiada Lys588 w *Ca*Gfa1 (Rys. 11) [Raczyńska i in. 2007].

			1	IA N	В		NC	N1	ND	
C.	albicans	346	MKGPYKHFMQ	KEIFEQPDSA	FNTMRGRIDF	ENCVVTLGGL	KSWLSTIRRC	RRIIMIACGT	SYHSCLATRS	IFEELTEIPV
E.	coli	244	DKGIYRHYMQ	KEIYEQPNAI	KNTLTGRISH	GQVDLSELGP	N-ADELLSKV	EHIQILACGT	SYNSGMVSRY	WFESLAGIPC
			N2 NE		N3	NF	N4		G N5	
C.	albicans	426	SVELASDFLD	RRSPVFRDDT	CVFVSQSGET	ADSILALQYC	LERGALT-VG	IVNSVGSSMS	ROTHCGVHIN	AGPEIGVAST
E.	coli	323	DVEIASEFRY	RKSAVRRNSL	MITLSQSGET	ADTLAGLRLS	KELGYLGSLA	ICNVPGSSLV	RESDLALMTN	AGTEIGVAST
			(NH			CA		СВСС	C C1	CD
C.	albicans	505	KAYTSQYIAL	VMFALSLSND	SISRKGRHEE	IIKGLQKIPE	QIKQVLKLEN	KIKDLCNSSL	NDQKSLLLLG	RGYQFATALE
E.	coli	403	KAFTTQLTVL	LMLVAKLSRL	KGLDASIEHD	IVHGLQALPS	RIEQMLSQDK	RIEALAEDFS	-DKHHALFLG	RGDQYPIALE
			CD	C2		C3		CF	C4	
C.	albicans	585	GALKIKEISY	MHSEGVLAGE	LKHGILALVD	EDLPIIAFAT	RDSLFPKVMS	AIEQVTARDG	RPIVICNEGD	AIISNDKVHT
E.	coli	482	GALKLKEISY	IHAEAYAAGE	LKHGPLALID	ADMPVIVVAP	NNELLEKLKS	NIEEVRARGG	QLYVFADQDA	GFVSSDNMH-
			C5	Cł	1]					
C.	albicans	665	TLEVPETVDC	LQGLLNVIPL	QLISYWLAVN	RGIDVDFPRN	LAKSVTVE			
E.	coli	561	IIEMPHVEEV	IAPIFYTVPL	QLLAYHVALI	KGTDVDQPRN	LAKSVTVE			

Rys. 10. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* i *E. coli* z przedstawionymi elementami struktury drugorzędowej. Reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie UDP-GlcNAc – czerwone. Reszty odpowiedzialne za tworzenie dimeru – żółte i tetrameru – niebieskie. Reszty biorące udział w aktywności katalitycznej enzymu – fioletowe [Raczyńska i in. 2007].



Rys. 11. Obraz przestrzenny struktury drugorzędowej domeny ISOM *Ca*Gfa1 [Raczyńska i in. 2007]. Oznaczenia: pomarańczowy – ADMP, zielony – UDP-GlcNAc.

Dla eukariotycznej syntazy GlcN-6-P, bardzo charakterystyczny jest fragment o długości kilkudziesięciu reszt aminokwasowych występujący obszarze domeny GAT w pozycji 250±40 aa. W przypadku Gfa1 z *C. albicans* fragment ten obejmuje reszty 218-283. Z dotychczasowych badań wynika, że powyższy fragment nie jest zaangażowany w wiązanie UDP-GlcNAc, ani w tworzenie struktury czwartorzędowej białka. Do tej pory właściwa funkcja insertu 218-283 nie została poznana [Olchowy i in. 2007]. Kolejnym elementem charakterystycznym dla syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego jest uformowanie kieszeni wiążącej cząsteczkę fizjologicznego inhibitora, na powierzchni domeny ISOM. Dokładny opis miejsca wiązania UDP-GlcNAc przedstawiony jest w dalszej części pracy (Rozdział 2.2.2.1).

2.2.2.3. Struktura oligomeryczna syntazy GlcN-6-P

Z dotychczasowych badań wykazano, że podstawową i funkcjonalną formą syntazy GlcN-6-P jest cząsteczka dimeryczna. Monomer nie wykazuje aktywności syntazy GlcN-6-P, gdyż w centrum aktywnym jego domeny ISOM brak ważnej dla katalizy reszty His (His504 w syntazie GlcN-6-P z *E. coli*), która pochodzic z drugiej podjednostki w strukturze symetyrycznego dimeru. Minimalna forma fukcjonalna, czyli dimer jest charakterystyczna dla syntazy GlcN-6-P pochodzenia prokariotycznego [Isupov i in. 1996, Moullieron i in. 2006, Durand i in. 2008, Cheverux i in. 2011], natomiast enzym pochodzenia eukariotycznego występuje w formie dimeru dimerów, czyli homotetrameru [Raczyńska i in. 2007, Nakaishi i in. 2009, Luo i in. 2009, Jędrzejczak i in. 2012]. Struktury oligomeryczne powstają poprzez wiązanie się domen ISOM, które w efekcie tworzą trzon makrocząsteczki. Natomiast domeny GAT, za pomocą elastycznego łącznika (reszty 240 – 248 dla *Ec*GlmS), pojedynczo przyłączone są po zewnętrznych stronach do każdej z domen ISOM. Taka budowa umożliwia wzajemny ruch miedzy domenami o 23°, konieczny podczas cyklu katalitycznego (Rys. 12) [Olchowy i in. 2007, Durand i in. 2008, Floquet i in. 2009].



Rys. 12. Struktura homodimeru GlmS [Floquet i in. 2009].

Od dawna wiadomo, że *Ec*GlmS występuje w formie cząsteczki homodimerycznej [Badet i in. 1987, Isupov i in. 1996]. Jednakże w wyniku ostatnich doniesień udowodniono, że może ona również występować w formie homoheksameru (Rys. 13 i 14). Badet i wsp. jako pierwsi zaobserwowali dimorfizm struktury białka, oraz że stopień oligomeryzacji *Ec*GlmS

uzależniony jest od stężenia białka w roztworze [Mouilleron i in. 2012]. Struktura oligomeryczna heksameru *Ec*GlmS powstaje z trzech czasteczek dimerycznych, a za wiązania poszczególnymi dimerami wyjątkowo odpowiadają między domeny GAT. a nie jak do tej pory opisywano - domeny ISOM. W ten sposób powstający asocjat tworzy strukturę o kształcie trójkąta. EcGlmS w formie heksameru pozbawiona jest aktywności katalitycznej, co prawdopodobnie jest konsekwencja zmian w strukturze białka, wywołanych przez dodatkowe wiązania między domenami GAT. Zmiany te zaburzają m. in. właściwe miejsce wiązania substratów oraz prawidłowe formowanie kanału hydrofobowego. Obie formy oligomeryczne występują w równowadze, a ich wzajemny stosunek zależny jest od stężenia białka: w większym stężeniu białka dominują formy heksameryczne, w mniejszym - dimeryczne [Valerio-Lepiniec i in. 2010, Mouilleron i in. 2012]. Obecność dodatkowych czynników, takich np. jak analog L-glutaminy DON wyraźnie zwiększa ilość formy dimerycznej. Natomiast przy obecności Fru-6-P lub GlcN-6-P równowaga przesunięta jest w kierunku hemsameru. Zdolność białka do tworzenia różnych struktur oligomerycznych, klasyfikuje syntazę GlcN-6-P z E. coli do grupy białek morfeicznych (ang. morpheein protein). Koncepcja białek morfeicznych zakłada, że w zależności od aktualnej struktury, białko może wykazywać różną aktywność katalityczną, a tym samym pełnić różne funkcje [Jaffe 2005]. Różnice wynikające z oligomeryzacji i jej wpływu na aktywność, moga stać się obiecującą wskazówką w konstrukcji inhibitorów tego enzymu [Mouilleron i in. 2010, Mouilleron i in. 2012].



Rys. 13. Dimer syntazy GlcN-6-P z *E. coli* (GlmS) [Durand i in. 2008]. *Ec*GlmS stanowi homodimer składający się z dwóch podjednostek, które z kolei składają się z domeny ISOM (granatowy) i GAT (błękitny).

Główne elementy:

- N-terminalne domeny GAT (błękit) umiejscowione są po przeciwnych stronach na zewnętrznej części struktury.
- C-terminalne domeny ISOM (granat) stanowią rdzeń homodimeru
- Domena GAT i ISOM połączone są za pomocą linkera.
- C-terminalny fragment (reszty 600-608, kolor brązowy) znajduje się na granicy między domeną GAT i ISOM w jednym monomerze. Odgrywa kluczową rolę w miejscu wiązania cukru, w katalizie i komunikacji między miejscami aktywnymi poszczególnych domen.
- His-pętla z sąsiednich podjednostek (reszty 503-505, kolor pomarańczowy), uczestniczy w osłonie centrum aktywnego i zawiera resztę His istotną dla katalizy.
- Pętla Q (reszty 73-81, kolor różowy) obejmuje obszar wiązania L-Gln w domenie GAT.



Rys. 14. (A) Aktywna katalitycznie forma dimeryczna GlmS z *E. coli*. (B) Nieaktywna forma dimeryczna *Ec*GlmS. (C) Nieaktywny katalitycznie heksamer *Ec*GlmS. Każda domena ISOM zaznaczona jest ciemnym odcieniem danego koloru, a domeny GAT zaznaczone są jasnym odcieniem danego koloru [Mouilleron i in. 2012].

W przypadku syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego, wszystkie poznane wersje wykazują strukturę homotetrameru [Raczyńska i in. 2007, Luo i in. 2009, Nakaishi i in. 2009, Jędrzejczak i in. 2012]. Podobnie jest w przypadku syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, gdzie już od wielu lat zakładano, że enzym ten występuje w formie tetrameru [Milewski i in. 1999] i ostatecznie zostało to potwierdzone przez otrzymanie struktury 3D dla domeny ISOM *Ca*Gfa1 [Raczyńska i in. 2007].

Tetramer ISOM *Ca*Gfa1 może być opisany jako dimer dimerów, składa się z 4 łańcuchów polipeptydowych: A, B, C i D (Rys. 15). Posiada 222 punkty symetrii. Za formowanie struktury tetramerycznej odpowiadają wiązania wodorowe, mostki solne i oddziaływania dipolowe między sąsiednimi helisami. Każdy monomer jest odrębną strukturą, ale wzajemnie ze sobą oddziałują. Łańcuchy A i D oraz B i C są w stosunku do siebie ułożone symetrycznie i połączone pętlą łączącą helisy NH i CA z każdego łańcucha. C-koniec helisy NH znajduje się w pobliżu N-końca helisy CA z drugiego łańcucha. Pętla 524-527 bierze udział w kontakcie między łańcuchem A i D, poprzez tworzące się wiązania wodorowe między Asp524 z grupą hydroksylową Ser525 i Ser527 oraz atomem azotu grupy amidowej z wiązania peptydowego reszty Ser527 (Rys. 16). Reszty 524 i 527 są silnie zakonserwowane ewolucyjnie w sekwencjach eukariotycznych. Natomiast Ile526 w niektórych przypadkach zostaje wymieniony na Val, a Ser525 na Arg. Kolejnym miejscem kontaktu jest obszar między łańcuchami A i C oraz odpowiednio B i D, który również wykazuje symetrię (Rys. 17). Za kontakt w tym obszarze odpowiadają głównie reszty Arg394 i Arg442, które tworzą wiązania wodorowe z atomami tlenu z głównego łańcucha reszt Thr391, Arg442 i Asp444, oraz z grupą hydroksylową Thr445 i z grupą karboksylową Asp443 (z drugiego łańcuch). Dodatkowo łańcuch boczny Arg394 oddziałuje również z pierścieniem aromatycznym Phe441. Reszty odpowiedzialne za tworzenie struktury tetramerycznej w eukariotycznej syntazie GlcN-6-P charakteryzują się dużą zmiennością w sekwencji enzymu pochodzenia prokariotycznego [Raczyńska i in. 2007].



Rys. 15. Tetramer domen ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* [Raczyńska i in. 2007]. Centrum aktywne w domenie ISOM oznaczone kolorem żółtym. Miejsce wiązania fizjologicznego inhibitora UDP-GlcNAc oznaczone kolorem zielonym.



Rys. 16. Obszar kontaktu pomiędzy łańcuchami A i D. Analogiczna sytuacja pojawia się między łańcuchami B i C [Raczyńska i in. 2007].



Rys. 17. Obszar kontaktu pomiędzy łańcuchami A i C. Analogiczna sytuacja pojawia się między łańcuchami B i D [Raczyńska i in. 2007].

2.2.3. Mechanizm katalizowanej reakcji

Główną funkcją syntazy GlcN-6-P jest przekształcanie Fru-6-P do GlcN-6-P, zachodzące w wyniku przeniesienia grupy aminowej z L-glutaminy do Fru-6-P oraz izomeryzacji ketozy do aldozy. Cząsteczka amoniaku otrzymywana jest z hydrolizy L-Gln w domenie GAT. Syntaza GlcN-6-P nie ma możliwości egzogennego pobierania jonów amonowych [Froquet i in. 2007]. W przypadku braku jednego z substratów enzym nadal wykazuje pewną aktywność: przy nieobecności Fru-6-P - enzym katalizuje hydrolizę L-glutaminy [Teplyakov i in. 2001, Floquet i in. 2007], natomiast przy braku L-Gln - wykazuje aktywność izomerazy glukozofosforanowej zachowując równowagę między Fru-6-P a Glc-6-P [Leriche i in. 1996]. Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P jest bardzo złożona i składają się na nią 3 etapy:

1. hydroliza L-glutaminy

2. transfer uwolnionego amoniaku do Fru-6-P

izomeryzacja utworzonego intermediatu iminowego FruN-6-P do GlcN-6-P [Durand i in. 2008, Mouilleron i in. 2010].

Najlepiej poznany jest mechanizm reakcji katalizowanej przez bakteryjną syntazę GlcN-6-P. Dzięki wieloletnim badaniom prowadzonym głównie przez zespół Badet [Badet i in. 1987, Badet i in. 1988, Golinelli-Pompaneau i in. 1991, Isupov i in. 1996, Massière i in. 1998, Teplyakov i in. 1999, Mouilleron i in. 2006, Floquet i in. 2007, Durant i in. 2008, Mouilleron i in. 2008, Floquet i in. 2009, Mouillreon i in. 2010] i Milewskiego [Milewski 2002, Olchowy i in. 2007, Raczyńska i in. 2007] ustalono dokładny mechanizm katalizowanej reakcji.

Ogólny mechanizm reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P z *E. coli* opiera się na hipotezie istnienia hydrofobowego kanału, zlokalizowanego między centrami katalitycznymi domen GAT i ISOM (Rys. 8). Kanał ten w *Ec*GlmS formowany jest z wielu składowych m. in. z reszt pochodzących z: C-pętli domeny ISOM (Lys601, Ala601, Val605 i Val608) i domeny GAT (Arg26 i Trp74) oraz dodatkowo z His-pętli domeny ISOM sąsiedniej podjednostki z (Lys503* i His504*) [Mouilleron i in. 2006, Durand i in. 2008]. Reszty te są silnie zakonserwowane zarówno w prokariotycznych jak i eukariotycznych sekwencjach syntazy GlcN-6-P, np. w Gfa1 *C. albicans* są to: Arg32, Trp97, Ala706, Lys707, Val709, Val711, Lys606* i His607* [Olchowy i in. 2007, Raczyńska i in. 2007]. Udział w konformacji kanału, reszt aminokwasowych z dwóch podjednostek potwierdza, że struktura dimeryczna stanowi funkcjonalną podstawę enzymu. Kanał odpowiada za transport cząsteczki amonu z domeny GAT do domeny ISOM [Teplyakov i in. 1998, Teplyakov i in. 2001, Mouilleron i in. 2006, Floquet i in. 2007, Floquet i in. 2009, Mouilleron i in. 2010].

Początkowo oba miejsca aktywne są otwarte, a kanał amonowy zablokowany przez resztę Trp74. Wiązanie substratów przez syntazę GlcN-6-P przebiega w sposób uporządkowany i ich kolejność jest ściśle określona. Jako pierwszy przyłącza się Fru-6-P i jest to etap inicjujący całą reakcję (Rys. 18) [Badet i in. 1988, Mouilleron i in. 2006, Flaquet i in. 2009].



Rys. 18. Schemat cyklu katalitycznego syntazy GlcN-6-P z *E*. coli [Mouilleron i in. 2010]. Pokazany jako monomer: żółty – domena glutaminazowa, niebieski – domena izomerazowa.

Po związaniu Fru-6-P ogon-C zamyka centrum katalityczne w domenie ISOM, podczas gdy miejsce aktywne drugiej domeny wciąż pozostaje otwarte. Ruch klapy zamykającej, wywołany jest wzajemnym oddziaływaniem m. in. reszty Lys503* (z His-pętli) z resztą Glu608 (z C-pętli) tworząc mostek solny. Na tym etapie w domenie ISOM dochodzi do otwarcia pierścienia cukrowego. Istotną funkcję w tym procesie odgrywa reszta His504* (należąca do His-pętli z sąsiedniej podjednostki), która początkowo pełni rolę akceptora dla protonu z grupy 2-OH, a następnie przekazuje go na heterocykliczny atom tlenu [Teplyakov i in. 1999]. Inną równie istotną rolę w wiązaniu pierwszego substratu odgrywa

reszta Lys603, z której grupa ɛ-aminowa tworzy z grupą karbonylową Fru-6-P zasadę Schiffa, czyli silny elektrofilowy akceptor gotowy do przyjęcia grupy aminowej od L-glutaminy [Golinelli-Pimpaneau i in. 1991]. Udowodniono również, że po zamknięciu centrum katalitycznego domeny ISOM, reszty Tyr28 i Trp74 zostają zakotwiczone przez ogon-C, co w efekcie ułatwia przyłączenie drugiego substratu [Floquet i in. 2009]. Na tym etapie również kanał hydrofobowy zaczyna się częściowo formować, jednakże wciąż jeszcze jest on zablokowany od strony domeny GAT przez indolową grupę z Trp74. W takiej sytuacji dochodzi do związania cząsteczki L-glutaminy i zamknięcia centrum katalitycznego w domenie GAT przez Q-petle (73-79 aa). Następnie α -aminowa grupa Cys1 tworzy wiązanie z grupa hydroksylową Thr606 (należącej do C-petli), co zwiększa nukleofilowość reszty Cys1 (Rys. 19). Po deprotonacji tiolowa grupa Cys1 atakuje karbonylowy wegiel L-glutaminy, tworząc oksyanionowy intermediat. Taki stan przejściowy stabilizowany jest przez atom azotu z głównego łańcucha Gly99 i grupę aminową reszty Asn98. Należy również zwrócić uwagę na resztę Arg26, która z kolei stabilizuje właściwe ułożenie zarówno reszt Asn98, Gly99 jak i Cys1. Natomiast zmiany konformacji reszty Arg26 uwarunkowane są przez ułożenie C-pętli. Potwierdza to fakt, że już w momencie związania Fru-6-P i zamknięcia centrum w ISOM, zachodzą zmiany warunkujące reakcję hydrolizy L-glutaminy. W kolejnym etapie następuje przyłączenie protonu z cząsteczki wody i uwolnienie amoniaku. Deacetylacja acetyloenzymu zachodzi w wyniku ataku nukleofilowego kolejnej cząsteczki wody. Po uwolnieniu jonu amonowego kanał wciąż pozostaje zamknięty i dopiero przesunięcie reszty Trp74 otwiera kanał i umożliwia transport. Przejście przez kanał amoniaku wspomagane jest m. in. przez reszty Ala602 i Val605 [Floquet i in. 2007].

Ostatnim etapem katalizowanej reakcji jest aminowanie i izomeryzacja cukru (Rys. 20). Reszta Glu488 przenosi proton z C1 na C2, umożliwiając w ten sposób izomeryzację cukru, a His504* zamyka pierścień. Po otrzymaniu właściwego produktu - GlcN-6-P, C-pętla ulega przesunięciu, odsuwając jednocześnie reszty Lys485, Lys603 i His504* od centrum katalitycznego, co w efekcie umożliwia uwolnienie GlcN-6-P. Dzięki otwarciu centrum katalitycznego domeny ISOM, do kanału wchodzi cząsteczka wody, która następnie jest przetransportowana do domeny glutaminazowej i tam powoduje uwolnienie kwasu glutaminowego [Badet i in. 1988, Golinelli-Pimpaneau i in. 1991, Teplyakov i in. 1998, Teplyakov i in. 1999, Mouilleron i in. 2006].



Rys. 19. Mechanizm reakcji katalizowanej w domenie GAT syntazy GlcN-6-P [Mouilleron i in. 2010].



Rys. 20. Mechanizm katalizowanej w domenie ISOM syntazy GlcN-6-P [Mouilleron i in. 2010].

Niezależnie od pochodzenia enzymu, mechanizm reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P jest zawsze taki sam. Sekwencje kodujące centrum aktywne i wszystkie reszty odgrywające role w katalizowanej reakcji są silnie zakonserwowane [Durand i in. 2008]. Jednakże pewne różnice w sekwencji mogą być efektem drobnych zmian w konformacji poszczególnych elementów, wynikających z tetramerycznej struktury enzymu. W przypadku Gfa1 z *C. albicans* zaobserwowano, że centrum aktywne w domenie ISOM ma bardziej otwartą strukturę niż w *Ec*GlmS. C-pętla prawdopodobnie nie zachowuje się dokładnie tak samo jak w *Ec*GlmS. Zaobserwowano również różnice w His-pętli z sąsiadującej podjednostki, gdzie Pro506* w *Ec*GlmS została zastąpiona Ile609* w *Ca*Gfa1, co w efekcie skutkuje wzrost elastyczności His-pętli. Zmiana konformacji wynikająca z różnic w sekwencji His-pętli, stabilizowana jest wiązaniem wodorowym między atomem O Lys606 a atomem N⁶² z helisy CF. Mimo zmian w sekwencji, a tym samym również w konformacji w His-pętli, funkcja His607* z *Ca*Gfa1 (odpowiednik His504* *Ec*GlmS) jest zachowana [Raczyńska i in. 2007]. Ewentualne różnice w mechanizmie katalizowanej reakcji wynikające

ze zmian konformacyjnych, jednoznacznie będzie można wyjaśnić dopiero po otrzymaniu kompletnej struktury *Ca*Gfa1.

2.2.4. Regulacja aktywności syntazy GlcN-6-P

Syntaza GlcN-6-P występuje niemalże we wszystkich znanych organizmach i odgrywa ważna rolę w ich anabolizmie. W związku z tym oczywisty jest fakt, że aktywność katalityczna tego enzymu jest ściśle kontrolowana. Charakter tej regulacji jest w dużym stopniu uzależniony od gatunku gospodarza, z którego pochodzi enzym [Milewski 2002, Durand i in. 2008].

2.2.4.1. Regulacja syntazy GlcN-6-P u prokariotów

Regulacja aktywności GlmS w komórkach E. coli odbywa się na kilku poziomach. Główny mechanizm odbywa się na poziomie regulacji ekspresji genu GLMS. W E. coli enzymy szlaku biosyntezy heksozamin, w tym syntaza GlcN-6-P, kodowane są przez operon glmUS, który z kolei jest transkrybowany dwoma promotorami zlokalizowanymi powyżej sekwencji genu GLMU. Warto tu przybliżyć znaczenie enzymu GlmU, który odpowiada za przekształcanie GlcN-1-P do GlcNAc-1-P, a następnie do UDP-GlcNAc. Geny GLMU GLMS i są W ścisłej koekspresji Plumbridge 1995]. Zaobserwowano, że wewnątrzkomórkowa ekspresja genu GLMS kodującego syntazę GlcN-6-P w komórkach E. coli hodowanych na podłożu zawierającym aminokwasy takie jak: glukozaminę lub N-acetyloglukozaminę jest obniżona. Podobny efekt obserwuje się również przy braku egzogennych aminocukrów. Jest to efekt mutacji lub wewnętrznej indukcji, powodującej (kodującego białka zaangażowane depresję regulonu nag w metabolizm N-acetyloglukozaminy), który jednocześnie stanowi aktywator dla promotora glmU p1. Mechanizm ten na poziomie transkrypcji wciąż jeszcze nie został do końca wyjaśniony [Plumbridge i in. 1993, Milewski 2002].

Dopiero późniejsze obserwacje post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji *GLMS* szerzej wyjaśniają ten mechanizm. Zatem pierwotny transkrypt mRNA *GLMSUS* przez cięcie za pomocą RNazy E przekształcany jest do genu mRNA *GLMS* (Rys. 21). Decydujące znaczenie ma tu stopień stabilizacji powstałego genu, gdyż ze wzrostem transkryptu mRNA *GLMS*, wzrasta również ilość białka GlmS. Do tej pory zaproponowano kilka czynników stabilizujących, w tym m. in. mutacje w genie *PCNB* kodującym polimerazę poly(A) (PAP1) [Mohanty i in. 2006, Joanny i in. 2007]. Jednocześnie Kalamorz i wsp. zaproponowali dwa fragmenty sRNA jako czynniki regulujące ekspresję GlmS: GlmZ [Kalamorz i in. 2007]

i GlmY [Urban i in. 2007]. Stwierdzono, że przy niskim stężeniu GlcN-6-P, transkrypt sRNA *GLMZ* zostaje akumulowany i w efekcie aktywuje translację mRNA genu *GLMS*. Natomiast wysokie stężenie GlcN-6-P powoduje destabilizację sRNA *GLMZ*, a w konsekwencji obniżenie ekspresji *GLMS*. Sposób trawienia sRNA *GLMZ* nie jest całkowicie jasny, jednak przypuszcza się, że główną rolę na tym etapie odgrywa enzym YhgJ. W przypadku drugiego czynnika sRNA *GLMY*, mechanizm regulacji mRNA *GLMS* nie został jeszcze poznany.



Rys. 21. Model regulacji ekspresji GLMS w E. coli przez GLMZ [Kalamorz i in. 2007].

Koleiny mechanizm regulacji syntazy GlcN-6-P, zaobserwowany w u bakterii Gram-dodatnich, wykorzystuje rybozymy jako przełączniki regulujące ekspresję genu *GLMS* (Rys. 22). Struktury te należą do nowej grupy ryboprzełączników. Składają się one z RNA powszechnie występującego w regionie 5'UTP bakteryjnego mRNA. Sekwencja ryboprzełącznika GlmS zlokalizowana jest w mRNA danego białka. Aktywacja ich następuje po związaniu makrocząsteczki GlcN-6-P do specyficznego obszaru w sekwencji rybozymu, w wyniku czego następuje degradacja mRNA. Przerwanie ciągłości sekwencji w otwartej ramce odczytu, w konsekwencji zaburza ekspresję syntazy GlcN-6-P w komórce [Barrick i in. 2004, Winkler i in. 2004, Link i in. 2006, Durant i in. 2008, Xin i in. 2010].



Rys. 22. Ryboprzełącznik jako regulator ekspresji *GLMS* u bakterii Gram-dodatnich [Durand i in. 2008]. Gdy stężenie GlcN-6-P przekracza ilość wymaganą do wzrostu komórek, nadmiarowe cząsteczki GlcN-6-P wiążą się do struktury rybozymu, aktywując go, który w efekcie rozcina mRNA. Gdy stężenie produktu katalizowanej reakcji przez ten enzym jest obniżona, ryboprzekaźniki są nieaktywne, a ekspresja genu *GLMS* zachodzi prawidłowo.

Bakteryjna syntaza GlcN-6-P w warunkach *in vitro* hamowana jest przez produkt GlcN-6-P ($K_i = 0,35$ mM) [Kucharczyk i in. 1990]. Jednakże nie ma to znaczenia fizjologicznego, gdyż otrzymany produkt w sposób ciągły przetwarzany jest przez koleiny enzym w szlaku do GlcN-1-P lub uruchamiane są wcześniej opisane mechanizmy regulujące ekspresję enzymu. Zapobiega to akumulacji GlcN-6-P w komórce do poziomu wywołującego inhibicję. Pojawiły się również hipotezy o obecności w domenie ISOM syntazy GlcN-6-P miejsca regulatorowego różnego od centrum katalitycznego, która nie znalazła jednak dotychczas potwierdzenia [Todorova 2001]. W przypadku syntazy GlcN-6-P pochodzącej z *E. coli* wykluczono możliwość istnienia kontroli poprzez inhibicję końcowym produktem szlaku UDP-GlcNAc [Komfeld 1967]. Jest to cecha wspólna dla wszystkich prokariotycznych syntaz GlcN-6-P.

Ostatnią udowodnioną cechą regulującą aktywność katalityczną prokariotycznej syntazy GlcN-6-P jest zdolność białka do tworzenia różnych form oligomeryzacyjnych. Zależność między aktywnym katalitycznie dimerem i nieaktywnym heksametrem (Rys. 14), wskazuje na allosteryczny mechanizm regulacji typu "morfein". Model ten polega na istnieniu różnych konformacji monomerów, które następnie tworzą zróżnicowane cząsteczki oligomeryczne. W przypadku *Ec*GlmS Mouilleron i wsp. zaobserwowali, że różnice w strukturze odpowiedzialne za tworzenie formy heksamerycznej, pojawiają się na poziomie funkcjonalnego dimeru i dotyczą ułożenia domen GAT. Równowaga pomiędzy formą dimeryczną a heksameryczną *Ec*GlmS, w efekcie reguluje aktywność katalityczną enzymu. Stwierdzono również, że wzrastające stężenie produktu GlcN-6-P przesuwa równowagę w kierunku nieaktywnego heksameru i w ten sposób katalizowana reakcja jest

zatrzymywana. Może to być naturalny mechanizm regulowania aktywności enzymatycznej syntazy GlcN-6-P w komórkach *E. coli* [Bennett i in. 2009, Valerio-Lepiniec i in. 2010, Mouilleron in. 2012, Selwood i in. 2012].

2.2.4.2. Regulacja syntazy GlcN-6-P u eukariotów

W organizmach eukariotycznych obecnie znanych jest kilka czynników regulujących ekspresję syntazy GlcN-6-P na poziomie transkrypcji. W komórkach drożdżowych ekspresja genu *GFA1* jest znacznie zwiększona w obecności α -faktora, czyli feromonu produkowanego i wydzielanego przez haploidalne komórki typu α [Zalkin 1993]. Innym regulatorem transkrypcyjnym w komórkach drożdżowych jest białko fosfatazy Glc7p [Zheng i in. 2000]. W przypadku mysiej syntazy GlcN-6-P stwierdzono, że regiony promotorowe *GFAT1* i *GFAT2* zawierają miejsca wiązania białek regulatorowych SP-1, AP-1 i AP-2 [Sayeski i in. 1997, Yamazaki i in. 2000]. Z kolei region promotorowy *GFAT1* i *GFAT2* ludzkiej syntazy glcN-6-P z komórek ssaczych podlega ścisłej i specyficznej regulacji w zależności od tkanki w której się znajduje [Nerlich i in. 1998]. W przypadku ludzkiej Gfat zaobserwowano, że w większości komórkach ekspresja genu *GFAT1* dominuje nad *GFAT2*, z wyjątkiem komórek nerek [McKnight i in. 1992, Sayeski i in. 1997, Oki i in. 1999, Yki-Järvinen i in. 2001].

W przypadku komórek prokariotycznych powszechny jest mechanizm regulujący syntazę GlcN-6-P z wykorzystaniem ryboprzełączników. Pojawiły się spekulacje, że rybozymy wiążące metabolity mogą również odgrywać rolę w regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych [Sudarsan i in. 2003].

Cechą wspólna dla eukariotycznej syntazy GlcN-6-P jest mechanizm regulacji poprzez sprzężenie zwrotne. W warunkach *in vitro*, produkt końcowy szlaku inicjowanego przez ten enzym, czyli UDP-GlcNAc stanowi silny inhibitor aktywności eukariotycznego enzymu. Mechanizm regulacji produktem końcowym stwierdzono we wszystkich poznanych do tej pory systemach eukariotycznych. Wartość K_i jest zróżnicowana i waha się w zakresie 4 µM - 0,7 mM [Kornfeld 1967, Maia 1994, Smith i in. 1996, Milewski i in. 1999, Broaschat i in. 2002, Czarnecka i in. 2012, Jędrzejczak i in. 2012]. W zależności od pochodzenia enzymu, UDP-GlcNAc wykazuje różny model inhibicji. W przypadku Gfa1 z *Candida albicans* i *Neurospora crassa* dla L-Gln i Fru-6-P jest to inhibicja niekompetytywna [Endo i in. 1970, Milewski i in. 1999, Jędrzejczak i in. 2012]. Natomiast dla enzymu z *Aspergillus nidulans* w przypadku obu substratów - pozakompetytywna [Borgia 1992]. Z kolei

dla syntazy GlcN-6-P z *Blastocladiella emersonii* i z wątroby szczura względem Fru-6-P jest to model inhibicji kompetytywnej, a względem L-Gln – niekompetytywnej [Winterbur i in. 1971, Maia 1994]. Analiza powyższych zależności wskazuje, że eukariotyczna syntaza GlcN-6-P posiada specyficzne miejsce wiązania UDP-GlcNAc, odmienne od centrum aktywnego. Dzięki strukturze krystalograficznej otrzymanej dla domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, dokładnie opisano miejsce wiązania cząsteczki inhibitora (dokładny opis w dalszej części – Rozdział 2.2.2.1) [Raczyńska i in. 2007]. Zaobserwowano również, że wpływ inhibicji UDP-GlcNAc na enzym maleje wraz ze wzrostem stopnia czystości białka. Prawdopodobnie jest to efekt stopniowego usuwania małocząsteczkowych związków podczas procesu oczyszczania białka. Jednym z takich czynników jest Glc-6-P, który zwiększa wrażliwość enzymu na inhibicję przez UDP-GlcNAc. [Miyagi i in. 1971, Borgia 1992, Milewski i in. 1999]. Jednak dokładny mechanizm inhibicji UDP-GlcNAc i wpływu Glc-6-P nie został jeszcze poznany.

Kolejnym sposobem regulacji aktywności katalitycznej na poziomie post-translacyjnym jest fosforylacja przez cAMP-zależną kinazę A (PKA). W większości przypadków syntaz GlcN-6-P z organizmów eukariotycznych, PKA stymuluje wzrost aktywności katalitycznej [Zhou i in. 1998, Milewski i in. 1999, Graack i in. 2001]. Wyjątek stanowi między innymi ludzka rekombinantowa wersja Gfat w warunkach in vitro, w której fosforylacja PKA obniża aktywność enzymatyczną [Chang i in. 2000]. Jednakże efekt redukcji aktywności enzymatycznej w HsGfat nie jest regułą, gdyż w sekwencji aminokwasowej wystękuje kilka miejsc fosforylacji: Ser205, Ser235 (brak w izoformie HsGfat2) i Ser243. Zasugerowano, że regulacja przez PKA prawdopodobnie jest zależna od izoformy enzymu, ponieważ fosforylacja poszczególnych reszt różnie wpływ na aktywność enzymatyczną i tak np. fosforylacja Ser205 blokuje aktywność katalityczną, a fosforylacja Ser243 – zwiększa aktywność enzymu [Chang i in. 2000, Li i in. 2007, Eguchi i in. 2009].

Natomiast w przypadku *Blastocladiella emmersonii* (*Be*Gfa) stwierdzono, że fosforylacja enzymu przez kinazy białkowe, zmienia podatność enzymu na działanie UDP-GlcNAc. Natomiast stan ufosforylowania *Be*Gfa zależy od stadium rozwojowego mikroorganizmu: w postaci cyst – enzym nie jest ufosforylowany, a w postaci pleśni (forma przetrwalnikowa) – enzym jest ufosforylowany. W rezultacie kinazy białkowe regulują aktywność katalityczną *Bs*Gfa, a w konsekwencji ilość powstającego produktu, który stanowi podstawowy budulec chityny [Frisa i in. 1982, Etchebehere i in. 1989, Maia 1994]. Ponadto wykazano, iż fosforylacja syntazy GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans* wpływa
na transformację morfologiczną komórek drożdżaka. Obniżenie zdolności komórek *C. albicans* do transformacji morfologicznej z formy drożdżowej do mycelialnej oraz ubytek zawartości chityny w ścianie komórkowej są spowodowane utratą miejsca fosforylacji syntazy GlcN-6-P. W syntazie GlcN-6-P z *C. albicans* zidentyfikowano jednoznacznie resztę Ser208 jako miejsce fosforylacji przez kinazę białkową typu A, a ufosforylowanie tej reszty wpływa stymulująco na aktywność amidohydrolazową GAT i w konsekwencji na szybkość reakcji katalizowanej przez cały enzym. Analogiczne miejsce fosforylacji określono także w enzymie ludzkim i mysim [Milewski i in. 1999, Gabriel i in. 2004, Olchowy i in. 2007].

Kolejnym czynnikiem regulującym aktywność katalityczną drożdżowej syntazy GlcN-6-P jest aminopeptydaza metioniny (MetAP). MetAP jest to enzym katalizujący odcięcie reszty Met od N-końca sekwencji aminokwasowej. W przypadku enzymów zawierających na N-końcu sekwencji reszty istotne dla katalizowanej reakcji, np. Cys1 w *Ca*Gfa1, odcięcie Met staje się inicjatorem dla katalizowanej reakcji. Udowodniono, że po zahamowaniu aktywności MetAP, wzrost komórek drożdżowych jest spowolniony, co prawdopodobnie jest konsekwencją obniżenia aktywności syntazy GlcN-6-P. W związku z powyższym MetAP może stać się pośrednim celem molekularnym w hamowaniu aktywności enzymatycznej syntazy GlcN-6-P [Dummitt i in. 2005].

Zaobserwowano również kilka dodatkowych czynników regulacji aktywność syntazy eukariotycznej, charakterystycznych tylko dla specyficznych enzymów w zależności od źródła pochodzenia. Syntaza GlcN-6-P z wątroby szczura podlega allosterycznej aktywacji przez witaminy K1 i K3 [Sharaev i in. 1981], a przeciwny efekt zaobserwowano w obecności cholesterolu i hydrokortyzolu [Sharaev i in. 1988]. Jak dotychczas nie poznano molekularnych podstaw takich zależności, ani ich fizjologicznego znaczenia.

2.2.5. Inhibicja aktywności eukariotycznej syntazy GlcN-6-P przez UDP-GlcNAc

2.2.2.1. Miejsce wiązania UDP-GlcNAc przez Gfa1 C. albicans

Jednym z miejsc zaproponowanych jako miejsce wiązania UDP-GlcNAc był fragment łańcucha peptydowego w komórkach eukariotycznych, liczący od 60 do 100 aminokwasów i odpowiedzialny za wydłużenie łańcucha w stosunku do enzymu prokariotycznego. Badania prowadzone przez Olchowego i wsp. zaprzeczyły tej hipotezie, ponieważ udowodniono, że fragment 218-283 łańcucha aminokwasowego *CaGFA1*, w żaden sposób nie uczestniczy w regulacji allosterycznej *Ca*Gfa1 [Olchowy i in. 2007]. Jednocześnie w badaniach tych zasugerowano, że cząsteczka fizjologicznego inhibitora wiąże się na powierzchni domeny ISOM i jest oddalona od miejsca wiązania substratów: L-Gln i Fru-6-P [Endo i in. 1970, Milewski i in. 1999, Olchowy i in. 2007]. Taką samą lokalizację miejsca wiązania dla inhibitora w przypadku ssaczej syntazy GlcN-6-P zaproponował Chou [Chou 2004].

Po otrzymaniu struktury krystalograficznej domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z C. albicans z UDP-GlcNAc, potwierdzono że inhibitor wiąże się do białka w obrębie domeny izomerazowej, w odległości 10Å od miejsca wiązania Fru-6-P (Rys. 23 A i B) [Raczyńska i in. 2007]. Dokładny mechanizm inhibicji przez UDP-GlcNAc wciąż jeszcze nie został do końca poznany. Z ostatnich badania zespołu Badet określono wpływ poszczególnych elementów cząsteczki inhibitora na enzym. UDP-GlcNAc jest cząsteczką o złożonej strukturze, a poszczególne jej części pełnią różne funkcje [Assrir i in. 2014]. Pierścień uracylu UDP-GlcNAc wchodzi do przestrzeni uformowanej przez motyw βαβαβ i całkowicie odpowiada za wiązanie w kieszeni białkowej. Idealne dopasowanie powierzchni kieszeni do grupy uracylowej odpowiadają za specyficzność wiązania UDP-GlcNAc, która uwarunkowana jest m. in. przez reszty Gly445 i Gly461. Natomiast część N-acetyloglukozaminowa cząsteczki inhibitora jest skierowana na zewnątrz białka i to właśnie ona odpowiada za inhibicję enzymu. Pomiędzy grupą uracylową a glukozaminową funkcję łącznika pełnią ugrupowania cukrowe. Inhibitor wiąże się do specyficznych sekwencji, zakonserwowanych ewolucyjnie w wielu znanych sekwencjach eukariotycznej syntazy GlcN-6-P np. z Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Candida albicans, z mysich i ludzkich komórek. Natomiast w przypadku enzymu pochodzenia prokariotycznego sekwencje potencjalnie odpowiedzialne za wiązanie UDP-GlcNAc są zmienione (Rys. 10) [Raczyńska i in. 2007, Assrir i in. 2014].



Rys. 23. (A) Obszar wiązania UDP-GlcNAc w domenie ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*. Pierścień uracylowy inhibitora wchodzi do kieszeni białkowej utworzonej w ramach motywu βαβαβ. (B) Szczegółowe przedstawienie oddziaływań inhibitora UDP-GlcNAc z poszczególnymi aminokwasami [Raczyńska i in. 2007].

Dno kieszeni białkowej, do której wiąże się pierścień uracylu inhibitora, tworzą reszty Gly474 i Val476. Boczne ściany wneki białkowej formowane sa przez resztę Ser484, łańcuch boczny Thr487 i łańcuch główny reszt aminokwasowych w pozycjach 489-491 oraz His492. Brzeg kieszeni białkowej, tworzony przez łańcuch główny reszt aminokwasowych 489-491 (silnie zakonserwowany również w sekwencji z Caenorhabditis elegans), jest niemal płaski i odpowiada płaskiemu kształtowi pierścienia uracylu. Płaszczyzna określona przez atomy od 489 C^{α} do 491 C^{α} jest równoległa do płaszczyzny pierścienia uracylu, co warunkuje dopasowanie się pierścienia pirymidynowego we wnętrzu kieszeni białkowej. Na uwage w szczególności zasługuje obecność Gly490, której w E. coli odpowiada Ala388. W prokariotycznym enzymie występowanie grupy metylowej z Ala388 powoduje przesunięcie łańcucha bocznego do wolnej przestrzeni kieszeni białkowej o ok. 1.5Å oraz usztywnienie całej struktury. Podobna sytuacja jest z Gly474 w CaGfa1 i odpowiadającej jej Ala372 w EcGlmS. Atom azotu N3 uracylu UDP-GlcNAc tworzy dwa wiązania wodorowe: z grupa hydroksylowa Thr487 (odległa o 2,8Å) i tlenem z grupy karboksylowej Ser484 (3,1Å). Thr487 w sposób sprzężony pełni rolę akceptora wiązania wodorowego N3, poprzez tworzenie kolejnego wiązania wodorowego, między tlenem karboksylowym Met483 (2,7Å), a wodorem z grupy hydroksylowej Thr487. Wystający fragment cząsteczki inhibitora podtrzymywany jest przez przylegającą do niej pętlę składającą się z reszt aminokwasowych znajdujących się w pozycjach 381-383. Dodatkowo trzy atomy z grup fosforanowych inhibitora tworzą wiązania z resztami His492 i Arg372. Wystający z kieszeni pierścień cukrowy UDP-GlcNAc tworzy jedno wiązanie wodorowe z resztą Gly384 [Raczyńska i in. 2007].

2.2.5.1. Zmiany struktury białka po związaniu UDP-GlcNAc

Analizując struktury krystalograficzne wolnej i związanej z UDP-GlcNAc domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* zaobserwowano, niewielkie zmiany wywołane związaniem inhibitora i dotyczące tylko bliskiego obszaru od miejsca wiązania cząsteczki UDP-GlcNAc. Główna zmiana odnosi się do położenia łańcucha bocznego reszty Trp388, znajdującej się na końcu pętli 381-388, do której równolegle przylegają grupy fosforanowe i pierścień cukrowy UDP-GlcNAc (Rys. 24). Przesunięcie reszty Trp388 po związaniu inhibitora jest wynikiem jego pośredniego kontaktu z atomem tlenu O2 rybozy, poprzez cząsteczki wody. Warto również zauważyć, że w *Ec*GlmS pętla 381-388 przyjmuje różne konformację, będące efekt zmian w sekwencji w ramach segmentu tych 8 aminokwasów, w tym głównie Gly384 z *Ca*Gfa1 na Pro w *Ec*GlmS.



Rys. 24. Obszar wiązania UDP-GlcNAc w domenie ISOM CaGfa1 [Raczyńska i in. 2007]. Przedstawione różnice wywołane związaniem UDP-GlcNAc: struktura ISOM CaGfa1 bez inhibitora – żółty, struktura ISOM CaGfa1 z inhibitorem - czerwona, cząsteczka UDP-GlvcNAc _ zielona. Największe zmiany konformacyjne związane przyłączeniem UDP-GlcNAc Z zaobserwowano w Trp388.

Ponadto nie odnotowano istotnych zmian w odległości między podjednostkami i nie stwierdzono zmian dotyczących trzecio- i czwartorzędowej struktury domeny ISOM, ani żadnych istotnych zmian w konformacji centrum aktywnego enzymu [Olchowy i in. 2007]. Należy jednak zauważyć, że niektóre efekty, wywołane związaniem inhibitora, mogły nie zostać wykryte, ze względu na stosunkowo niską rozdzielczość struktury domeny ISOM enzymu niezwiązanej z inhibitorem [Raczyńska i in. 2007].

Z literatury wiadomo, że UDP-GlcNAc nie oddziałuje bezpośrednio na centrum aktywne enzymu. Inhibicja aktywności enzymu przez UDP-GlcNAc odbywa się poprzez hamowanie hydrolizy L-Gln, a w konsekwencji nie powstaje GlcN-6-P. Jednak w wyizolowanej pojedynczej domenie GAT nie obserwuje się inhibicji, podobnie również w domenie ISOM brak wpływu na izomerację cukru [Olchowy i in. 2007]. W konsekwencji, molekularne podstawy mechanizmu inhibicji aktywności syntazy GlcN-6-P są widoczne tylko w przypadku pełnej struktury enzymu. Cząsteczka inhibitora wiąże się do domeny ISOM enzymu w miejscu odległym o ponad 10Å od centrum aktywnego. Można przypuszczać, że inhibitor oddziałuje z obiema domenami enzymu, chociaż do tej pory nie zostało to potwierdzone w żadnych badaniach strukturalnych. Najmniejsza zaobserwowana odległość między inhibitorem a domeną GAT enzymu wynosi 10Å i jest to przestrzeń między glukozaminową częścią UDP-GlcNAc a ok. 70-aminokwasowym insertem, charakterystycznym tylko dla enzymu eukariotycznego (w CaGfa1 fragment ten znajduje się w pozycjach 218-283). Tak duża odległość między domeną GAT a inhibitorem uniemożliwia bezpośredni kontakt, który byłby możliwy dopiero w wyniku ruchu międzydomenowego, ale to z kolei mogłoby zakłócić przepływ pośrednich produktów reakcji, a tym samym ograniczać dostęp do miejsc aktywnych enzymu. Niestety otrzymanie struktury krystalograficznej domeny ISOM CaGfa1, nie dało wystarczającej ilości danych,

które umożliwiłyby określenie mechanizmu inhibicji aktywności enzymu przez UDP-GlcNAc [Raczyńska i in. 2007].

Można przypuszczać, że proces inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc wiaże się ze zmianami w zachowaniu makrocząsteczki, które nie są widoczne na modelach statycznych. W celu identyfikacji tych różnic, przeprowadzono symulacje dynamiki molekularnej domeny ISOM *Ca*Gfa1 w stanie wolnym i związanej z UDP-GlcNAc [Miszkiel i in. 2011]. Z analizy porównawczej otrzymanych trajektorii wynika, że po związaniu inhibitora dochodzi do znacznego ograniczenia elastyczności kilku funkcjonalnie istotnych regionów białka. Związanie cząsteczki UDP-GlcNAc zmniejsza ruchliwości C-pętli (znajdującej się na C-końcu białka), która stanowi istotny element centrum katalitycznego domeny ISOM oraz uczestniczy w tworzeniu kanału, transportującego cząsteczki amoniaku między dwiema domenami enzymu. Z wcześniejszych doniesień stwierdzono, że cztery reszty aminokwasowe zlokalizowane na C-końcu enzymu, odpowiadają za komunikację i sygnalizację między domeną GAT i ISOM, a ich usuniecie silnie zakłóca oba te procesy. Z tego też powodu można przypuszczać, że usztywnienie C-końca (Lys705, Ala706, Val709, Thr710, Val711 i Gln712) enzymu, w wyniku związania inhibitora, w efekcie zaburza komunikację między domenami. Mechanizm odpowiedzialny za zmniejszenie elastyczności C-pętli w wyniku związania inhibitora, nie został do tej pory wyjaśniony. Jednakże wiadomo, że w kontakcie C-pętli z inhibitorem pośredniczą inne reszty aminokwasowe. Stwierdzono, że w wyniku związania cząsteczki UDP-GlcNAc, struktury pętli 450-455, 475-481 i 498-503, w stosunku do struktury białka bez inhibitora, również są usztywniane w pewnej odległości od miejsca aktywnego enzymu. Utrata elastyczności w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia liczby miejsc kontaktu między pętlami 450-455 i 498-503 a C-pętla. Natomiast jednoczesne zwiększenie liczby miejsc kontaktu z drugim monomerem enzymu, dowodzi, że ruchy C-petli są skierowane w stronę sąsiedniego monomeru. Przez takie ułożenie i konformację C-pętli, utrudniona jest sygnalizacja pomiędzy domeną GAT i ISOM enzymu, wpływając w ten sposób na aktywność katalityczną [Miszkiel i in. 2011].

W efekcie związania cząsteczki inhibitora, dochodzi do zwiększenia odległości między monomerami tworzącymi dimer, a następnie tetramer enzymu eukariotycznego. Związanie UDP-GlcNAc, w odniesieniu do enzymu niezwiązanego z inhibitorem, wywołuje oddalenie się od siebie podjednostek dimeru o 0,2-0,3 nm, co w konsekwencji wpływa na ruchliwość reszt aminokwasowych stanowiących powierzchnię kontaktu między monomerami. Odsunięcie się od siebie poszczególnych monomerów prawdopodobnie powoduje odsunięcie reszty His607 w *Ca*Gfa1 od centrum aktywnego, przez co zakłócony

jest mechanizm katalizowanej reakcji. Wyniki dotyczące zmian His607 po związaniu UDP-GlcNAc otrzymano na podstawie analizy fragmentu enzymu, którego strukturę wymodelowano na podstawie białka *Ec*GlmS, przez co są one obarczone sporą dozą niepewności. Jest to proponowany mechanizm inhibicji przez UDP-GlcNAc [Miszkiel i in. 2011].

3. CEL PRACY

Celem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej była konstrukcja i określenie właściwości kilku wersji rekombinantowych syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, co miało służyć uzyskaniu istotnych informacji strukturalnych i funkcjonalnych o tym białku.

W szczególności zakładano:

- skonstruowanie rekombinantowej wersji syntazy GlcN-6-P z C. albicans z wewnętrznym mikro fragmentem oligoHis, w którym układ 6-His tworzy się dopiero po zwinięciu białka w strukturę przestrzenną. Zakładano, że taka wersja białka będzie różnić się w stopniu minimalnym od białka typu dzikiego, a z drugiej strony będzie mogła zostać oczyszczona do stopnia bliskiego homogenności z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa.
- określenie warunków krystalizacji syntazy GlcN-6-P z C. albicans i jej pochodnych, w celu otrzymania kryształów o wysokiej rozdzielczości, umożliwiającej wykonanie pomiarów dyfrakcyjnych i zebranie danych do dalszej analizy.
- określenie roli i znaczenia reszt aminokwasowych wchodzących w skład kieszeni białkowej syntazy GlcN-6-P z C. albicans wiążącej fizjologiczny inhibitor UDP-GlcNAc.
- określenie roli i znaczenia reszt aminokwasowych biorących udział w tworzeniu wiązań między poszczególnymi podjednostkami tetramerycznej formy syntazy GlcN-6-P z C. albicans.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Materiały podstawowe i aparatura

4.1.1. Szczepy drobnoustrojów

SZCZEP	GENOTYP	POCHODZENIE	OPIS
<i>E. coli</i> TOP 10F'	F ⁻ , mcrA, mrr, hsdRMS, endA, mcrBC, φ80lacZΔM15, recA, Tet ^R	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, PG	Szczep wykorzystywany do namnażania plazmidowego DNA oraz do klonowania molekularnego. Może być używany również do nadekspresji białek rekombinantowych w układzie arabinozowym pBAD.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsd</i> S _B (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacZY</i> (DE3), pLysS, Cam ^R	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, PG	Szczep stosowany do nadekspresji genów rekombinantowych w systemie Tabora-Studiera. Produkowany przez niego lizozym, specyficznie hamuje aktywność polimerazy RNA faga T7, utrzymując ją na określonym niskim poziomie. Dzięki czemu ekspresja genu plazmidu rekombinantowego jest zahamowana do czasu indukcji, poprzez dodanie IPTG lub laktozy.
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	F- <i>ompT, hsd</i> SB(rB - mB), gal dcm (DE3),pLysS RARE (CamR)	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, PG	Szczep wykorzystywany do nadekspresji genów w systemie Tabora-Studiera. Produkowany przez niego lizozym, specyficznie hamuje aktywność polimerazy RNA faga T7, utrzymując ją na określonym niskim poziomie. Natomiast ekspresja genu plazmidu rekombinantowego jest zahamowana do czasu indukcji, poprzez dodanie IPTG lub laktozy.
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLacI	F- <i>omp</i> T hsd SB(rB- mB-) gal dcm lacY1 (DE3), pLacI RARE (CmR)	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, PG	Szczep używany do nadekspresji genów rekombinantowych w systemie Tabora-Studiera. Posiada uszkodzony gen permeazy laktozy - <i>lac</i> Y, co umożliwia płynną regulację ekspresji rekombinowanych białek stężeniem IPTG. Zawiera również plazmid kodujący charakterystyczny dla organizmów eukariotycznych tRNA.

Tab. 1. Wykaz szczepów Escherichia coli wykorzystywanych w badaniach.

4.1.2. DNA plazmidowe

Tab. 2. Wykaz plazmidów wykorzystywanych w badaniach.

PLAZMID	WIELKOŚĆ	POCHODZENIE	OPIS
pET23b	3665 pz	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, PG	Plazmidy z serii pET (<i>ang. <u>Plasmid for</u> <u>Expression</u>) są finalnymi wektorami ekspresyjnymi dla klonowanych genów, gdzie pod kontrolą silnego promotora ø10 faga T7, nie są rozpoznawane przez bakteryjną polimerazę RNA. Plazmid pET23b posiada miejsce wielokrotnego klonowania, terminator transkrypcji oraz gen oporności na ampicylinę Jest jednym z najwydajniejszych wektorów ekspresji w komórkach bakteryjnych w układzie Tabora-Studiera.</i>

pET23b- <i>CaGFA1</i>	5772 pz	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, PG	Bakteryjny wektor ekspresyjny pET23b, zawiera gen syntazy glukozamino-6-fosforanu z <i>C. albicans (Ca</i> GFA1) wklonowany w miejsca <i>Nde</i> I oraz <i>Bam</i> HI [Sachadyn i in. 2000]. Zapewnia wydajną ekspresję spod promotora T7. Posiada terminator transkrypcji oraz gen oporności na ampicylinę (Rys. 25).
рЕТ23b- <i>CaGFA1</i> (рЕТ23b- <i>CaGFA1-*</i>) 5772 рг		Plasmidy otrzymane samodzielnie	Bakteryjny wektor ekspresyjny pET23b, zawierający gen syntazy GlcN-6-P z <i>C. albicans</i> po mutagenezie ukierunkowanej, podczas której wymieniano poszczególne reszty aminokwasowe (dokładny opis w Tab. 10).



Rys. 25. Wizualizacja plazmidu pET23b-CaGFA1, wykonana za pomocą programu SnapGene.

4.1.3. Wzorce masowe

Tab. 3.	Wykaz	markerów	wykorzys	stywanych	w ba	adaniac	h
	2		5	5			

MARKER	MASA CZĄSTECZKOWA			
DNA do elektroforezy akrylamidowej				
Marker GeneRuler 1kb DNA Ladder	10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3500; 3000; 2500;			
(Thermo Scientific)	2000; 1500; 1000; 750; 500; 250 [pz]			
Marker DNA M10kpz	10037; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2500; 2000;			
(DNA Gdańsk)	1500/1517; 1000; 800; 600; 400; 200 [pz]			

Białkowy do SDS-PAGE					
Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)	250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]				
Białkowy do Native-PAGE					
Tyreoglobulina	669 kDa				
Apoferrytyna	443 kDa				
β-amylaza	200 kDa				
Transferyna	80 kDa				
BSA (albumina wołowa)	66 kDa				
The NativeMark TM Unstained Protein Standard (Invitrogen, Life Technologies)	1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]				
Białkowy do filtracji żelowej (Superdex 200 10/300GL)					
Thyroglobulina	669 kDa				
β-amylaza	200 kDa				
Dehydrogenaza alkoholowa	150 kDa				
BSA (albumina wołowa)	66 kDa				
Anhydraza węglanowa	29 kDa				

4.1.4. Aparatura

Tab. 4. Wykaz sprzętu wykorzystywanego w badaniach. ¹⁾ Sprzęt będący wyposarzeniem laboratorium Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

APARAT	TYP/FIRMA
termocykler	Eppendorf Mastercycler Gradient
aparat do elektroforezy agarozowej Delfin	DNA Gdańsk, Polska
aparat do elektroforezy białkowej BlueStart	DNA Gdańsk, Polska
transformator Power Pac Basic	Bio – Rad., UK
spektrofotometr Genesis 20	TermoSpectronic, USA
Transiluminator	Vilber Lourmat, Francja
waga WPS 720/C/2	Radwag, Polska
waga analityczna	Zakłady mechaniki Precyzyjnej ZP Gdańsk, Polska
sterylizator SP 32E	Wadem, Polska
wirówka Centifuge 5415R, 24X3,75g	Eppendorf, Niemcy
wirówka Sigma 3 – 18 K	PolyGen, Niemcy
pH – metr CP – 551	Elmetron, Polska
kołyska laboratoryjna KL – 942	JWE Lectronic
worteks Lab Dancer	IKA
dezintegrator ultradźwiękowy	Sonifier W – 250D, Niemcy
inkubator powietrzny z wytrząsaniem Unitron	Infors HT, Szwajcaria
cieplarka CO ₂ Water – Jacketed Incubator	Nuaire TM IR Autoflow
łaźnia wodna Waterbaht Type 356	Unipan, Polska
łaźnia wodna MML 547	AJL electronic
mieszadełko magnetyczne MM 5	ATM

filtry Amicon® Ultra-15	Milipore
aparat FPLC z detektorem UPC-900	ÄKTA, Amersham Biosciences, USA
kolumna Superdex 200 10/300GL	GE Healthcare
kolumna ResourceQ	GE Healthcare
kolumna Ni ²⁺ -IDA-agaroza	Novagen
kolumna HiTrap Desalting	GE Healthcare
spektrofotometr do pomiaru dynamicznego rozpraszania światła (DLS) ¹⁾	Zetasizer, Malvern Instruments Ltd.
robot do krystalizacji biomolekuł ¹⁾	Gryphon, Art Robbins
mikroskop stereoskopowy z polaryzacją 1)	Olympus SZ61
mikroskop stereoskopowy z polaryzacją	Motic SMZ-168

4.2. Podłoża i warunki hodowli

4.2.1. Podłoża

Tab. 5. Wykaz podłoży bakteryjnych wykorzystywanych w badaniach. Ilości składników LA i LB na 100 ml wody destylowanej. Pożywki po przygotowaniu sterylizowano w autoklawie w 120°C przy ciśnieniu 1,5 atm. przez 30 minut. Dodatki dodawano do sterylnych pożywek tuż przed hodowlą bądź w trakcje (C_k – końcowe stężenie dodatku w pożywce).

PODŁOŻE	SKŁAD		
LB	1g NaCl, 0,5g ekstrakt drożdżowy, 1g pepton		
LA	1g NaCl, 0,5g ekstrakt drożdżowy, 1g pepton, 1,5 g agar		
DODATKI DO PODŁOŻY			
Ampicylina (100 mg/ml wody), $C_k = 100 \ \mu g/ml$			
Tetracyklina (100 mg/ml etanolu), $C_k = 100 \ \mu g/ml$			
Chloramfenikol (34 mg/ml etanolu), $C_k = 34 \ \mu g/ml$			
IPTG (24 mg/ml wody)			
Laktoza			

4.2.2. Hodowla w podłożu płynnym

Hodowlę bakteryjną *E. coli* prowadzono w podłożu płynnym LB (z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku, jeżeli badany szczep zawierał plazmid z genem oporności na dany antybiotyk), w inkubatorze powietrznym z wytrząsaniem 180 rpm w temperaturze 37°C lub 30°C, przez określony czas. Hodowlę zaszczepiano komórkami pobranymi z innej hodowli (z podłoża stałego) lub poprzez dodatek wcześniej przygotowanego inokulum (z ok. 17 godz. hodowli płynnej).

4.2.3. Hodowla na podłożu stałym

Hodowlę bakteryjną *E. coli* prowadzono na podłożu stałym, wylanym na płytkach Petriego, w cieplarce w temperaturze 37°C przez określony czas. W przypadkach, gdy szczep zawierał plazmid z genem oporności na antybiotyk, do podłoża o temperaturze ok. 60°C, tuż przed wylaniem na płytki, dodawano odpowiedni antybiotyk.

4.3. Techniki izolacji, charakterystyki i obróbki DNA

4.3.1. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforezę w zależności od celu i wielkości rozdzielanego materiału prowadzono w 1-2% żelach agarozowych w buforze 1 x TAE przy napięciu 5-10 V na 1 cm długości żelu. Rozwinięty żel obserwowano w świetle UV o długości fali $\lambda = 312$ nm.

Przygotowanie żelu:

Zawiesinę odpowiedniej ilości agarozy w buforze 1 x TAE podgrzano, w celu całkowitego rozpuszczenia. Następnie wrzący klarowny roztwór studzono do ok. 60°C i dodawano 4 µl roztworu bromku etydyny (0,5 µg/ml) lub 2 µl barwnika GelRed Nucleic Acid (10 x stężony). Całość dokładnie mieszano i wylewano na płytkę aparatu (z wcześniej przygotowanymi grzebieniami). Po kilku minutach, płytkę z zastygniętym żelem umieszczano w aparacie do elektroforezy. Następnie do aparatu dodawano bufor 1 x TAE, aż do zakrycia całej powierzchni żelu.

Nanoszenie próbek:

Próbki DNA mieszano z buforem obciążającym w stosunku 10:1, jednak nie mniej niż 2 μl buforu na próbę. Tak przygotowane próby nanoszono pipetą bezpośrednio do studzienki.

- Agaroza (Promega)
- Roztwór bromku etydyny (1 mg/ml wody)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium)

0.05
025 g
8 g
,48 g
10 ml
4,2 g
,7 ml
10 ml
00 ml

4.3.2. Izolacja DNA

4.3.2.1. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli płynnej

Izolację plazmidowego DNA o wysokiej czystości w małej skali z hodowli płynnej wykonywano zgodnie z procedurą zawartą w zestawie "Gen Elute Plasmid Miniprep Kit" (Sigma). Jako roztworu do elucji DNA użytwano 50 μl jałowej H₂O_{dest}. Otrzymywany przesącz zawierał wyizolowany materiał DNA, który przechowywano w temp. -20°C.

Materiały – dostępne komercyjnie w zestawach "Gen Elute Plasmid Miniprep Kit" (Sigma).

4.3.2.2. Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego

Fragmenty DNA z żelu agarozowego izolowano zgodnie z procedurą zawartą w zestawie "Gel-Out" (A&A Biotechnology, Polska). Jako roztworu do elucji DNA używano 30 μl jałowej H₂O_{dest}. Otrzymywany przesącz zawierał wyizolowany materiał DNA, który przechowywano w temp. -20°C.

Materiały - dostępne komercyjnie w zestawach "Gel-Out" (A&A Biotechnology, Polska).

4.3.3. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcje trawienia DNA endonukleazami restrykcyjnymi prowadzano w odpowiednich buforach do trawienia, przez 15 – 30 min., w temperaturze optymalnej dla działania enzymu. Przy jednoczesnym trawieniu dwoma enzymami dobierano optymalne warunki buforowe wspólne dla obu z nich. Uzyskiwany produkt poddawano elektroforezie agarozowej (Materiały i Metody 4.3.1). Wyniki obserwowano w świetle lampy UV na transluminatorze. Jako kontrolę dla analizy restrykcyjnej otrzymanych rekombinantów, przeprowadzano trawienie restrykcyjne pET23b-*CaGFA1* (Rys. 26).

Enzymy restrykcyjne wykorzystywane w pracy:

DpnI (FD1703, Thermo Scientific) EcoRI (FD0274, Thermo Scientific) BamHI (FD0054, Thermo Scientific) SspI (FD0774, Thermo Scientific) NdeI (FD0583, Thermo Scientific) XhoI (FD0694, Thermo Scientific)

Preferowany bufor: FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific)

Skład mieszanin trawienia restrykcyjnego DNA matrycowego:

*Dpn*I [10U/µl]

Objętość mieszaniny

	Ilość
Woda	4 µl
Bufor FastDigest Greer Buffer (10x)	5 µl
DNA – produkt PCR	40 µl

Tab. 6. Mieszanina trawienia restrykcyjnego produktu PCR. Czas trawienia restrykcyjnego to 15 min w 37°C.

1 μl

50 µl

Skład mieszanin trawienia restrykcyjnego plazmidu pET23b-*CaGFA1* i jego pochodnych:

Tab. 7. Mieszanina trawienia restrykcyjnego plazmidu pET23b-*CaGFA1* i jego pochodnych. Czas trawienia restrykcyjnego to 15 min w 37°C.

	<i>Eco</i> RI	Bam HI	NdeI/ BamHI	SspI	Ndel/ Xhol
Woda	12 µl	12 µl	11 µl	12 µl	11 µl
Bufor FastDigest Greer Buffer(10x)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Plazmid	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Enzym rest.	1 µl	1 µl	1/1 µl	1 µl	1/1 µl
Objętość mieszaniny	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl



Rys. 26. Symulacja trawienia restrykcyjnego plazmidu pET23b-*CaGFA1*:

- M marker (10000; 9000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2000; 1000; 900; 800; 700; 600; 500; 300; 200; 100 [pz])
- 1 pET23b-*CaGFA1* trawiony *Eco*RI (3978, 1296 i 498 [pz])
- 2 pET23b-CaGFA1 trawiony BamHI (5772 pz)
- 3 pET23b-*CaGFA1* trawiony *Nde1/Bam*HI (3626 i 2146 [pz])
- 4 pET23b-CaGFA1 trawiony SspI (4239; 1402; 131 [pz])
- 5 pET23b-CaGFA1 trawiony NdeI/XhoI (3586; 2186 [pz])

Symulacja wykonana w programie PlasmaDNA.

4.3.4. Ligacja

Skład mieszaniny ligacyjnej:

Tab. 8. Mieszanina ligacyjna. Reakcję ligacji przeprowadzano w 16°C przez 12 godz.

	Ilość	
DNA	5 µl	15 µl
Bufor (10x)	2 µl	2 µl
ATP	0,8 µl	0,8 µl
Woda jałowa	11,2 µl	1,2 µl
DNA ligaza faga T4 (5 U/µl)	1 µl	1 µl
Objętość mieszaniny	20 µl	

Materiały:

- Bufor (B69, Thermo Scientific)
- ATP (R0441, Thermo Scientific)
- DNA ligaza faga T4 (EL0011, Thermo Scientific)

4.3.5. Amplifikacja fragmentu DNA CaGFA1-*

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Tab. 9. Mieszanina reakcji PCR.

	Ilość
Woda	34,3 µl
Bufor Hypernova (x10)	5 µl
MgCl ₂ (50mM)	3,4 µl
dNTPs (2mM)	5 µl
Starter CaGfa1m (50 pmol/µl)	0,4 µl
Starter CaGfa1k (50 pmol/µl)	0,4 µl
Matryca	1 µl
Polimeraza DNA Hypernova (2U/µl)	0,5 µl
Objętość końcowa	50 µl

Matryce i startery:

Tab. 10. Zestawienie danych dotyczących przeprowadzonych mutagenez w Gfa1 z *C. albicans*: I – w celu wprowadzenia mikro fragmentu oligoHis, powstającego w strukturze 3D; II – w miejscu wiązania inhibitora UDP-GlcNAc; III – w obszarach kontaktów między poszczególnymi podjednostkami, odpowiedzialnych za tworzenie struktury oligomerycznej białka. Zmiany genetyczne wprowadzane w jednym kroku są zaznaczone jednym kolorem. Docelowo wymieniany nukleotyd jest podkreślony. W nazwach rekombinantowych plazmidów wymienione reszty zaznaczyłam wg kolejności wprowadzania zmian. Natomiast w dalszej części wymienione reszty oznaczam wg kolejności sekwencji: *CaGFA1-K568HS569H, CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* i *CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A*..

	Matryca	Startery	Ta	Produkt	Uwagi	
	I. CaGFA1-K568HS569H					
1.	pET23b-CaGFA1	<i>Ca</i> Gfa1-K568HS569Hm: 5'P- <mark>CACCAC</mark> TTATTATTATTAGGTAGAGGTTATCAATTTGC 3' <i>Ca</i> Gfa1-K568HS569Hk: 5'P-TTGATCATTCAATGAACTATTACATAAATC 3'	53°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>K568HS569H</i>	Lys568 \rightarrow His 5' <u>AAA</u> 3' \rightarrow 5' <u>CAC</u> 3' Ser569 \rightarrow His 5' <u>TC</u> T 3' \rightarrow 5' <u>CA</u> C 3'	
		II. CaGFA1-G474LT487IG490L	LH492F			
1.	pET23b-CaGFA1	<i>Ca</i> Gfa1-H492Fm: 5'P-AATGCTGGGCCAGAAATTGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-HH492Fk: 5'P-AATA <u>AA</u> AACCCCACAATGGG 3'	58°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>H492F</i>	His492 \rightarrow Phe 5' <u>CA</u> T 3' \rightarrow 5' <u>TT</u> T 3'	
2.	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>H492F</i>	<i>Ca</i> Gfa1-T487Im: 5'P-AGACAA <mark>ATC</mark> CATTGTGGGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-T487Ik: 5'P-AGACATTGAAGAACCAACAGAG 3'	62°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T4871</i>	Thr487 \rightarrow Ile 5'A <u>C</u> C 3' \rightarrow 5'A <u>T</u> C 3'	
3.	pET23b-CaGFA1- H492F-T487I	<i>Ca</i> Gfa1-G490Lm: 5'P-AATBCTGGGCCAGAAATTGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-G490Lk: 5'P-AATAAAAACCACAATGGATTTGTC 3'	58°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T487I-</i> <i>G490L</i>	Gly490 \rightarrow Leu 5' <u>GG</u> G 3' \rightarrow 5' <u>CT</u> G 3'	
4.	pET23b- <i>CaGFA1-</i> H492F-T487I- G490L	<i>Ca</i> Gfa1G474Lm: 5' P-AACTCTGTTGGTTCTCAATGTC 3' <i>Ca</i> Gfa1G474Lk: 5' P-AACGATAAGAACAGTTAAAGCTCC 3'	57°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T487I-</i> <i>G490L-G474L</i>	Gly474 \rightarrow Leu 5' <u>GG</u> T 3' \rightarrow 5' <u>CT</u> T 3'	

	III. CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A				
1.	pET23b-CaGFA1	<i>Ca</i> Gfa-D524Am: 5'P-CTTTATCTAATGCTTCTATTTCCAGAAAGGG 3' <i>Ca</i> Gfa1D524Ak: 5'P-AAAGGGCAAACATCACCAAGGC 3'	55°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> D524A	Asp524 → Ala 5'G <u>A</u> T 3' → 5'G <u>C</u> T 3'
2.	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>D524A</i>	<i>Ca</i> Gfa1-S525AS527Am: 5'P-TTATCTAATGCTGCTATTGCCAGAAAGGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-S525AS527Ak: 5'P-AGAAAGGGCAAACATCACCAAGGC 3'	60°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> <i>D524A-</i> <i>S525AS527A</i>	Ser525 \rightarrow Ala 5' <u>T</u> CT 3' \rightarrow 5' <u>G</u> CT 3' Ser527 \rightarrow Ala 5' <u>T</u> CC 3' \rightarrow 5' <u>G</u> CC 3'
3.	pET23b-CaGFA1- D524A- S525AS527A	<i>Ca</i> Gfa1-R394Im: 5'P-N1ATGTAGAAGAATCATTATGATTGCTTGTGG 3' <i>Ca</i> Gfa1R394Ik: 5'P-TCTAATTGTAGATAACCATGATTTTAATCCACC 3'	69°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> D524A- S525AS527A- R394I	Arg394 \rightarrow Ile 5'A <u>G</u> A 3' \rightarrow 5'A <u>T</u> A 3'
4.	pET23b-CaGFA1- D524A- S525AS527A	$CaGfa1R442Im:$ 5' \underline{P} -TCTCCAGTTTTC5' \underline{P} -TCTCCAGTTTTC $CaGfa1R442Ik:$ 5' \underline{P} -TCTTCTATCCAAGAAATCAGAAGCTAATTCAACCGAAACGG 3'	62°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> D524A- S525AS527A- R442I	Arg442 \rightarrow Ile 5'A <u>G</u> A 3' \rightarrow 5'A <u>T</u> A 3'
5.	pET23b-CaGFA1- D524A- S525AS527A- R394I lub pET23b-CaGFA1- D524A- S525AS527A- R442I	<i>Ca</i> Gfa1-R442Im <i>Ca</i> Gfa1-R442Ik lub <i>Ca</i> Gfa1-R394Im <i>Ca</i> Gfa1-R394Ik	62°C lub 69°C	pET23b- <i>CaGFA1-</i> D524A- S525AS527A- R394IR442I	

denaturacja wstępna	95°C	3 min.
denaturacja	95°C	30 sek.
hybrydyzacja starterów	ta	60 sek. $>$ 30 cykli
elongacja	72°C	6 min.
wydłużanie końcowe	72°C	10 min.
chłodzenie	4°C	∞

Profil temperaturowo - czasowy reakcji PCR:

Termocykler: Eppendorf Mastercycler Gradient

Materiały:

- zestaw odczynników do PCR (bufor Hypernova, MgCl₂, dNTPs, polimeraza DNA *Hypernova*) (DNA Gdańsk))
- startery (Genomed)

4.4. Transformacja komórek kompetentnych E. coli

4.4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych

W celu przygotowania komórek kompetentnych *E. coli*, wcześniej przygotowywano hodowlę bakteryjną danego szczepu. 50 ml pożywki LB (z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku, w zależności od szczepu bakteryjnego), zaszczepiano 1 ml inokulum z całonocnej płynnej hodowli (Materiały i Metody 4.2.2). Hodowlę prowadzono w inkubatorze w 37°C z wytrząsaniem 180 rpm, aż do uzyskania hodowli o gęstości optycznej zawiesiny komórek OD₆₀₀ = 0,3. Po uzyskaniu odpowiedniej gęstości zawiesiny komórek, hodowlę wirowano przez 10 min. z prędkością 3500 rpm w 4°C. Po odwirowaniu supernatant odrzucano, a osad zachowując temp. 4°C, zawieszano w 10 ml schłodzonego i sterylnego roztworu CaCl₂. Tak przygotowaną zawiesinę pozostawiano w lodzie na min. 2h, po czym komórki wirowano (4°C, 3500 rpm, 10 min.). Supernatant ponownie odrzucano, a osad komórek zawieszano w 1 ml roztworu CaCl₂ (zachowując temp. 4°C) i pozostawiano w lodzie na kolejne 30 min. Komórki kompetentne *E. coli* gotowe do transformacji (Materiały i Metody 4.4.2.). Zawiesinę komórek kompetentnych można przechowywać w temp. 4°C przez 12–36 godz. lub w -80°C przez 2–3 tyg. jako tzw. konserwy (120 µl komórek kompetentnych i 30 µl jałowego 50% glicerolu).

- CaCl₂ (100 mM)
- podłoże LB Materiały i metody 4.2.1
- antybiotyki Materiały i metody 4.2.1

Do transformacji używano różnych komórek kompetentnych i w zależności od ich rodzaju stosowano odpowiedni antybiotyk. Do wykorzystywanych szczepów stosowano następujące antybiotyki: - *E. coli* TOP 10F' – tetracyklina

- E. coli TOP $10F^{-}$ tetracyklina
- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS chloramfenikol
- *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS chloramfenikol
- E. coli Rosetta (DE3) pLacI chloramfenikol

4.4.2. Transformacja komórek kompetentnych

Materiał genetyczny wprowadzano do komórek kompetentnych E. coli, podczas inkubacji mieszaniny transformacyjnej w lodzie, w której skład wchodziło: 100 µl świeżych komórek kompetentnych i 1 µl plazmidu (wyizolowanego wg. Materiały i Metody 4.3.2.1) lub 20 µl mieszaniny po reakcji ligacji (Materiały i Metody 4.3.4). Czas inkubacji mieszaniny transformacyjnej zależał od wprowadzanego materiału: dla plazmidu była to 1h, a dla mieszaniny ligacyjnej - 2h. Po upływie czasu inkubacji przeprowadzano szok termiczny, składający się z inkubacji w temp. 42°C przez 1,5 min. i w lodzie przez 5 min. Następnie do mieszaniny transformacyjnej dodawano 0,5 ml pożywki LB. W przypadku transformacji plazmidem na tym etapie wysiewano płytki z podłożem stałym LA z ampicyliną. Natomiast w przypadku mieszaniny ligacyjnej, na tym etapie dodatkowo inkubowano mieszaninę transformacyjną z LB w cieplarce w 37°C z wytrząsaniem 160 rpm przez 1h, po czym mieszaninę transformacyjną z pożywką wysiewano na podłoże stałe LA z ampicyliną. Stosowano dwa sposoby wysiewania: I – płytka rozcieńczona, na której wysiewano 100 µl mieszaniny transformacyjnej z pożywką LB; II – płytka stężona, na której wysiewano 100 µl zatężonej poprzez wirowanie w 3500 rpm przez 1 min. mieszaniny transformacyjnej z pożywka LB (supernatant zlewano, pozostawiając ok. 100 µl, w której zawieszano otrzymany osad komórkowy). Wysiane płytki inkubowano w temp. 37°C przez 15-18 godz. (Materiały i Metody 4.2.3), a następnie przechowywano w 4°C do dalszych analiz.

Materiały:

- podłoża Materiały i Metody 4.2.1
- ampicylina Materiały i Metody 4.2.1

4.5. Nadprodukcja białek rekombinantowych w systemie Tabora-Studiera

Ekspresję genu(ów) w układzie Tabora-Studiera prowadzono w hodowli płynnej. 800 ml pożywki LB (z dodatkiem ampicyliny o stężeniu końcowym 100 μ g/ml) zaszczepiano 10 ml inokulum z całonocnej płynnej hodowli odpowiednich szczepów bakteryjnych *E. coli,* transformowanych danym plazmidem ekspresyjnym (Materiały i Metody 4.4.2). Tak przygotowaną hodowlę inkubowano w cieplarce w temp. 37°C i z wytrząsaniem 180 rpm, aż do uzyskaniu odpowiedniej gęstości optycznej, mierzonej spektrofotometrycznie przy fali o długości 600 nm (OD₆₀₀). Następnie do hodowli dodawano odpowiednią ilość czynnika indukującego ekspresję w układzie Tabora-Studiera (IPTG lub laktoza) i dalej kontynuowano hodowlę bakteryjną w temp. 30°C-37°C przez 5-18h. Po zakończeniu inkubacji hodowlę bakteryjną wirowano przez 20 min, przy 4000 rpm w temp. 4°C (przed wirowaniem pobierano próbkę do elektroforezy poliakrylamidowej wg procedury opisanej w Materiały i Metody 4.10.2). Otrzymany supernatant odrzucano, a osad komórkowy przechowywano w temp. -20°C lub poddawano procesowi oczyszczania (Materiały i Metody 4.6).

Dokładne warunki ekspresji danego genu optymalizowano, dla każdego rekombinanta osobno, w zakresie następujących czynników:

- szczep gospodarza: *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS i *E. coli* Rosetta (DE3)pLacI (Materiału i Metody 4.1.1);

- rodzaj i stężenie induktora: IPTG (≤1 mM), laktoza (≤1,5 g/l);

- gęstość komórek w momencie dodawania induktora do hodowli $(OD_{600} = 0,3-0,6)$;

- temperatura hodowli po indukcji: 30°C-37°C

- czas hodowli po indukcji: 5-18h.

Materiały:

- podłoże LB Materiały i Metody 4.2.1
- ampicylina Materiały i Metody 4.2.1
- induktor: IPTG i laktoza Materiały i Metody 4.2.1

4.6. Techniki oczyszczania białka

4.6.1. Przygotowanie ekstraktu bezkomórkowego

Osad komórkowy z 400-800 ml hodowli zawieszano w ok. 10 ml odpowiedniego buforu (bufor A dla metod wytrąceniowych; bufor W5-PMSF dla IMAC) i mieszano, aż do uzyskania jednolitej zawiesiny komórkowej. Tak otrzymaną zawiesinę poddawano dezintegracji komórek za pomocą sonifikacji: 30% amplitudy, 20-30 sek. w od 2 do 4 powtórzeń z zachowaniem 30 sek. przerw między cyklami (czas i ilość powtórzeń sonifikacji uzależniano od gęstości zawiesiny komórkowej). Cały proces prowadzono w łaźni lodowej. Następnie mieszaninę po sonifikacji wirowano (12 000 rpm, 20 min., 4°C), w celu oddzielenia ekstraktu bezkomórkowego od stałych elementów komórkowych. Tak otrzymywany supernatant poddawano dalszemu procesowi oczyszczania.

Materiały:

- bufor fosforanowy A: 25 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,9-7,1 0,7 mM PMSF 1 mM DTT 1 mM EDTA
- bufor W5-PMSF: 20 mM Tris-Cl, pH 8,5 0,5 M NaCl 0,1% Tweed 20 5 mM imidazolu 0,7 mM PMSF

4.6.2. Metoda wytrąceniowa

Wytrącanie siarczanem streptomycyny

Do ekstraktu bezkomórkowego, przy ciągłym mieszaniu i w łaźni lodowej, wkraplano roztwór siarczanu streptomycyny do końcowego stężenia 1,1%. Etap ten miał na celu usunięcie DNA z ekstraktu bezkomórkowego. Tak uzyskaną mieszaninę wirowano (12 000 rpm, 20 min., 4°C). Osad odrzucano, a supernatant poddawano dalszym etapom oczyszczania.

Wytrącanie siarczanem amonu

Do preparatu po strącaniu siarczanem streptomycyny, wkraplano (przy ciągłym mieszaniu i w łaźni lodowej) nasycony roztwór siarczanu amonu do końcowego stężenia odpowiadającego 60% nasyceniu. Po wprowadzeniu całości (NH₄)₂SO₄, otrzymany roztwór mieszano jeszcze przez ok. 15-30 min., a następnie wirowano (12 000 rpm, 20 min., 4°C). Supernatant odrzucono, a osad poddawano dalszym etapom oczyszczania.

Wytrącanie glikolem polietylenowym (PEG 6500-7000)

Osad z poprzedniego etapu rozpuszczano w 10 ml buforu fosforanowego A z dodatkiem NaCl (do końcowego stężenia 40 mM) i MgCl₂ (do końcowego stężenia 10 mM). Następnie do roztworu wkraplano (przy ciągłym mieszaniu i w łaźni lodowej) 50% roztwór glikolu polietylenowego do końcowego stężenia 10% ¹⁾. Po wprowadzeniu odpowiedniej ilości PEG, otrzymany roztwór mieszano jeszcze przez ok. 15-30 min., a następnie wirowano (12 000 rpm, 20 min., 4°C). Supernatant odrzucano, a osad ponownie rozpuszczano w 10 ml buforu fosforanowego A z dodatkiem NaCl i MgCl₂. Tak otrzymywany roztwór ponownie wirowano (12 000 rpm, 20 min., 4°C), w celu usunięcia nierozpuszczonych cząstek. W efekcie otrzymywano podczyszczony preparat białkowy.

¹⁾ Ze względu na konsystencję roztworu PEG, etap ten bardzo często wiąże się z nadmiernymi stratami oczyszczanego białka. W związku z tym zamiennie do etapu wytrącania PEG, stosowano odsalanie za pomocą kolum HiTrap Desalting (GE Healthcare). Nadmiar siarczanu streptomycyny obecny w roztworze usuwano poprzez wymianę na bufor A (Materiały i Metody 4.8). W efekcie otrzymywano podczyszczony preparat białkowy.

Materiały:

- bufor fosforanowy A: 25 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,9-7,1 0,7 mM PMSF 1 mM DTT 1 mM EDTA
- siarczan streptomycyny (Sigma)
- (NH₄)₂SO₄ (Sigma)
- 50% glikol polietylenowy (PEG 6500-7000)
- NaCl
- MgCl₂

4.6.3. Chromatografia jonowymienna na złożu ResourceQ (IEC)

Rozdział na kolumnie ResourceQ

Preparat białkowy, podczyszczony metodą wytrąceniową (Materiały i Metody 4.6.2), nanoszono na kolumnę ResourceQ FPLC zrównoważoną buforem B. Elucję prowadzono w liniowym gradiencie 0-1 M NaCl w buforze C. Zakres gradientu soli uzależniano od rodzaju białka. W przypadku syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* i jej pochodnych zakres gradientu zawężano do 0,15–0,55 M NaCl. Frakcje wykazujące najsilniejszą aktywność katalityczną enzymu zbierano (Materiały i Metody 4.12) i poddawano dalszym badaniom.

<u>Kolumna ResourceQ</u> – po kilku rozdziałach tego samego enzymu lub po każdorazowym oczyszczaniu różnych białek, złoże kolumny poddawano regeneracji zgodnie z procedurą opisaną w specyfikacji kolumny ResourceQ 6ml (GE Healthcare). Po zakończonym procesie oczyszczania na kolumnę nanoszono 20% EtOH i w takiej postaci przechowywano do następnego oczyszczania.

- bufor fosforanowy B: 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,9-7,1
- bufor fosforanowy C: 20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,9-7,1 1 M NaCl

• 20% Etanol

4.6.4. Chromatografia metalopowinnowactwa na złożu Ni²⁺-IDA-agaroza (IMAC) Rozdział na złożu Ni²⁺-IDA-agaroza

Ekstrakt bezkomórkowy zawieszony w buforze W5-PMSF (Materiały i Metody 4.6.1), nanoszono na zregenerowane i zrównoważone buforem W5 złoże Ni²⁺-IDA-agaroza. Białka niezwiązane lub słabo związane ze złożem wymywano z kolumny poprzez nanoszenie buforów o wzrastającym stężeniu imidazolu (kolejno bufory W5 i W20). Elucję właściwych białek wykonywano za pomocą buforu z 500 mM imidazolem (W500). Po całkowitym wymyciu białek buforem W500, na kolumnę nanoszono ok. 15 ml buforu W1000, w celu usunięcia ze złoża wszystkich pozostałości białkowych. Przed i po każdorazowym użyciu kolumny, regenerowano i oczyszczano złoże.

Przygotowanie złoża Ni²⁺-IDA-agaroza:

Kolumna zawiera ok. 6 ml złoża Ni²⁺-IDA-agaroza. W celu regeneracji złoża kolejno przemywano:

- 4 objętościami złoża 2% roztworu SDS (usunięcie pozostałości niezwiązanych ze złożem)
- 4 objętościami złoża 100 mM roztworem EDTA (usunięcie Ni²⁺)
- 5-6 objętościami złoża H₂O (przepłukanie złoża)
- 2 objętościami złoża 200 mM roztworem NiCl₂ (naniesienie świeżych Ni²⁺)
- 4 objętościami złoża H₂O (wymycie niezwiązanych Ni²⁺)
- 2 objętościami złoża buforem W5 (kalibracja złoża)

Natomiast po zakończeniu rozdziału złoże przemywano kolejno:

- 3 objętościami złoża 2% roztworu SDS (usunięcie pozostałości niezwiązanych ze złożem)
- 3 objętościami złoża H₂O (przepłukanie złoża)
- 2 objętościami złoża 20% EtOH

Kolumnę pozostawiano w 20% EtOH i przechowywano w 4°C.

- bufory W5, W20, W500, W1000: 20 mM Tris-Cl 0,5 M NaCl 0,1% Tweed 20 imidazol odpowiednio w stężeniu 5, 20, 500, 1000 mM pH 8.5
- bufor W5-PMSF (bufor W5 z dodatkiem 0,7 mM PMSF)
- SDS (2%)
- EDTA (100 mM)

- NiCl₂ (200 mM)
- EtOH (20%)
- H₂O destylowana

4.7. Zatężanie preparatów białkowych przez ultrafiltrację

Oczyszczone preparaty białkowe zatężano przy użyciu filtrów "Amicon® Ultra-15" (Millipore) z progiem odcięcia 10 lub 30 kDa w zależności od wielkości białka. Preparat białkowy umieszczano w powyższych filtrach i wirowano przy 4500 rpm, w temp. 4°C, aż do uzyskania właściwego stężenia białka.

4.8. Wymiana buforu

Wymianę buforów w preparatach białkowych wykonywano za pomocą kolumn HiTrap Desalting (GE Healthcare) zgodnie z procedurą zawartą w specyfikacji producenta.

Wprowadzane bufory:

- bufor fosforanowy A: 25 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6.9-7.1 0,7 mM PMSF 1 mM DTT 1 mM EDTA
- bufor HEPES D: 10 mM HEPES, pH 7,0 1 mM DTT

4.9. Chromatografia rozmiarów wykluczających (SEC, filtracja żelowa)

Rozdział na kolumnie Superdex 200 10/300 GL (FPLC)

Chromatografię rozmiarów wykluczających (filtrację żelową) wykonywano na złożu Superdex 200 10/300 GL z wykorzystaniem aparatu do FPLC ÄKTA z detektorem UPC-900. Kolumnę Superdex 200 10/300 GL równoważono buforem S. Następnie na kolumnę nanoszono czysty preparat białka w objętości maksymalnie 0,5 ml o stężeniu ok. 2 mg/ml. Elucję makrocząsteczek prowadzono buforem S. Otrzymywane frakcje zbierano i analizowano pod względem aktywności katalitycznej enzymu (Materiały i Metody 4.12) oraz w rozdziałach elektroforetycznych (Materiały i Metody 4.10).

Kolumna Superdex 200 10/300 GL – po kilku rozdziałach złoże kolumny poddawano regeneracji zgodnie z procedurą opisaną w specyfikacji kolumny Superdex 200 10/300 GL

24ml (GE Healthcare). Po zakończonym procesie oczyszczania złoże przechowywano w 20% EtOH.

Krzywa wzorcowa dla filtracji żelowej

Białko	M [kDa]	V _e [ml]
thyroglobulin	669	9,57
β-amylaza	200	12,38
dehydrogenaza alkoholowa	150	13,38
BSA	66	14,62
anhydraza węglonawa	29	16,96
Dekstran	$V_{dek} = 8,59 \text{ ml}$	

Tab. 11. Zestaw wzorców do krzywej kalibracyjnej kolumny Superdex 200 10/300 GL

Dla każdego białka wyznaczano objętość elucji (V_e) i obliczano wartość V_e/V_{dek} , gdzie V_{dek} jest objętością swobodną kolumny. Na podstawie uzyskanych danych sporządzano krzywą kalibracji (Rys. 27).



Rys. 27. Krzywa kalibracji log MW = $f(V_e/V_{dek})$.

- bufor fosforanowy S: 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,9-7,1 0,15 M NaCl
- 20% Etanol

Przykładowy profil elucji SEC dla CaGfa1:



Rys. 28. Profil elucji rozdziału SEC oczyszczonego preparatu białka *Ca*Gfa1. Frakcja wypływająca przy 11,14 ml odpowiada masie cząsteczkowej 344 kDa (tetramer *Ca*Gfa1). Rozdział ten stanowi kontrolę dla rozdziałów SEC rekombinantowych białek syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*. Linia niebieska – profil elucji białka; czerwone znaczniki – numeracja zbieranych frakcji.

4.10. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

4.10.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę białek w warunkach denaturujących prowadzono wg metody Laemmli [Laemmli 1970] w 10% żelach rozdzielających i 5% żelach zagęszczających, w buforze Tris-glicynowym (pH 8,3), przy napięciu 15 V/cm, z użyciem aparatu "Bluestar" (DNA-Gdańsk). Proces elektroforetyczny kończono w momencie, gdy barwnik docierał do końca żelu. Następnie żel poddawano barwieniu błękitem kumazyny lub srebrem (Materiały i Metody 4.10.4).

	Zel 5%	Zel 10%
H ₂ O	2,3 ml	4,17 ml
Bufor A	0,67 ml	3,3 ml
Bufor C – żel zagęszcz. B – żel rozdziel.	1 ml	2,5 ml
APS TEMED	50 μl 5 μl	50 μl 5 μl

Skład żelu zagęszczającego i rozdzielającego:

Materiały:

Roztwór A	
Akryloamid	29,2 g
Bisakryloamid	0,8 g
H_2O	do 100 ml
Roztwór B	
Tris-HCl (2 M, pH 8,8)	75 ml
SDS (10%)	4 ml
H ₂ O	21 ml
Roztwór C	
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	50 ml
SDS (10%)	4 ml
Nadsiarczan amonu (1%)	5 ml
H_2O	46 ml
• 10% roztwór nadsiarczanu amonu (APS)	
• TEMED	
• Bufor do elektroforezy SDS-PAGE Tris-	Glicyna (pH 8,3)
Tris (25 mM)	3 g
Glicyna (192 mM)	14,4 g
SDS (1%)	1 g
H_2O	do 1000 ml

4.10.2. Przygotowanie prób do SDS-PAGE

Próby pobrane z hodowli bakteryjnej:

1 ml hodowli bakteryjnej wirowano przy 12 tys. rpm przez 1 min. Supernatant zlewano, a osad komórek zawieszano w 100 μ l 1% SDS. Całość inkubowano 10 min w 100°C. Po tym czasie do próbki dodawano 25 μ l buforu lizującego i ponownie inkubowano 10 min w 100°C. Tak przygotowane próby przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

Próby pobrane z ekstraktu bezkomórkowego i podczas oczyszczania:

Do 80 μ l próbki dodawano 20 μ l buforu lizującego. Próbki inkubowano 3 min. w 100°C. Tak przygotowane próby przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

- 1% SDS
- Bufor lizujący

	Гris-HCl (1 М, pH 6,8)	0,6 ml
(Glicerol (50%)	5 ml
S	SDS (10%)	2 ml
2	2-merkaptoetanol	0,5 ml
]	Błękit bromofenolowy (1%)	1 ml
]	H ₂ O	0,9 ml

4.10.3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (Native-PAGE)

Elektroforezę białek w warunkach natywnych prowadzono w analogiczny sposób jak dla SDS-PAGE, ale z zachowaniem warunków niedenaturujących białko.

4.10.3.1. Elektroforeza Native-PAGE z wykorzystaniem żelu 2-warstwowego

Żele poliakrylamidowe przygotowywano samodzielnie, w skład których wchodził: 12% żel rozdzielający i 5% żel zagęszczający. Rozdział prowadzono w buforze Tris-glicynowym (pH 8,8), przy napięciu 15 V/cm, aparacie "Bluestar" (DNA-Gdańsk). Proces elektroforetyczny kończono w momencie, gdy barwnik docierał do końca żelu (ok. 50-60 min). Żel barwiono błękitem kumazyny lub srebrem (Materiały i Metody 4.10.4).

Skład żelu zagęszczającego i rozdzielającego:

	Zel 5%	Zel 12%
H ₂ O	2,3 ml	3,5 ml
Bufor A	0,67 ml	4 ml
Bufor C – żel zagęszcz. B – żel rozdziel.	1 ml	2,5 ml
APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Materiały:

• Roztwór A (taki sam jak w elektroforezie poliakrylamidowej – Materiały i Metody 4.10.1)

•	Roztwór B	
	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	40 ml
	H ₂ O	do 100 ml
•	Roztwór C	
	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	40 ml
	H ₂ O	do 100 ml
		1 . 1

- APS (taki sam jak w elektroforezie poliakrylamidowej Materiały i Metody 4.10.1)
- TEMED (taki sam jak w elektroforezie poliakrylamidowej Materiały i Metody 4.10.1)

 Bufor do elektroforezy SDS-PAGE Tris-Glicyna (pH 8,8) Tris (25 mM) 3 g Glicyna (192 mM) 14,4 g H₂O do 1000 ml

4.10.3.2. Przygotowanie prób do Native-PAGE z 2-warstwowym żelem

Próby oczyszczonych preparatów białkowych:

Do 80 µl próby preparatu białkowego dodawano 20 µl buforu lizującego i dokładnie mieszano. W taki sam sposób przygotowywano białka markerowe (Materiały i Metody 4.1.3). Tak przygotowane próby przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

Materiały:

Bufor lizujący	
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	3,1 ml
Glicerol	5 ml
Błękit bromofenolowy (1%)	0,5 ml
H ₂ O	1,4 ml

4.10.3.3. Elektroforeza Native-PAGE z wykorzystaniem żelu wielowarstwowego

Elektroforezę poliakrylamidową w warunkach niedenaturujących z wykorzystaniem żeli wielowarstwowych wykonano korzystając z zestawu zestawie "Native PAGETM Novex Bis-Tris Gel System" (Life Technologies). Próbki do elektroforezy i rozdział wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez producenta. Otrzymane żele wybarwiano metodą CBB (zgodnie z procedurą Coomassie Staining of NativePAGETM Gels, Life Technologies) lub barwieniem srebrowym (Materiały i Metody 4.10.4.2). Elektroforeza Native-PAGE z wykorzystaniem żeli wielowarstwowych zmniejsza wpływ ładunku białka na migrację w żelu, zatem umożliwia wyznaczenie zależności logMW = $f(R_e)$.

<u>Materiały</u> – dostępne komercyjnie w zestawie "Native PAGE™ Novex Bis-Tris Gel System" (Life Technologies).

4.10.4. Metody barwienia żeli poliakrylamidowych

4.10.4.1. Barwienie błękitem kumazyny (CBB – Coomassie Brillant Blue)

Żel poliakrylamidowy umieszczano w specjalnie przeznaczonym do tego barwienia pojemniku. Następnie do żelu dodano ok. 50 ml buforu barwiącego (żel powinien być w całości zanurzony) i pozostawiono na ok. 15 min. na kołysce laboratoryjnej. Po procesie barwienia bufor barwiący usuwano, zabarwiony żel płukano wodą destylowaną, a następnie dodano do niego ok. 50 ml buforu odbarwiającego. Czas odbarwiania uzależniano od stopnia wcześniejszego zabarwienia, średni czas odbarwiania to 4-8 godz.

•	Bufor barwiący	
	Błękit kumazyny R-250 (CBB)	100 mg
	Metanol	45 ml
	Lodowaty kwas octowy	10 ml
	H ₂ O	45 ml
•	Bufor odbarwiający	
	Metanol	10 ml
	Lodowaty kwas octowy	10 ml
	H_2O	80 ml

4.10.4.2. Barwienie srebrowe

Barwienie żeli poliakrylamidowych metodą srebrową wykonywano zgodnie z procedurą zawartą w zestawie "ProteoSilwerTM Silwer Stain Kit" (Sigma).

<u>Materiały</u> – dostępne komercyjnie w zestawach "ProteoSilwerTM Silwer Stain Kit" (Sigma).

4.11. Oznaczanie stężenia białka – metoda Bradford

Stężenie białka oznaczano metodą Bradford. Do 100 µl preparatu dodawano 1 ml roboczego odczynnika Bradford, inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej i mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm [Bradford 1976].

Stężenie białka w próbkach wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla albuminy bydlęcej, BSA (Rys. 29).

Krzywa wzorcowa dla albuminy wołowej:



Rys. 29. Krzywa wzorcowa $A_{595} = f(C_{BSA})$ dla BSA.

•	Odczynnik Bradford roboczy (BWS):	
	BSS	3 ml
	EtOH (95%)	1,5 ml
	Kwas ortofosforowy (88%)	3 ml
	H ₂ O destylowana	42,5 ml
•	Odczynnik Bradford stężony (BSS):	
	Błekit kumazyny G-250 (CBB)	350 mg
	EtOH (95%)	100 ml
	Kwas ortofosforowy (88%)	200 ml
•	BSA (Sigma Aldrich) 1 mg/ml	

4.12. Oznaczanie aktywności katalitycznej syntazy GlcN-6-P

Aktywność syntazy GlcN-6-P oznaczano przy użyciu zmodyfikowanej metody Elsona-Morgana podanej przez Ghosh i wsp. [Ghosh i in. 1960] z uwzględnieniem modyfikacji wprowadzonych przez Kenig i wsp. [Kenig i in. 1976].

Procedura reakcji Elsona - Morgana

W celu określenia aktywności katalitycznej *Ca*Gfa1 przygotowywano mieszaninę reakcyjną wg Tab. 12. Tak przygotowane próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min. Następnie reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez przeniesienie na 1 min do 100°C. Do schłodzonych prób dodano kolejno 200 µl nasyconego NaNCO₃ i 100 µl 10% bezwodnika octowego w acetonie (świeżo przygotowywany). Następnie próby inkubowano 3 min. w temperaturze pokojowej, po czym przenoszono na kolejna 3 min. do 100°C. W kolejnym etapie po schłodzeniu, do prób dodawano 200 µl 0,8 M K₂B₄O₇ i inkubowano przez następne 3 min. w 100°C. Po ponownym schłodzeniu do mieszczanin dodawano po 5 ml świeżo przygotowywanego odczynnika Elsona-Morgana, po czym mieszaninę dokładnie mieszano i pozostawiono na 20 min. w temp. 37°C. Finalnie w próbach zawierających produkt GlcN-6-P, roztwory zabarwiały się. Pomiar absorbcji wykonywano przy fali o długości 585 nm. Stężenie powstałego produktu wyznaczano na podstawie wcześniej przygotowanej krzywej wzorcowej A₅₈₅= f(c_[GlcN-6-P]) (Rys. 30).

Tab.	12.	Skład	mieszanin	reakcyjnych	do	oznaczania	aktywnośc	i <i>Ca</i> Gfa1	metodą	Elsona-Morg	ana.
W prz	zypad	lku bada	ania inhibicj	i do mieszanii	ıy b	adanej próby	dodawano	określoną	ilość inhib	itora zmniejsz	ając
ilość l	oufor	u (tak al	by końcowa	objętość była	zach	nowana).					

	Badana próba [µl]	Kontrola pozytywna [µl]	Kontrola negatywna [µl]
L-Gln (100 mM)	40	-	-
Fru-6-P (75 mM)	40	-	-
Preparat enzymatyczny	Х	-	-
Bufor A	320 - x	360	400
GlcN-6-P	-	40	-
Objętość końcowa		400	

Definicja jednostki aktywności enzymatycznej:

1 jednostka enzymu (U) jest to taka ilość enzymu, która katalizuje syntezę 1 μmola glukozamino-6-fosforanu w ciągu 1 min. Aktywność specyficzna enzymu wyrażona jest jako U/mg białka.

Krzywa wzorcowa do określania zawartości GlcN-6-P:



Rys. 30. Wykres zależności $A_{585} = f(c_{[GlcN-6-P]})$.

Materiały:

- Fru-6-P (75 mM)
- L-Gln (100 mM)
- GlcN-6-P (10 mM)
- Bufor fosforanowy A (25mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,9-7,1; 1mM DTT; 0,7mM PMSF; 1mM EDTA)
- NaNCO₃ (nasycony)
- 10% bezwodnika octowego w acetonie
- K₂B₄O₇ (0,8 M, pH 9,2)
- odczynnika Elsona Morgana: ADAB (4-dimetyloaminobenzaldehyd) Lodowaty kwas octowy Kwas solny stężony
 1 g 100 ml 1,5 ml

4.13. Pomiar wielkości cząstek metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. Dynamic Light Scattering)

Technika dynamicznego rozpraszania światła jest to metoda optyczna, w której mierzy się modulowanie częstości światła rozproszonego poprzez ruchy Browna makrocząsteczek. Metoda ta wykorzystywana jest m. in. do oznaczania masy cząsteczkowej białka i do określania składu badanej mieszaniny względem wielkości cząsteczek w roztworze (polidyspersyjności). Metoda ta jest szybka i nie wymaga wzorców masowych.

Pomiary DLS wykonano na aparacie Zetasizer (Malvern Instruments Ltd), w ramach współpracy z prof. W. Rypniewskim w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN (Poznań).

4.14. Metody krystalizacji białek

Najbardziej powszechnymi technikami nastawiania krystalizacji białek jest metoda kropli wiszącej (*ang.* hanging drop) i kropli siedzącej (*ang.* pitting drop). Obie metody różnią się między sobą sposobem umieszczenia oraz objętością kropli, będących mieszaniną krystalizacyjną (białka i czynnika krystalizującego). Częściej wykorzystywano metodę kropli wiszącej. Testy przesiewowe w większości nastawiano, za pomocą robota do krystalizacji typu Gryphon (Art Robbins), na 96 dołkowych płytkach. Natomiast optymalizację wstępnie określonych warunków, nastawiano ręcznie na 24 dołkowych płytkach. Krystalizacji poddawano preparaty białek o czystości powyżej 95% i stężeniu ok. 10 mg/ml. Próby krystalizacjne prowadzono uwzględniając:

- różne stężenie białka w kropli krystalizacyjnej,

- różne warunki buforowe, tj. rodzaj buforu, soli i innych dodatków oraz pH,

- różną temperaturę przechowywania płytek krystalizacyjnych 4°C i 19°C.

Zmiany zachodzące w kroplach obserwowano za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego (Materiały i Metody 4.1.4). Początkowo testy krystalizacyjne prowadzono w Pracowni Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN (Poznań). Po pewnym czasie, po zorganizowaniu Pracowni Krystalizacyjnej, większość badań wykonywano w Katedrze Technologii Leków i Biochemii PG.

<u>Materiały</u> – zestawy do przesiewowych testów krystalizacyjnych z firmy Hampton Research (USA) i Molecular Dimensions (UK)

5. WYNIKI I DYSKUSJA

5.1. Konstrukcja rekombinowanej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z wewnętrznym mikrofragmentem oligoHis

Syntaza GlcN-6-P jest enzymem stosunkowo wrażliwym i niestabilnym, wymagającym kilkuetapowego procesu izolacji białka [Sachadyn i in. 2000]. Wieloetapowość i czasochłonność tego procesu bardzo często powoduje znaczne straty zarówno w ilości jak i w aktywności katalitycznej enzymu. Jednym z najczęstszych sposobów skrócenia i uproszczenia, przy jednoczesnym zwiększeniu efektywności procedury oczyszczania jest wykorzystanie chromatografii powinowactwa. Bardzo częstą koncepcją umożliwiającą stosowanie tego typu chromatografii jest tworzenie form fuzyjnych z odpowiednimi domenami, z których najpopularniejszą jest domena oligohistydylowa. W przypadku syntazy GlcN-6-P z C. albicans zastosowanie klasycznego podejścia, czyli konstrukcji rekombinowanych form białka z fragmentami oligoHis na N- i C-końcach łańcucha polipeptydowego, daje możliwość efektywnego oczyszczania za pomocą chromatografii metalopowinnowactwa, ale kosztem dramatycznie obniżonej aktywności katalitycznej w porównaniu z białkiem typu dzikiego [Olchowy i in. 2006]. Taka sytuacja potwierdza, że reszty znajdujące się na N-końcu: Cys1 i na C-końcu: C-pętla (zawierająca m. in. Lys707), odgrywają istotną rolę dla aktywności enzymu [Raczyńska i in. 2007]. Prawdopodobnie byłoby możliwe przywrócenie aktywności katalitycznej mutein, ale konieczny byłby dodatkowy etap - proteolitycznego odcięcia domeny fuzyjnej. Jednak to z kolei, w wyniku niedotrawienia bądź trawienia niespecyficznego, wiązałoby się z utratą pożądanej homogenności preparatu białkowego. Dodatkowo warunki, w którym następowałoby odcięcie fragmentu oligoHis, mogłyby mieć niekorzystny wpływ na enzym. Z powyższych względów zrezygnowano z dalszych prac nad rekombinantowa syntaza GlcN-6-P z oligoHis na N- i C-końcach.

Następnym krokiem, w celu otrzymania możliwie homogennych i z zachowaniem aktywności enzymatycznej preparatów syntazy GlcN-6-P, było zastosowanie koncepcji wykreowania fragmentu oligoHis wewnątrz sekwencji aminokwasowej. Warunkiem koniecznym w chromatografii metalopowinnowactwa w celu efektywnego oczyszczania białka jest lokalizacja insertu oligoHis w miejscu wyeksponowanym na powierzchni 3D struktury makrocząsteczki. Jednocześnie chcąc zachować pełną aktywności przez enzym przy obecności oligoHis należy spełnić następujące warunki: a) zachować dokładnie taką samą długość łańcucha polipeptydowego, poprzez wymianę naturalnie występujących reszt

aminokwasowych w białku typu dzikiego w sposób ekwiwalentny na reszty His; b) wytypować miejsce modyfikacji genetycznej tak, aby było ono możliwie jak najbardziej oddalone od fragmentów warunkujących aktywność katalityczną enzymu.

Taką samą strategie obrali Richez i wsp., którzy przedstawili zakończone sukcesem prace nad bakteryjna i ludzką syntazą GlcN-6-P z wewnętrznymi fragmentami His₆Tag w ramach domeny GAT (w pozycjach 225-230) i na łączniku między domenami ISOM i GAT (w pozycjach 240-245) [Richez i in. 2007]. Idac tymi śladami w ramach naszej Katedry również zaplanowano i wykonano podobne rekombinanty syntazy GlcN-6-P z C. albicans z wewnętrznym fragmentem oligoHis: CaGfa1-His₆655-660 (fragment 6-His wprowadzony w sekwencję domeny ISOM, na powierzchni makrocząsteczki) i CaGfa1-His₆343-348 (fragment 6-His wprowadzony w sekwencję łącznika między domenami ISOM i GAT, pozycję analogiczne do 240-245 z E. coli) [Czarnecka i in. 2012]. Powyższe zmiany umożliwiały wykorzystywanie szybkiej i efektywnej chromatografii metalopowinnowactwa do oczyszczania białka, jednak nie pozostały obojetne w stosunku do katalizowanej reakcji. W obu muteinach zaobserwowano obniżenie szybkości katalizowanej reakcji, w szczególności dla CaGfa1-His₆655-660 było ono znaczące. Stwierdzono również wpływ mutagenezy na powinowactwo enzymu względem poszczególnych substratów, gdzie dla CaGfa1-His₆655-660: $K_{M(L-Gln)} = 2,36\pm0,14$ mM i $K_{M(Fru-6-P)} = 1,12\pm0,03$ mM; a dla *Ca*Gfa1-His₆343-348: $K_{M(L-Gln)} = 1,36\pm0,03$ mM i $K_{M(Fru-6-P)} = 2,60\pm0,08$ mM; podczas gdy dla *Ca*Gfa1 typu dzikiego: $K_{M(L-Gln)} =$ 1,41±0,01 mM i K_{M(Fru-6-P)}= 1,56±0,05 mM. Dodatkowo dla wersji z fragmentem 6-His wprowadzonym w sekwencję domeny ISOM (655-660 aa) zaobserwowano zmianę struktury oligomerycznej z homotetrameru na homodimer [Czarnecka i in. 2012].

W mojej pracy podjęłam próbę konstrukcji innej formy enzymu rekombinantowego z wewnętrznym fragmentem oligoHis, w którym układ heksaHis powstaje dopiero po zwinięciu białka w strukturę przestrzenną. Taka koncepcja minimalizuje konieczność modyfikacji sekwencji aminokwasowej poprzez mutagenezę, co w konsekwencji zapobiega dodatkowym zmianom we właściwościach enzymu.

5.1.1. Analiza struktury przestrzennej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* w celu lokalizacji wprowadzenia wewnętrznego fragmentu oligoHis

Na podstawie doniesień Katerina i wsp. oraz Bolanos-Garcia i wsp. [Katerina i in. 2009, Bolanos-Garcia i in. 2006] zaplanowałam nowy kierunek mutagenezy, w celu otrzymania syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* zawierającej wewnętrzny układ reszt His

o potencjalnej zdolności do wiązania się z jonami Ni²⁺ wykorzystywanymi w chromatografii metalopowinnowactwa. Autorzy cytowanych publikacji stwierdzili, że syntaza GlcN-6-P typu dzikiego z *E. coli* wiąże się z jonami Ni²⁺ w chromatografii metalopowinnowactwa, tłumacząc to dużą ilością reszt His w strukturze białka. W rzeczywistości jednak, zawartość ta nie jest szczególnie duża (24 reszty His). Wiązanie bakteryjnej syntazy GlcN-6-P ze złożem prawdopodobnie wynika z obecności w strukturze przestrzennej tego białka szczególnego układu kilku reszt His położonych obok siebie, co sumarycznie zwiększa siłę wiązania białka do złoża. Przeprowadzając analizę znanej struktury białka *Ec*GlmS ([PDB: 1jxa]) pod tym kątem, stwierdziłam, że trzy reszty His w domenie ISOM (pozycje 465, 466 i 493), występują w strukturze przestrzennej obok siebie. Ponadto miejsce to występuje w obszarze kontaktu miedzydomenowego w funkcjonalnym dimerze, co daje w efekcie układ sześciu blisko położonych reszt His. Porównując sekwencję łańcucha polipeptydowego *EcGLMS i CaGFA1*, stwierdziłam, że z wyżej wymienionych reszt *EcGLMS* tylko jedna, His493, ma swój odpowiednik w *CaGFA1* w postaci reszty His596, pozostałe to odpowiednio Lys568 (His465 w *E. coli*) i Ser569 (His466 w *E. coli*) (Rys. 31).

Uznałam za możliwe wykreowanie układu heksaHis w eukariotycznej syntezie GlcN-6-P poprzez mutagenezę ukierunkowaną wybranych reszt aminokwasowych. Resztami odpowiadającymi His465 i His466 z *Ec*GlmS są reszty Lys568 oraz Ser569 w *Ca*Gfa1 i to właśnie te reszty wymieniłam na dwie reszty His podczas zaplanowanej mutagenezy. Dzięki takiej wymianie, w strukturze przestrzennej powinien powstać układ trzech sąsiednich reszt w jednej podjednostce, co w funkcjonalnym dimerze daje układ sześciu reszt obok siebie (Rys. 32 i 33). Cechą pozytywną takiej modyfikacji jest fakt, że miejsce mutagenezy znajduje się daleko od centrum aktywnego (Rys. 33), co daje nadzieję, że rekombinowane białko zachowa aktywność katalityczną, a ponadto zmiana jest tak niewielka, że nie powinna mieć wpływu na strukturę białka.
EcGLMS CaGFA1	CGIVGAIAQRDVAEILLEGLRRLEYRGYDSAGLAVVDAEGHMT CGIFGYVNFLVDKSRGEIIDNLIEGLQRLEYRGYDSAGIAVDGKLTKDPSNGDEEYMDSI ***.* : :: :: *:***********************	43 60
EcGLMS CaGFA1	RLRRLGKVQMLAQAAEEHPLHGGTGIAHTRWATHGEPSEANAHPHVSEHIV IVKTTGKVKVLKQKIIDDQIDRSAIFDNHVGIAHTRWATHGQPKTENCHPHKSDPKGEFI :: ***::* * :. :********************	94 120
EcGLMS CaGFA1	VVHNGIIENHEPLREELKARGYTFVSETDTEVIAHLVNWELKQGGTLREAVLRA VVHNGIITNYAALRKYLLSKGHVFESETDTECIAKLFKHFYDLNVKAGVFPDLNELTKQV ******* *: .**: * ::*:.* ****** **:*:: ::*: . *.* .:	148 180
EcGLMS CaGFA1	IPQLRGAYGTVIMDSRHPDTLLAARSGSPLVIGLG LHELEGSYGLLVKSYHYPGEVCGTRKGSPLLVGVKTDKKLKVDFVDVEFEAQQQHRPQQP : :*.*:** :: . ::*. : .:*.****::*:	183 240
EcGLMS CaGFA1	FIASDQLALLPVTRR QINHNGATSAAELGFIPVAPGEQNLRTSQSRAFLSEDDLPMPVEFFLSSDPASVVQHTKK :.*: *::** ::: *::	202 300
EcGLMS CaGFA1	FIFLEEGDIAEITRRSVNIFDKTGAEVKRQDIES-NLQYDAGDKGIYRHYMQKEIYE VLFLEDDDIAHIYDGELRIHRASTKSAGESTVRPIQTLEMELNEIMKGPYKHFMQKEIFE .:***:.***.* .:.*. *:* .: *:: :: ** *:*:*****:*	258 360
EcGLMS CaGFA1	QPNAIKNTLTGRISHGQVDLSELGPNADELLSKVEHIQILACGTSYNSGMVSRYWFES QPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIR-RCRRIIMIACGTSYHSCLATRSIFEE **:: **: *** * *. *. : : .:* ::******:* :.:* **.	316 419
EcGLMS CaGFA1	LAGIPCDVEIASEFRYRKSAVRRNSLMITLSQSGETADTLAGLRLSKELGYLGSLAICNV LTEIPVSVELASDFLDRRSPVFRDDTCVFVSQSGETADSILALQYCLERGAL-TVGIVNS *: ** .**:**:* *:*.* *:. : :********: .*: .	376 478
EcGLMS CaGFA1	PGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAKLSRLKGLDASIEHDIVHG VGSSMSRQTHCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSNDSISRKGRHEEIIKG ***: *::: ***.*******:*:* .*:*:**	436 538
EcGLMS CaGFA1	LQALPSRIEQMLSQDKRIEALAED-FSDK <mark>HH</mark> ALFLGRGDQYPIALEGALKLKEISYI <mark>H</mark> AE LQKIPEQIKQVLKLENKIKDLCNSSLNDQ <mark>KS</mark> LLLLGRGYQFATALEGALKIKEISYM <mark>H</mark> SE ** :*.:*:*:*. :::*: *.:. :.*:: *:**** *:. ******:****	495 598
EcGLMS CaGFA1	AYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNNELLEKLKSNIEEVRARGGQLYVFADQDAGFVS GVLAGELKHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARDGRPIVICNEGDAIIS . ****** ***: *:*:**:.*: *: * **:* **.*: *:.:::	555 658
EcGLMS CaGFA1	SDNMH-IIEMPHVEEVIAPIFYTVPLQLLAYHVALIKGTDVDQPRNLAKSVTVE 608 NDKVHTTLEVPETVDCLQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPRNLAKSVTVE 712 .*::* :*:* : : :: .:****::* :*: :* *** **	

Rys. 31. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych syntazy GlcN-6-P z *C. albicans (CaGFA1)* i *E. coli (EcGLMS)*. Na niebieskim tle zaznaczyłam 3 reszty His w *Ec*GlmS, które w strukturze przestrzennej znajdują się obok siebie i odpowiadające im reszty w *Ca*Gfa1. Analizę wykonałam na podstawie programu ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).



Rys. 32. Obraz struktury dimeru domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z dodatkowymi resztami His (*Ca*Gfa1-K568HS569H) [Czarnecka i in. 2012]: (A) przed mutagenezą; (B) po mutagenezie. Na czerwono zaznaczono resztę His596 (naturalnie występującą), a na niebiesko reszty Lys568 i Ser569 wymienione podczas mutagenezy ukierunkowanej na dwie reszty His. Modelowanie wykonane przez dr M. Wojciechowskiego.



Rys. 33. Obraz struktury tetrameru domen ISOM syntazy GlcN-6-P z C. albicans z dodatkowymi resztami His (CaGfa1-K568HS569H). Na czerwono zaznaczono reszty wymieniane W wyniku ukierunkowanej mutagenezy; żółte kule centrum katalityczne w domenie ISOM (wielkością odpowiadające Fru-6-P); zielone kule - miejsce wiązania inhibitora UDP-GlcNAc (wielkością odpowiadające wykonane kieszeni). Modelowanie przez dr M. Wojciechowskiego.

Model muteiny *Ca*Gfa1-K568HS569H wykonany został przez dr Marka Wojciechowskiego z KTLiB PG w oparciu o strukturę pdb 2poc, w której brakujące fragmenty, wymodelowano przy pomocy programu MODELLER v. 9.2. [Sali i in. 1993]. Geometria otrzymanych struktur została zoptymalizowana przy pomocy programów pakietu GROMACS [Hess i in. 2008]. Każdy koleiny rysunek z modelowaniem różnych wersji *Ca*Gfa1, wykonany przez dr. M. Wojciechowskiego został przygotowany w analigiczny sposób. Przedstawione rysunki zostały przygotowane przy pomocy programu VMD [Humphrey i in. 1996].

5.1.2. Konstrukcja plazmidu ekspresyjnego pET23b-CaGFA1-K568HS569H

W celu otrzymania plazmidu ekspresyjnego pET23b z genem kodujacym syntaze GFA1-K568HS569H z C. albicans, wykorzystałam metodę ukierunkowanej mutagenezy opartą o reakcję PCR, wg schematu przedstawionego na Rys. 34.

Pierwszym etapem w celu przeprowadzenia reakcji PCR było otrzymanie właściwej matrycy oraz odpowiednich starterów. Jako matrycę wykorzystałam plazmid pET23b zawierający gen kodujący syntazę GlcN-6-P z C. albicans: pET23b-CaGFA1 (Materiały i Metody 4.1.2) [Sachadyn i in. 2000]. Natomiast startery zaprojektowałam następująco:

*Ca*Gfa1-K568HS569Hm:

5' P-<u>CACCAC</u>TTATTATTATTAGGTAGAGGTTATCAATTTGC 3'

	γ
Sekwencja	Sekwencja komplementarna
kodująca	do CaCFA1
2 reszty His	

*Ca*Gfa1-K568HS569Hk:

5' P-TTGATCATTCAATGAACTATTACATAAATC 3'

Sekwencja komplementarna do CaCFA1



Rys. 34. Schemat mutagenezy ukierunkowanej. Startery i miejsce zmian genetycznych przedstawiłam na przykładzie *Ca*Gfa1-K568HS569H. Schemat wykonałam za pomocą programu SnapGene.

Warunki reakcji PCR optymalizowałam pod względem temperatury przyłączenia starterów oraz stężenia poszczególnych składników. Po przeprowadzeniu reakcji PCR w najbardziej optymalnych warunkach (Materiały i Metody 4.3.5) otrzymany produkt, w celu usunięcia pozostałości DNA matrycowego, poddałam trawieniu restrykcyjnemu za pomocą enzymu *Dpn*I (Materiały i Metody 4.3.3, Tab. 6). Następnie mieszaninę poreakcyjną poddałam elektroforezie agarozowej (żel 1%, rozdział 1 godz., 60V) (Materiały i Metody 4.3.1) w celu rozdzielenia produktu właściwego od produktów niespecyficznych. Fragment DNA o wielkości ok. 5772 pz wyizolowałam otrzymując liniową postać plazmidu pET23b z genem kodującym syntazę GlcN-6-P z *C. albicans* z dodatkowymi resztami His (H568 i H569) zastępującymi reszty Lys568 i Ser569. (Materiały i Metody 4.3.2.2). Tak otrzymany produkt poddałam reakcji ligacji (Materiały i Metody 4.3.4), a następnie transformowałam do komórek kompetentnych *E. coli* TOP 10F' (Materiały i Metody 4.4.2).

Poprawność konstrukcji otrzymanego plazmidu pET23b-*CaGFA1-K568HS569H* potwierdziłam poprzez analizę restrykcyjną (Maretiały i Metody 4.3.3) (Rys. 35) i sekwencjonowanie w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii UAM, Collegium Biologicum w Poznaniu.



Rys. 35. Analiza elektroforetyczna produktów trawienia restrykcyjnego plazmidu pET23b-*CaGFA1-K568HS569H*:

- M marker GeneRuler 1kb DNA Ladder (10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3500; 3000; 2500; 2000; 1500; 1000; 750; 500; 250 [pz])
- 1 pET23b-*CaGFA1-K568HS569H* trawiony *Eco*RI (3978, 1296 i 498 [pz])
- 2 pET23b-*CaGFA1-K568HS569H* trawiony *Bam*HI (5772 pz)
- 3 pET23b-*CaGFA1-K568HS569H* trawiony *NdeI/Bam*HI (3626 i 2146 [pz])

Kontrolę analizy stanowi symulacja trawienia restrykcyjnego dla *Ca*Gfa1 przedstawiona na Rys. 26.

5.1.3. Nadprodukcja białka CaGfa1-K568HS569H w komórkach E. coli

Do nadekspresji genu *CaGFA1-K568HS569H* wykorzystałam szczepy *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS i *E. coli* Rosetta (DE3)pLacI, do których transformowałam rekombinantowy plazmid pET23b-*CaGFA1-K568HS569H* (Materiały

i Metody 4.4.2). Jako kontrolę nadprodukcji białka stosowałam odpowiednio te same szczepy *E. coli*, ale transformowane "pustym" plazmidem pET23b (bez genu *CaGFA1*).

W celu ustalenia najkorzystniejszych warunków nadekspresji, aby otrzymać maksymalną ilość białka, hodowlę optymalizowałam względem następujących czynników:

- rodzaj i ilość czynnika indukującego (≤0,1M IPTG, ≤1,5g/l laktoza),
- wpływ fazy wzrostu hodowli, przy której indukowano system ekspresji (w zakresie OD 0,3-0,6),
- długość czasu ekspresji po indukcji (5-16 godz.),
- temperaturę hodowli po indukcji (30°C i 37°C).

Wyniki optymalizacji analizowałam za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (Materiały i metody 4.10.1). Porównując elektroforetyczne rozdziały białek, otrzymanych z lizatów poszczególnych szczepów *E. coli* hodowanych w różnych warunkach zaobserwowałam następujące wnioski:

- W przypadku komórek: E. coli BL21(DE3)pLysS oraz E. coli Rosetta(DE3)pLacI zawierających plazmid pET23b-CaGFA1-K568HS569H otrzymałam nieznaczną ilość rekombinantowego białka, niezależnie od fazy wzrostu w momencie indukcji.
- W przypadku komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS nadprodukcja rekombinantowej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* przedstawiała się na dużo wyższym poziomie, nawet w przypadku dodawania induktora w dynamicznej fazie wzrostu komórek (OD₆₀₀ = 0,3).
- We wszystkich szczepach lepszym induktorem okazała się laktoza. Stężenie induktora nie miało istotnego wpływu na poziom nadekspresji genu. Warunki dalszej inkubacji po indukcji, przy zachowaniu zależności, że po obniżeniu temperatury z 37°C na 30°C czas został wydłużony z 5h do ok. 16h, nie miały istotnego wpływu na poziom nadekspresji.

Porównując uzyskane wyniki z hodowli w trzech różnych komórkach ekspresyjnych stwierdzam, że najwydajniejszą ekspresję zmutowanej formy syntazy GlcN-6-P uzyskałam w komórkach *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, indukując przy OD₆₀₀ ok. 0,5-0,6 po przez dodanie 1,5 g/l laktozy oraz dalszą inkubacją w warunkach 37°C przez 5h lub 30°C przez 16h (w zależności od dostępności sprzętu). W takich warunkach hodowli, muteina stanowiła ok. 20% ze wszystkich białek występujących w *E. coli*, co odpowiadało ok. 15-25 mg/l *Ca*Gfa1-K568HS569H (Rys. 36).



Rys. 36. (A) Analiza elektroforetyczna nadekspresji genu *CaGFA1-K568HS569H* (10% żel poliakrylamidowy): M— marker PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 [kDa]; 1— lizat hodowli *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS transformowany pET23b; 1— lizat hodowli *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS transformowany pET23b; 1— lizat hodowli *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS transformowany pET23b-*CaGFA1-K568HS569H*. (B) Analiza densytometryczna ścieżki 2, wykonana w programie GelQuantPro. Powierzchnia pod sygnałem *Ca*Gfa1-K568HS569H stanowi 21% wszystkich białek.

Zgodnie z założonym celem badań, jako metodę oczyszczania muteiny wykorzystałam chromatografię metalopowinowactwa (Materiały i Metody 4.6.4). Warunki procesu izolacji białka optymalizowałam względem pH i stężenia imidazolu w buforach płuczących i elucyjnych. Wstępnie do przemywania złoża stosowałam szereg buforów o wzrastającym stężeniu imidazolu, czyli związku współzawodniczącego o miejsce wiązania z jonami Ni²⁺ osadzonych na złożu, z resztami His z powierzchni makrocząsteczki. W efekcie tego ustaliłam optymalnie graniczne stężenie imidazolu, przy którym wymywałam maksymalną ilość wszystkich białek oprócz rekombinantowego białka fuzyjnego *Ca*Gfa1-K568HS569H. Ma to szczególne znaczenie, gdy rekombinantowe białka ulegają ekspresji na stosunkowo niskim poziomie odnośnie do białek pochodzenia gospodarza.

Najefektywniejszy proces oczyszczania otrzymałam wykorzystując, do odmycia białek towarzyszących, bufory zawierające 5-20 mM imidazolu o pH 8,5 (bufory W5 i W20). Z kolei elucję właściwej muteiny przeprowadziłam za pomocą buforu z 500 mM imidazolem o pH 8,5 (bufor W500). Na każdym etapie przemywania kolumny ze złożem Ni²⁺-IDA-agaroza, zbierałam próbki frakcji w celu analizy efektu oczyszczania za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1) (Rys. 37), oznaczenia stężenia białka metodą Bradforda (Materiały i Metody 4.11) i wstępnego określenia aktywność enzymatyczną metodą Elsona – Morgana (Materiały i Metody 4.12).

Tak otrzymany preparat *Ca*Gfa1-K568HS569H poddałam następnie ultrafiltracji (Materiały i Metody 4.7) i wymianie na bufor A (Materiał i Metody 4.8), dzięki czemu nadmiar imidazolu został usunięty, a białko zawieszone w bardziej optymalnych warunkach stabilizujących enzym, umożliwiając w ten sposób dalsze badania nad charakterystyką enzymu.





Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów w efekcie oczyszczania metodą IMAC otrzymałam ok. 11 mg preparatu białkowego *Ca*Gfa1-K568HS569H z 1 dm³ hodowli o czystości ponad 96%, z aktywnością równą 6,80 U/mg oraz z ponad 50% wydajnością (Tab. 13). Dla porównania podczas oczyszczania syntazy GlcN-6-P *z C. albicans* typu dzikiego z komórek *E. coli Rosetta*(DE3)pLysS, metodą klasyczną otrzymałam preparat z 95% czystością i o aktywności 7,55 U/mg (wydajność ok. 16%, współczynnik oczyszczania ok. 9.52) [Czarnecka i in. 2012]. W związku z tym przeprowadzona przeze mnie mutageneza, wprowadzająca dwie dodatkowe reszty His, umożliwiła lepszy i szybszy proces oczyszczania białka, jednocześnie zachowując jego aktywność katalityczną na porównywalnym poziomie w stosunku do enzymu typu dzikiego.

	Objętość frakcji [ml]	Stężenie białka [mg/ml]	Całkowita ilość białka [mg]	Aktywność specyficzna enzymu [U/mg]	Aktywność całkowita enzymu [U]	Współczynnik Oczyszczania	Wydajność [%]
CaGfa1-K568HS569H							
EB	12,00	18,75	225,00	0,71	159,80	1	100
IMAC	2,00	5,90	11.80	6,80	80,24	9,6	50,2

Tab. 13. Podsumowanie procesu oczyszczania *Ca*Gfa1-K568HS569H: EB – ekstrakt bezkomórkowy; IMAC – preparat po chromatografii metalopowinnowactwa.

5.1.6. Wyznaczenie parametrów kinetycznych CaGfa1-K568HS569H

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych *Ca*Gfa1-K568HS569H przeprowadziłam szereg oznaczeń szybkości katalizowanej reakcji przez enzym przy wzrastającym stężeniu jednego z substratów (Materiały i Metody 4.12). Dla każdego substratu (Fru-6-P i L-Gln) przeprowadziłam co najmniej 3-krotne powtórzenie, a uzyskane wyniki przedstawiłam za pomocą wykresów Lineweavera-Burka (Rys. 38 i 39).



Rys. 38. Wykres zależności $1/\text{Akt} = f(1/C_{\text{Fru-6-P}})$ dla *Ca*Gfa1-K568HS569H. Wyniki z jednego powtórzenia



Rys. 39. Wykres zależności $1/\text{Akt} = f(1/C_{\iota-\text{Gln}})$ dla *Ca*Gfa1-K568HS569H. Wyniki z jednego powtórzenia

W przypadku obu substratów uzyskane zależności mają charakter liniowy. Proste przecinają oś rzędnych w punkcie odpowiadającym $1/V_{max}$, a oś odciętych w punkcie odpowiadającym $-1/K_M$. Z równań prostych wyznaczyłam dokładne wartości punktów przecięcia prostych z osiami współrzędnych oraz obliczyłam maksymalną szybkość katalizowanej reakcji (V_{max}) oraz powinowactwo enzymu (K_M) wobec obu substratów (Tab. 14).

[].			
	K _{M Fru-6-P}	$K_{M \ L-Gln}$	V _{max}
	[mM]	[mM]	[µmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]
CaGfa1	$1,56 \pm 0,05$	$1,41 \pm 0,01$	$6,80 \pm 0,11$
<i>Ca</i> Gfa1-K568HS569H	$1,90 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0.08$	$6,15 \pm 0,08$

Tab. 14. Porównanie aktywności katalitycznych *Ca*Gfa1-K568HS569H i *Ca*Gfa1 - typu dzikiego [Czarnecka i in. 2012].

Wartości K_M muteiny *Ca*Gfa1-K568HS569H są zbliżone do parametrów kinetycznych dzikiego typu syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* (Tab. 14). Delikatny wzrost stałej K_M dla Fru-6-P oznacza niewielki spadek powinowactwa rekombinantowego białka do tego substratu. Analogicznie spadek wartości K_M dla L-Gln oznacza nieznaczny wzrost powinowactwa. Należy zauważyć również, że dla zmutowanej syntazy GlcN-6-P maksymalna szybkości reakcji jest bardzo zbliżona w stosunku do białka dzikiego typu. W ten sposób potwierdziło się założenie, że wprowadzenie mutacji w pozycję 568 i 569 łańcucha

aminokwasowego, nie będzie blokować aktywności katalitycznej enzymu. Zatem reszty Lys568 i Ser569 nie odgrywają żadnej istotnej roli w reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P z *C. albicans*.

5.1.7. Inhibicja aktywności CaGfa1-K568HS569H przez UDP-GlcNAc

Kolejną istotną kwestią w aspekcie badania wpływu wprowadzonej mutagenezy właściwości syntazy GlcN-6-P było określenie, czy substytucja K568H i S569H ma wpływ na podatność enzymu na fizjologiczny inhibitor UDP-GlcNAc. Potencjalnie reszty Lys568 i Ser569 nie powinny odgrywać żadnej roli w wiązaniu cząsteczki inhibitora, gdyż lokalizacyjnie są oddalone od kieszeni wiążącej. Jednakże, w celu potwierdzenia, wykonałam serię testów oznaczania aktywności enzymatycznej przy różnym stężeniu UDP-GlcNAc (0-5 mM) oraz z dodatkiem lub bez Glc-6-P (10 mM) (Materiały i Metody 4.12). W efekcie wraz ze wzrostem stężenia inhibitora zaobserwowałam obniżenie aktywności muteiny, a $IC_{50 \text{ UDP-GlcNAc}} = 2,0\pm0,4$ mM. Podczas, gdy dla *Ca*Gfa1 typu dzikiego aktywność katalityczna zahamowana w 50% jest przy stężeniu 1,55 \pm 0,25 mM [Czarnecka i in. 2012]. Powyższe wyniki potwierdzają brak związku reszt Lys568 i Ser569 z obszarem wiązania UDP-GlcNAc w cząsteczce białka.

5.1.8. Struktura oligomeryczna

Dotychczasowe doniesienia literaturowe i wyniki własne (powyżej) nie wskazywały na jakąkolwiek rolę reszt aminokwasowych Lys568 i Ser569 w strukturze i aktywności *Ca*Gfa1. Jednakże każda wymiana reszty aminokwasowej może wywołać niewielkie przesunięcia w strukturze białka oligomerycznego jakim jest makrocząsteczki, które w konsekwencji mogą mieć znaczny wpływ m. in. na jego strukturę czwartorzędową. W celu sprawdzenia wpływu przeprowadzonej mutagenezy na IV rzędową strukturę białka, wyznaczyłam masę cząsteczkową monomeru po przez analizę elektroforetyczną w warunkach denaturujących i masę białka natywnego – przez filtrację żelową i elektroforezę w warunkach natywnych. Kontrolą dla otrzymanych wyników była *Ca*Gfa1 typu dzikiego. Dodatkowo bazując na sekwencji aminokwasowej, wyznaczyłam teoretyczną masę monomeru, co również stanowiło kontrolę dla wyznaczonej eksperymentalnej masy cząsteczkowej.

Sekwencja nukleotydowa rekombinantowej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* składa się z 2136 pz, które kodują 712 reszt minokwasowych (bez kodonu START i STOP). Po mutagenezie sumaryczna ilość nukleotydów i aminokwasów nie zmieniła się (Rys. 40). Jednakże masa cząsteczkowa białka, ze względu na wymianę 2 reszt aminokwasowych,

prawdopodobnie uległa minimalnej zmianie. Wykorzystując metody bioinformatyczne, możliwe było oznaczenie potencjalnej masy cząsteczkowej muteiny na podstawie otrzymanej sekwencji aminokwasowej Protein Molecular Weight, (program http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html). Teoretyczna molekularna masa monomeru muteiny CaGfa1-K568HS569H wyniosła 79,19 kDa (MW_{teor} = 79,13 kDa dla CaGfa1). Zakładając, że rekombinant podobnie jak białko typu dzikiego, zachowałby strukturę homotetrameru, jego masa molekularna wynosiłaby około 316,76 kDa. Wartości teoretycznej masy makrocząsteczki, stanowiły wzorce dla eksperymentalnego wyznaczenia mas.

MCGIFGYVNFLVDKSKGEIIDNLIEGLQRLEYRGYDSAGIAVDGKLTKDPSNGDEEYMDSIIIKTTGK VKVLKQKIIDDQIDRSAIFDNHVGIAHTRWATHGQPKTENCHPHKSDPKGEFIVVHNGIITNYAALRK YLLSKGHVFESETDTECIAKLFKHFYDLNVKAGVFPDLNELTKQVLHELEGSYGLLVKSYHYPGEV CGTRKGSPLLVGVKTDKKLKVDFVDVEFEAQQQHRPQQPQINHNGATSAAELGFIPVAPGEQNLR TSQSRAFLSEDDLPMPVEFFLSSDPASVVQHTKKVLFLEDDDIAHIYDGELRIHRASTKSAGESTVR PIQTLEMELNEIMKGPYKHFMQKEIFEQPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIRRCRRIIMI ACGTSYHSCLATRSIFEELTEIPVSVELASDFLDRRSPVFRDDTCVFVSQSGETADSILALQYCLER GALTVGIVNSVGSSMSRQTHCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSNDSISRKGRHEEII KGLQKIPEQIKQVLKLENKIKDLCNSSLNDQHHLLLLGRGYQFATALEGALKIKEISYMHSEGVLAGE LKHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARDGRPIVICNEGDAIISNDKVHTTLEVPETVD CLQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPRNLAKSVTVESTOP

Rys. 40. Sekwencja aminokwasowa rekombinantowej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z wewnętrznym fragmentem oligoHis w strukturze 3D (*Ca*Gfa1-K568HS569H). Na niebieskim tle – reszty His wstawione w miejce Lys458 i Ser569.

5.1.7.1. Określenie masy monomeru CaGfa1-K568HS569H (SDS-PAGE)

Oczyszczony preparat białka *Ca*Gfa1-K568HS569H poddałam analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1) (Rys. 41A). Dla pasm widocznych na ścieżce markera, na podstawie stosunku długości poszczególnych sygnałów do długości czoła w danej ścieżce, wyznaczyłam wartość ruchliwości elektroforetycznej R_e oraz sporządziłam wykres zależności logMW = f(R_e) (Rys. 41B).



Rys. 41. (A) Elektroforeza poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (żel 10%): M – marker Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – oczyszczony preparat białka *Ca*Gfa1-K568HS569H; **(B)** Wykres zależności logMW = $f(R_e)$.

Z otrzymanego równania wykresu zależności log $MW = f(R_e)$ wyznaczyłam wartość masy monomeru białka *Ca*Gfa1-K568HS569H, która wyniosła 86±8 kDa. Stosunkowo duża różnica między eksperymentalną a teoretyczną wartością masy cząsteczkowej (79,19 kDa), może wynikać z niedokładności analizy.

5.1.7.2. Określenie masy natywnego białka CaGfa1-K568HS569H

Strukturę oligomeryczną rekombinowanego białka *Ca*Gfa1-K568HS569H określiłam wykorzystując chromatografię rozmiarów wykluczających (SEC) (Materiały i Metody 4.9). Dodatkowo określoną masę potwierdziłam poprzez elektroforezę w warunkach natywnych (Native-PAGE) (Materiały i Metody 4.10.3.1) (Rys. 42 A i B).





Rys. 42. (A) Profil elucji białka *Ca*Gfa1-K568HS569H z kolumny Superdex 200 10/300 GL. Kontrolny rozdział SEC dla *Ca*Gfa1 typu dzikiego przedstawiłam na Rys 28. **(B)** Analiza elektroforetyczna w warunkach natywnych oczyszczonego preparatu *Ca*Gfa1-K568HS569H:

- 1 frakcja wypływająca przy 11,25 ml z SEC (*Ca*Gfa1-K568HS569H);
- 2 białko markerowe Tyreoglobulina (669 kDa);
- 3 białko markerowe Apoferrytyna (443 kDa);
- $4 białko markerowe \beta-amylaza (200 kDa);$
- 5 białko markerowe Transferyna (80 kDa);
- 6 białko markerowe BSA (66 kDa).

W rozdziale SEC otrzymałam jeden dominujący pik przy 11,25 ml, co odpowiada masie 328,8 kDa, bliskiej wartości teoretycznej dla potencjalnej formy tetramerycznej. Frakcja odpowiadająca tej masie cząsteczkowej, wykazywała dużą aktywność katalityczną. Dodatkowo zebraną frakcję poddałam rozdziałowi Native-PAGE. Niestety w przypadku tej elektroforezy (Materiały i Metody 4.10.3.1), nie jest możliwe sporządzenie jednoznacznej zależności logMW = $f(R_e)$, tj. w SDS-PAGE, gdyż na szybkość migracji w dużym stopniu ma wpływ wiele innych czynników, w tym m. in. ładunek białka. Za pomocą tej metody mogłam jedynie oszacować zbliżoną wartość masy cząsteczkowej całego niezdenaturowanego białka na ok. 300-350 kDa. Wyznaczony zakres potwierdza masę wyznaczoną za pomocą SEC.

Zakładając, że masa monomeru otrzymanej muteiny jest bliska wartości teoretycznej, a masa białka natywnego wynosi 328,8 kDa, stwierdzam, że białko *Ca*Gfa1-K568HS569H zachowało postać homotetrameru.

PODSUMOWANIE:

Wymiana reszt Lys568 i Ser569 na dwie reszty His, umożliwia szybkie i efektywne oczyszczanie białka metodą chromatografii metalopowinnowactwa. Enzym zachowuje aktywność katalityczną zbliżoną do *Ca*Gfa1 typu dzikiego. Podatność muteiny na działanie fizjologicznego inhibitora UDP-GlcNAc również została zachowana. Przeprowadzona mutageneza nie wpłynęła na oligomeryzację białka, a muteina wciąż występuje w formie homotetrameru.

5.2. Próby opracowania warunków krystalizacji syntazy GlcN-6-P z Candida albicans

Dużą część swoich badań prowadzonych, w ramach pracy doktorskiej poświęciłam krystalizacji syntazy GlcN-6-P z *C. albicans.* Przed przystąpieniem do tych prób przeprowadziłam analizę bioinformatyczną, której wyniki pozwoliły oszacować prawdpodobieństwo uzyskania kryształów białka.

5.2.1. Analiza bioinformatyczna predyspozycji białka do krystalizacji

Dzięki metodom bioinformatycznym w duży stopniu można określić zdolność krystalizacji danego białka. Metody te opierają się na analizie porównawczej poszczególnych cech danego białka do statystycznych danych innych białek poddanych próbie krystalizacji w obrębie danej właściwości. Wyniki tej analizy przedstawiono na Rys. 43.





Rys. 43. Analiza porównawcza właściwości białek w odniesieniu do prawdopodobieństwa krystalizacji: (A) Długość łańcucha aminokwasowego; (B) punkt izoelektryczny; (C) Index Gravy (rozpuszczalność białka); (D) Najdłuższy obszar zaburzenia; (E) Index niestabilności białka; (F) Procent struktury cewki; (G) Zwoje cewki; (H) Ocena wstawiania; (I) Entropia powierzchni; (J) Hydrofobowość powierzchni; (K) Chropowatość powierzchni. Legenda: niebieski słupek – zaobserwowane sukcesy w krystalizacji białek o danej właściwości; szary słupek – zaobserwowane porażki w krystalizacji białek o danej właściwości; czarna linia – prawdopodobieństwo krystalizacji; czerwona linia – usytuowanie CaGfa1 w rozkładzie danej cechy. Analizę wykonałam za pomocą programu XtalPred (http://services.mbi.ucla.edu/SER/).

Sumaryczna analiza cech biochemicznych i biofizycznych klasyfikuje *Ca*Gfa1 do grupy 5 (w skali 1-5) (Rys. 44). Natomiast bardziej szczegółowa analiza, przewidywanej zdolności białka do krystalizacji, rozszerzona o właściwości powierzchni makrocząsteczki (tj. hydrofobowość, entropię łańcuchów bocznych aminokwasów na powierzchni białka oraz przewidywaną odporność powierzchni istotną w szczególności dla białek globularnych), klasyfikuje *Ca*Gfa1 do grupy 11 (w skali 1-11) (Rys. 45). Drugi parametr jest dużo lepszy w określaniu predyspozycji białka do krystalizacji, gdyż uwzględnia charakterystykę

powierzchni białka, która odpowiada za tworzenie połączeń między pojedynczymi cząsteczkami, co w konsekwencji wpływa na zdolność białka do krystalizacji. Biorąc pod uwagę, że wartości entalpii oddziaływań międzycząsteczkowych w sieci krystalicznej są zazwyczaj małe, oznacza że krystalizacja jest bardzo wrażliwa na zmiany entropii związane zarówno z białkiem jak i rozpuszczalnikiem. Oba wskaźniki określają syntazę GlcN-6-P z *C. albicans* jako białko bardzo trudne do krystalizacji, a prawdopodobieństwo uzyskania kryształów jest bardzo niskie.



Rys. 44. (A) Sumaryczna analiza porównawcza cech biochemicznych i biofizycznych (Rys. 34 A-H) z podziałem na klasy krystalizacji i z zaznaczeniem usytuowania *Ca*Gfa1 (klasa 5). Skala klasyfikacji: 1 – optymalny; 2 – suboptymalny; 3 – średni; 4 – trudny; 5 – bardzo trudny. **(B)** Podział klas krystalizacji z zaobserwowanymi sukcesami i porażkami w krystalizacji białek. Analizę wykonanałam za pomocą programu XtalPred (http://services.mbi.ucla.edu/SER/).



Rys. 45. Rozszerzona analiza przewidywanej zdolności białka do krystalizacji rozszerzona o właściwości powierzchni białka (Rys. 34 A-K) z podziałem na klasy krystalizacji i z zaznaczeniem usytuowania *Ca*Gfa1 (klasa 11). Skala klasyfikacji: 1 - 11. Analizę wykonanałam za pomocą programu XtalPred (http://services.mbi.ucla.edu/SER/).

5.2.2. Analiza agregacji białek

Niezwykle istotne znaczenie dla krystalizacji białek ma również ich podatność do tworzenia Zdolność makrocząsteczek agregatów. do tworzenia wiązań międzycząsteczkowych, a w konsekwencji złożonych struktur, w dużym stopniu jest zależna od warunków przechowywania. Białka w postaci zagregowanej nie są w stanie stworzyć kryształów o jakości odpowiedniej do pomiarów dyfrakcyjnych. Sugerując się powyższą analiza bioinformatyczna dotyczaca właściwości powierzchni białka (Rys. 43 I-K), bardzo prawdopodobne jest tworzenie przez CaGfa1 silnych oddziaływań międzycząsteczkowych, a w konsekwencji złożonych form agregacyjnych. Zatem istotne jest, aby ustalić warunki, w których białko zachowuje formę monodyspersyjną.

Pomiar oceny stopnia agregacji białek wykonałam za pomocą spektrofotometru do pomiaru dynamicznego rozpraszania światła (DLS – Dynamic Light Scrattering), przy współpracy z zespołem prof. W. Rypniewskiego w PAN (Poznań). Testy wykonałam dla rekombinantowej syntazy GlcN-6-P z wewnętrznym mikro fragmentem oligoHis (*Ca*Gfa1-K568HS569H) – jako przedstawiciela pełnej tetramerycznej formy *Ca*Gfa1 (Materiały i Metody 4.13).

Jest to metoda wykorzystująca optyczny pomiar masy cząsteczkowej. Zaletą tej techniki jest szybki pomiar, nie wymagający stosowania wzorców masowych. Natomiast wadą pomiaru DLS jest odchylenie intensywności światła rozproszonego w kierunku większych cząsteczek, co w konsekwencji daje zawyżoną intensywność dla większych cząsteczek (Rys. 46A). DLS zakłada że każda cząsteczka ma kształt koła, w związku z czym w przypadku cząsteczki wydłużonej krótsze boki zostają zamaskowane przez silniejszy sygnał pochodzący od dłuższych boków. Właściwy stan agregacji makrocząsteczek przedstawiony jest dopiero w stosunku ilości białka do jego wielkości (Rys. 46B).



Rys. 46. Analiza agregacji *Ca*Gfa1-K568HS569H – 3 powtórzenia. Pomiar wykonany na spektrofotometrze DLS typu Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.). Pomiar wyrażony w zależności: (A) intensywność od wielkości cząsteczki; (B) objętość od rozmiaru.

W przypadku przeprowadzonych testów zaobserwowałam zależność agregacji makrocząsteczek od warunków przechowywania. W efekcie stwierdzam, że optymalnym buforem zapewniającym formę monodyspersyjną syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* jest 0 mM Hepes z 1 mM DTT o pH 7,0 w temperaturze 4°C (Tab. 15).

	<i>Ca</i> Gfa1- K568HS569H
% Polidyspersji	14,6
% Intensywności	85,1
% Wielkości	100,0
Forma białka	Monodyspersja
Warunki przechowywania	10 mM Hepes 1 mM DTT pH 7,0

Tab. 15. Zestawienie wyników z pomiaru dynamicznego rozpraszania światła dla *Ca*Gfa1-K568HS569H. Pomiar wykonany na spektrofotometrze DLS typu Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.).

5.2.3. Próby krystalizacji syntazy GlcN-6-P

Pomimo klasyfikacji syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* jako białko o niskiej predyspozycji do krystalizacji, podjęłam wiele prób w celu otrzymania kryształu o odpowiedniej wielkości i jakości do badań rentgenograficznych.

Wykonałam wiele prób krystalizacji zarówno dla *Ca*Gfa1 typu dzikiego [Sachadyn i in. 2000], pochodnej *Ca*Gfa1-K568HS569H (Rozdział 5.1) oraz dla rekombinantowej domeny

GAT syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z fragmentem 6-His na C-końcu - dGAH-His₆C [Olchowy i in. 2007].

Dokładne procedury przygotowania preparatów białkowych otrzymanych przeze mnie, zostały opisane we wcześniejszych rozdziałach, natomiast dla dGAH-His₆C dokładną procedurę oczyszczania opracował dr inż. J. Olchowy [Olchowy i in. 2007].

Pracę nad krystalizacją białek zaczęłam od nastawienia prób krystalizacyjnych w możliwie jak największej ilości różnych warunków, korzystając z zestawów komercyjnie dostępnych (Materiały i Metody 4.14). Po wstępnych badaniach przesiewowych, wytypowałam kilka warunków dla poszczególnych enzymów i przeprowadziłam optymalizację danych warunków (Rys. 47-52).



Rys. 47. *Ca*Gfa1 (9 mg/ml) w kompleksie z ligandem Fru-6-P (10 mM). Skupiska drobnych igiełek, za małe do rozpraszania. Zalecana dalsza optymalizacja. Warunki krystalizacyjne: 0,1 M HEPES sodium; 10% v/v 2-Propanol; 20% w/v Polyethylene glycol 4000; pH 7,5; temp. 4°C.



Rys. 48. *Ca*Gfa1 (9 mg/ml) w kompleksie z inhibitorem UDP-GlcNAc (5 mM) i Glc-6-P (10 mM). Skupiska drobnych igiełek, za małe do rozpraszania. Zalecana dalsza optymalizacja. Warunki krystalizacyjne: 0,1 M Tris; 0,01 M NiCl₂; 1,0 M Li₂SO₄; pH 8,5; temp. 4°C.



Rys. 49. *Ca*Gfa1-K568HS569H (10 mg/ml) z inhibitorem UDP-GlcNAc (5 mM) – dwie próby różniące się stosunkiem ilości preparatu białka do rezerwuaru w kropli (z lewej strony stosunek odpowiednio 0,2 μ l:0,4 μ l; z prawej 0,3 μ l:0,3 μ l). Występują dwie formy kryształów: prostopadłaścian – zbadany na synchrotronie (kryształ nie rozpraszał); skupisko igiełek – za małe na pomiar rentgenograficzny. Warunki do dalszej optymalizacji. Warunki krystalizacyjne: 0,1 M Tris; 0,2 M MgCl₂; 8% w/v PGA-LM; pH 7,8; temp. 19°C.



Rys. 50. dGAT-His₆C (15 mg/ml). Kryształ nie rozpraszał. Warunki krystalizacyjne: 0,1 M MES monohydrate; 0,01 M ZnSO₂*7H₂O; 25% v/v PEG monomethyl ether 550; pH 6,5; temp. 19°C.



Rys. 51. dGAT-His₆C (15 mg/ml). Podobne kryształy pojawiły się w próbie dla próby z samym białkiem i w próbie dla białka z ligandem L-Gln (10 mM). Kryształ nie rozpraszał. Warunki krystalizacyjne: 0,1 M Bis-Tris, 0,2 M CaCl₂*2H₂O, 45% v/v (+/-)-2-methyl-2,4-pentanediol, pH 5,5, temp. 4°C.



Rys. 52. dGAT-His₆C (15 mg/ml). Kryształ nie rozpraszał. Warunki krystalizacyjne: 0,1 M Bis-Tris, 0,2 M CaCl₂*2H₂O, 45% v/v (+/-)-2-methyl-2,4-pentanediol, pH 6,5, temp. 4°C.

W efekcie przeprowadzonych prób krystalizacji syntazy GlcN-6-P typu dzikiego i jej pochodnych niestety nie otrzymałam kryształów umożliwiających zebranie danych dyfrakcyjnych. Otrzymane przeze mnie kryształy białka były zbyt małe aby rozpraszać. W przypadku całej cząsteczki syntazy GlcN-6-P pojawiające się kryształy przybierały kształt drobnych i cieniutkich igiełek, występujących w skupiskach tworzących "jeże". Podobne kryształy, ale większe i o lepszej jakości, dla domeny ISOM syntazy GlcN-6-P otrzymał Olchowy [Olchowy i in. 2005]. W związku z tym można podejrzewać, że cząsteczka syntazy GlcN-6-P jako tetramer, krystalizuje w postaci wąskich i podłużnych struktur, a prowadzona przeze mnie optymalizacja zmierzała w dobrym kierunku. Natomiast w przypadku krystalizacji domeny GAT syntazy GlcN-6-P, otrzymałam kryształy o różnym kształcie (Rys. 50-52), niestety nie były one o jakości wystarczające do wykonania pomiarów i zebrania danych do analizy. W celu otrzymania kryształów większych i o odpowiedniej jakości należałoby:

- przeprowadzić dalszą optymalizację warunków określonych przeze mnie (warunki opisane przy poszczególnych Rys. 47-52);
- wykonać próby krystalizacji z innymi ligandami, które potencjalnie usztywnią strukturę białka;
- wykonać próby krystalizacji preparatów białkowych po modyfikacji chemicznej, np. metylacja reszt Lys;

Syntaza GlcN-6-P jest białkiem złożonym, zawierającym wiele elastycznych elementów, które nadają całej cząsteczce enzymu dużej ruchliwości. Zatem otrzymanie kryształów takiego białka jest procesem bardzo trudnym oraz wymagającym wiele czasu i pracy.

5.3. Określanie roli reszt istotnych dla tworzenia struktury oraz regulacji aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu z *C. albicans* poprzez ukierunkowaną mutagenezę genu kodującego ten enzym

Wiadomo, że syntaza GlcN-6-P z organizmów eukariotycznych, na poziomie sekwencji łańcucha polipeptydowego, wykazuje duże podobieństwo do enzymu bakteryjnego, ale mimo tego obserwuje się również wiele cech odmiennych. Należą do nich m. in.: tetrameryczna budowa białka, obecność w domenie GAT dodatkowego fragmentu o nie całkowicie poznanej funkcji, podatność na działanie fizjologicznego inhibitora - UDP-GlcNAc oraz regulacja aktywności poprzez fosforylację-defosforylację. Od wielu lat w KTLiB PG prowadzone są badania wyjaśniające rolę poszczególnych obszarów w cząsteczce CaGfa1. W wyniku tych badań do tej pory potwierdzono lokalizacje miejsca fosforylacji białka przez cAMP-zależną kinazę białkową i ustalono rolę fosforylacjidefosforylacji syntazy w metaboliźmie C. albicans [Gabriel i in. 2004]. Uzyskano także informacje na temat roli dodatkowego fragmentu w domenie GAT [Olchowy i in. 2007]. Dokładna struktura przestrzenna eukariotycznej wersji syntazy GlcN-6-P nie została dotychczas poznana, natomiast poznano strukturę domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z C. albicans w kompleksie z UDP-GlcNAc, a dla całego białka do tej pory uzyskano jedynie bardzo przybliżone dane strukturalne metodą SAXS [Raczyńska i in. 2007]. W ramach swoich badań skupiłam się na analizie:

- reszt potencjalnie odpowiedzialnych za wiązanie cząsteczki inhibitora UDP-GlcNAc (Rozdział 5.2.1)
- reszt biorących udział w kontakcie między poszczególnymi podjednostkami, odpowiedzialnymi za tworzenie struktury tetramerycznej (Rozdział 5.2.2).

Dokładny opis przeprowadzonych mutagenez oraz charakterystyki otrzymanych rekombinantów przedstawiam w dalszej części pracy. Natomiast na Rys. 53 przedstawiam lokalizację analizowanych przeze mnie obszarów w cząsteczce *Ca*Gfa1.



Rys. 53. Obraz struktury tetrameru domen ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z zaznaczonymi obszarami: centrum aktywnym w domenie ISOM – żółta kule (wielkością odpowiadające Fru-6-P); miejsce wiązania inhibitora UDP-GlcNAc – czerwone kule (wielkością odpowiadające kieszeni); obszar wiązania poszczególnych podjednostek, tworzących strukturę tetrameru – zielone przestrzenie. Modelowanie wykonane przez dr M. Wojciechowskiego.

5.3.1. Ukierunkowana mutageneza obszaru wiązania UDP-GlcNAc

5.3.1.1. Analiza struktury przestrzennej syntazy GlcN-6-P w celu wybrania optymalnego kierunku mutagenezy w miejscu wiązania UDP-GlcNAc

Ustalenie struktury tetramerycznej domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* w kompleksie z inhibitorem UDP-GlcNAc [Raczyńska i in. 2007] umożliwiło określenie reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za tworzenie wiązań wodorowych oraz za formowanie kieszeni, wiążącej cząsteczkę inhibitora. Reszty te w sekwencjach syntazy GlcN-6-P ze źródeł eukariotycznych (włącznie z *Caenorhabditis elegans*) są wysoce zakonserwowane, natomiast w odpowiadających im pozycjach w prokariotycznej wersji enzymu, w tym w syntazie GlcN-6-P np. z *E. coli* występują inne reszty, nie mogące tworzyć wiązań wodorowych lub powodujące zawadę przestrzenna (Rys. 54).

HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	CGIFAYLNYHVPRTRREILETLIKGLQRLEYRGYDSAGVGFDGGNDKDWEANACKIQ CGIFAYLNFLTPKKRSEIVDILVQGLQRMEYRGYDSAGIAIDGSNEIESPHSSVA CGIFGYVNFLVDKSRGEIIDNLIEGLQRLEYRGYDSAGIAVDGKLTKDPSNGDEEYMDSI CGIVGAIAQRDVAEILLEGLRRLEYRGYDSAGLAVVDAEGHMT *** : :: : *::**:*********	57 55 60 43
HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	LIKKKGKVKALDEEVHKQQ-DMDLDIEFDVHLGIAHTRWATHGEPSPVNSHPQRSDKNNE LLRKAGKVSVLSDFIKESSSDLDMDMEYNIHCGIAHTRWATHGSPRDVNSHPHRSNDKNE IVKTTGKVKVLKQKIIDDQIDRSAIFDNHVGIAHTRWATHGQPKTENCHPHKSDPKGE RLRRLGKVQMLAQAAEEHPLHGGTGIAHTRWATHGEPSEANAHPHVSEH :: ***. *: ****************************	116 115 118 92
HSGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 ECGLMS	FIVIHNGIITNYKDLKKFLESKGYDFESETDTETIAKLVKYMYDNRESQDTSFTTLVE FLVVHNGIITNYREIKEYLEKKGHKFESETDTEVIAKLAQHIHDRYPDFSFRQLVE FIVVHNGIITNYAALRKYLLSKGHVFESETDTECIAKLFKHFYDLNVKAGVFPDLNELTK IVVVHNGIIENHEPLREELKARGYTFVSETDTEVIAHLVNWELKQGGTLREAVL ::*:***** *: ::: * :*: * ****** **:*:	174 171 178 146
HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	RVIQQLEGAFALVFKSVHFPGQAVGTRRGSPLLIGVRSEHKLSTDHIPILYRTARTQIGS TVIQQLEGAFALAFKSSRFPGQLVASRRGSPLLVGIKSNSRLQTNHFPVSFSKGRRFMSN QVLHELEGSYGLLVKSYHYPGEVCGTRKGSPLLVGVKTDKKLKVDFVDVEFEAQQHRPQ RAIPQLRGAYGTVIMDSRHPDTLLAARSGSPLVIGLGMG	234 231 238 185
HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	K-FTRWGSQGERGKDKKGSCNLSRVDSTTCLFPVEEKAVEYYFAS H-ATHLRDETSFVETPNNILDLSIAVRSSNGSAKMEISDSTTAVRPFDSDDWEVEYFVAS QPQINHNGATSAAELGFIPVAPGEQNLRTSQSR-AFLSEDDLPMPVEFFLSS ENFIAS * :.:*	278 290 289 191
HSGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 ECGLMS	DASAVIEHTNRVIFLEDDDVAAVVDGRLSIHRIKRTAGDHPG-RAVQTLQMELQQIMKGN DAAAIIEHTKQVLFLEDDDVAFVEDGALTIHRISRHADNGEQKREVKLLEMELQEIMKGS DPASVVQHTKKVLFLEDDDIAHIYDGELRIHRASTKSAGESTVRPIQTLEMELNEIMKGP DQLALLPVTRRFIFLEEGDIAEITRRSVNIFDKTGAEVKRQDIESNLQYDAGDKGI * ::: *.:.:***:.*: : *. *	337 350 349 247
HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	FSSFMQKEIFEQPESVVNTMRGRVNFDDYTVNLGGLKDHIKEIQ-RCRRLILIACGTSYH FKTYMQKEIFEQPDSVVNTMRGRV-LPSGQVVLGGIKEYLPDIK-RCRLIMVACGTSYH YKHFMQKEIFEQPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIR-RCRIIMIACGTSYH YRHYMQKEIYEQPNAIKNTLTGRISHGQVDLSELGPNADELLSKVEHIQILACGTSYN : :*****: ***: * *: : : : : : : : : : :	396 408 408 305
HSGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	AGVATRQVLEELTELPVMVELASDFLDRNTPVFRDDVCFFLSQSGETADTLMGLRYCKER SAIACRQILEELSELPVVVELASDFLDRETPIFRDDVCLFISQSGETADTLLALRYCKPR SCLATRSIFEELTEIPVSVELASDFLDRRSPVFRDDTCVFVSQSGETADSILALQYCLER SGMVSRYWFESLAGIPCDVEIASEFRYRKSAVRRNSLMITLSQSGETADTLAGLRLSKEL : :. * :*.*: :* **:**: *: *:.	456 468 468 365
HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	GAL-TVGITNTVGSSISRETDCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQFVSLVMFALMMCDDRIS GAL-TIGVTNTVCSSICRESHCGIHINAGPEIGVASTKAYTSQILSLLMFALTLSDDRIS GAL-TVGIVNSVGSSMSRQTHCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSNDSIS GYLGSLAICNVPGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAKLSR <mark>LK</mark> GL * * ::.: * ***: *::. : ***.********	515 527 527 425
HSGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	MQERRKEIMLGLKRLPDLIKEVLSMDDEIQKLAT-ELYHQKSVLIMGRGYHYATCLEGAL MAKRREEIIDALNDLPELIREVLQLDEKVLDIAK-QIYKEKSLLIMGRGLNFATCLEGAL RKGRHEEIIKGLQKIPEQIKQVLKLENKIKDLCNSSLNDQKSLLLLGRGYQFATALEGAL DASIEHDIVHGLQALPSRIEQMLSQDKRIEALAE-DFSDKHHALFLGRGDQYPIALEGAL *: .*: :*. *:*. : : *::****	574 586 587 484
HSGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	KIKEITYMHSEGILAGELKHGPLALVDKLMPVIMIIMRDHTYAKCQNALQQVVARQGRPV KIKELSYMHCEGIMSGELKHGPLAMVDEFLSICMVVCNDRVYKKSLNALQQVVARKGAPI KIKEISYMHSEGVLAGELKHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARDGRPI KLKEISYIHAEAYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNNELLEKLKSNIEEVRARGGQLY *:**::*:*:*: *: :: :: *::: *::: *:::	634 646 647 544
HsGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 EcGLMS	VICDKEDTET-IKNTKRTIKVPHSVDCLQGILSVIPLQLLAFHLAVLRGYDVDFPRNLAK IIADCTVPEGDLAGMKHILRVPKTVDCVQNILTVIPLQLLSYHIAELNGANVDRPRNLAK VICNEGDAIISNDKVHTTLEVPETVDCLQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPRNLAK VFADQDAGFVSSDNMH-IIEMPHVEEVIAPIFYTVPLQLLAYHVALIKGTDVDQPRNLAK :::: : : ::::::::::::::::::::::::::::	693 706 707 603
HSGFAT1 CeGFAT1 CaGFA1 ECGLMS	SVTVE 698 SVTVE 711 SVTVE 712 SVTVE 608	

Rys. 54. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych syntazy GlcN-6-P z *Candida albicans (CaGFA1)*, *Escherichia coli (EcGLMS)*, *Homo sapiens (HsGFAT1)* i *Caenorhabditis elegans (CeGFAT1)*. Na zielono zaznaczono reszty aminokwasowe uznane za najistotniejsze w wiązaniu UDP-GlcNAc w *CaGFA1* i odpowiadające im reszty w enzymie z innych żródeł; na czerwono - reszty uznane za najistotniejsze w kontakcie między podjednostkami w strukturze tetramerycznej CaGFA1 i odpowiednie im reszty w białkach homologicznych. Analizę wykonałam na podstawie programu ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Kierując się tymi wskazówkami uznałam za celowe wymianę następujących reszt aminokwasowych (Rys. 55 i 56):

- Gly474 znajduje się na dnie kieszeni białkowej, w której wiąże się pierścień uracylu UDP-GlcNAc. W sekwencji *EcGLMS*, Gly474 odpowiada reszta Ala372, której grupa metylowa wypełnia przestrzeń dna kieszeni uniemożliwiając wiązanie inhibitora. Na drodze mutagenezy ukierunkowanej Gly474 wymieniłam na Leu, czyli aminokwas o rozgałęzionym łańcuchu bocznym, tworząc zawadę przestrzenną dla pierścienia uracylu.
- Thr487 znajduje się na dnie kieszeni białkowej i stanowi akceptor dla atomu azotu N3 pierścienia uracylu UDP-GlcNAc. Resztę Thr487 wymieniłam na Ile, której reszta nie posiada w łańcuchu bocznym elementów mogących tworzyć wiązania wodorowe, a dodatkowo tworzy większą zawadę przestrzenną utrudniając prawidłowe wejście inhibitora.
- Gly490 należy do reszt 489-491 formujących płaski, równoległy do pierścienia uracylu brzeg kieszeni białkowej wiążącej UDP-GlcNAc. W sekwencji *EcGLMS* reszcie Gly490 z *CaGFA1* odpowiada Ala388, której łańcuch boczny częściowo wypełnia przestrzeń wejścia do kieszeni oraz zwiększa sztywność łańcucha głównego peptydu, blokując w ten sposób wejście inhibitora do kieszeni. Resztę Gly490 wymieniłam na Leu, celowo wywołując w ten sposób jeszcze większą zawadę przestrzenną przy wejściu do obszaru wiązania inhibitora.
- His492 znajduje się na bocznej ścianie tuż przy wejściu do kieszeni białkowej i odpowiada za tworzenie wiązań wodorowych z atomem tlenu grupy fosforanowej UDP-GlcNAc. Resztę His492 wymieniłam na Phe, której reszta fenylowa, zajmuje przestrzeń podobną do pierścienia imidazolowego His, ale nie zawiera grup funkcyjnych mogących uczestniczyć w wiązaniu wodorowym.



Rys. 54. Obszar wiązania UDP-GlcNAc w domenie ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z szczegółowo przedstawionymi oddziaływaniami inhibitora UDP-GlcNAc z poszczególnymi resztami aminokwasowymi [Raczyńska i in. 2007].



Rys. 55. Obszar miejsca wiązania UDP-GlcNAc w domenie ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans:* (A) powierzchnia kieszeni wiążącej z cząsteczką UDP-GlcNAc przed mutagenezą; (B) powierzchnia kieszeni wiążącej bez inhibitora po mutagenezie; (C) przeźrocze powierzchni kieszeni wiążącej z UDP-GlcNAc i z zaznaczonymi resztami zaproponowanymi do mutagenezy (stan przed mutagenezą); (D) przeźrocze powierzchni kieszeni bez inhibitora, ale z oznaczonymi resztami wprowadzonymi podczas mutagenezy. Modelowanie wykonane przez dr M. Wojciechowskiego.

5.3.1.2. Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych

W celu wprowadzenia określonej zmiany genetycznej do genu kodującego syntazę GlcN-6-P z *C. albicans (CaGFA1)* wykorzystałam mutagenezę ukierunkowaną, opartą o reakcję PCR. Zaplanowane zmiany genetyczne wprowadzałam stopniowo, tak aby w wyniku kolejnego etapu wymieniana była pojedyncza reszta aminokwasowa, co dawało możliwość późniejszej analizy pośrednich produktów, zawierających pojedyncze mutacje. Zmiany genetyczne wprowadzane w jednym kroku są na tyle małe, że możliwe było wprowadzenie ich poprzez zmianę sekwencji nukleotydowej na jednym starterze. Jako matrycę w pierwszej reakcji PCR wykorzystałam plazmid pET23b zawierający gen kodujący syntazę GlcN-6-P z *C. albicans* – pET23b-*CaGFA1* [Sachadyn i in. 2000], natomiast w kolejnych reakcjach – matryce stanowił produkt z poprzedniej mutagenezy (Tab. 16). Mutagenezę ukierunkowaną, wymieniającą poszczególne reszty, wykonałam wg schematu przedstawionego na Rys. 34.

Tab. 16. Zestawienie danych dotyczących czterech kolejnych mutagenez ukierunkowanych w projekcje badania obszaru i reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie UDP-GlcNAc w Gfa1 z *C. albicans.* Zmiany genetyczne wprowadzane w jednym kroku są zaznaczone jednym kolorem. Docelowo wymieniane nukleotydy są podkreślone. W nazwach rekombinantowych plazmidów wymienione reszty zaznaczyłam wg kolejności wprowadzanych zmian. Natomiast w dalszej części pracy wymienione reszty oznaczam wg kolejności w sekwencji: *CaGFA1-G474LT487IG490LH492F.*

	Matryca	Startery	Produkt	Uwagi
1.	pET23b CaGFA1	<i>Ca</i> Gfa1-H492Fm: 5'P-AATGCTGGGCCAGAAATTGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-H492Fk: 5'P-AATAAAAAACCCCACAATGGG 3'	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F</i>	His492 \rightarrow Phe 5' <u>CA</u> T 3' \rightarrow 5' <u>TT</u> T 3' Produkt potwierdzony.
2.	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F</i>	<i>Ca</i> Gfa1-T487Im: 5'P-AGACAA <mark>ATC</mark> CATTGTGGGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-T487Ik: 5'P-AGACATTGAAGAACCAACAGAG 3'	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-</i> <i>T487I</i>	Thr487 \rightarrow Ile 5'A <u>C</u> C 3' \rightarrow 5'A <u>T</u> C 3' Produkt potwierdzony.
3.	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T487I</i>	<i>Ca</i> Gfa1-G490Lm: 5'P-AATBCTGGGCCAGAAATTGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-G490Lk: 5'P-AATAAAAACCAGACAATGGATTTGTC 3'	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T487I-</i> <i>G490L</i>	Gly490 \rightarrow Leu 5' <u>GG</u> G 3' \rightarrow 5' <u>CT</u> G 3' Produkt potwierdzony.
4.	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T487I-</i> <i>G490L</i>	<i>Ca</i> Gfa1G474Lm: 5' P-AACTCTGTTGGTTCTTCAATGTC 3' <i>Ca</i> Gfa1G474Lk: 5' P-AACGATAAGAACAGTTAAAGCTCC 3'	pET23b <i>CaGFA1-</i> <i>H492F-T487I-</i> <i>G490L-G474L</i>	Gly474 \rightarrow Leu 5' <u>GG</u> T 3' \rightarrow 5' <u>CT</u> T 3' Produkt potwierdzony.

Poprawność otrzymanych plazmidów rekombinantowych potwierdziłam poprzez analizę restrykcyjną (Maretiały i Metody 4.3.3) (Rys. 56) oraz sekwencjonowanie (firma Genomed, Warszawa).



Rys. 56. Rozdział elektroforetyczny produktów analizy restrykcyjnej plazmidu pET23b-*CaGFA1-G474LT487IG490LH492F*M - marker DNA M10kpz (10037; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2500; 2000; 1500/1517; 1000; 800; 600; 400; 200 [pz])
1 - pET23b-*CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* trawiony *Eco*RI (3978; 1296; 498 [pz])
2 - pET23b-*CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* trawiony *SspI* (4239; 1402; 131 [pz])
3 - pET23b-*CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* trawiony *NdeI* i *XhoI* (3586; 2186 [pz])
4 - pET23b-*CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* trawiony *Bam*HI (5772 [pz])
5 - pET23b-*CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* (5772 [pz])
Kontrolę analizy stanowi symulacja trawienia restrykcyjnego dla *Ca*Gfa1 przedstawiona na Rys. 26.

Dalsze badania na poziomie hodowli, oczyszczania i charakterystyki przeprowadziłam tylko dla finalnego mutanta *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F. Pośrednie białka rekombinantowe: *Ca*Gfa1-H492F, *Ca*Gfa1-T487IH492F i *Ca*Gfa1-T487IG490LH492F zostaną przebadanie, gdy pojawi się potrzeba sprawdzenia wpływu konkretnej pojedynczej reszty aminokwasowej.

5.3.1.3. Nadekspresja genów kodujących rekombinantową syntazę GlcN-6-P w komórkach E. coli

Do nadekspresji genu CaGFA1-G474LT487IG490LH492F wykorzystałam szczepy E. coli BL21 (DE3)pLysS, E. coli Rosetta (DE3)pLysS i E. coli Rosetta (DE3)pLacI, których transformowałam rekombinantowy plazmid pET23b-CaGFA1do *G474LT487IG490LH492F* (Materiały i Metody 4.4.2). Optymalizację hodowli przeprowadziłam w zakresie tych samych czynników zmiennych, co w poprzedniej części pracy (opisane w Rozdziale 5.1.3, Materiały i Metody 4.5). Jako kontrolę ekspresji rekombinantowego genu stosowałam odpowiednio te same szczepy E. coli, transformowane "pustym" plazmidem pET23b (bez genu CaGFA1).

Efekt przeprowadzonej optymalizacji analizowałam za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1). Na podstawie otrzymanych rozdziałów elektroforetycznych białek z lizatów z poszczególnych hodowli w różnych warunkach, stwierdzam:

- Nadprodukcja muteiny najwydajniej zachodzi w komórkach ekspresyjnych E. coli Rosetta(DE3)pLysS, w których prążek pochodzący od genu CaGFA1-G474LT487IG490LH492F jest dominujący.
- W przypadku dwóch pozostałych badanych szczepów E. coli BL21(DE3)pLysS i E. coli Rosetta(DE3)pLacI również zaobserwowałam prążki, potwierdzające obecność rekombinanta CaGfa1, jednak ich intensywność była dużo mniejsza niż w lizatach z komórek E. coli Rosetta(DE3)pLysS, co świadczy o słabszej wydajności ekspresji pożądanego genu.
- Analizując otrzymane wyniki w różnych warunkach hodowli, w ramach tych samych komórek ekspresyjnych stwierdziłam, że poziomy intensywności prążków pochodzących od mutanta są bardzo zbliżone. Oznacza to, że zarówno IPTG jak i laktoza (w zakresie testowanych stężeń) są równie dobrymi induktorami. Natomiast temperatura hodowli nie ma znaczenia na poziom ekspresji, o ile wraz z obniżeniem temp. z 37°C do 30°C czas inkubacji zostanie wydłużony co najmniej 3 krotnie.

Ostatecznie, w celu uzyskania powtarzalności, jako najlepsze warunki dla hodowli właściwej, uznałam ekspresję *CaGFA1-G474LT487IG490LH492F* w komórkach *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, gdy indukcja następowała poprzez dodanie IPTG (do końcowego stężenia 0,1 mM) po osiągnięciu przez komórki gęstości $OD_{600} = 0,5-0,6$ i dalszej hodowli w 30°C przez ok. 18 godzin. W powyższych warunkach hodowli, muteina stanowiła ok. 20% wszystkich białek występujących w komórkach *E. coli*, co sumarycznie odpowiadało ok. 10-20 mg/l *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F (Rys. 57).



Rys. 57. (A) Analiza elektroforetyczna nadekspresji *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F (10% żel poliakrylamidowy): M— marker PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 [kDa]; 1— lizat hodowli *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS, indukcja IPTG (0,1 mM) $OD_{600} = 0,5$ (30°C, ok.18h). (B) Analiza densytometryczna ścieżki 1, wykonana w programie GelQuantPro. Powierzchnia pod sygnałem *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F stanowi 19% wszystkich białek.

5.3.1.4. Oczyszczanie muteiny CaGfa1-H492FT487IG490LG474L

Muteinę *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F, podobnie jak *Ca*Gfa1 typu dzikiego z komórek *E. coli* izolowałam za pomocą wieloetapowej procedury. Cały proces oczyszczania składał się z kilku etapów, ale można go podzielić na dwie charakterystyczne części:

- I. metody wytrąceniowe oczyszczanie wstępne (Materiały i Metody 4.6.2).
 W efekcie otrzymałam preparat białkowy pozbawiony m. in. DNA i części niespecyficznych białek. Jednakże, w dalszym ciągu z dużym stopniem zanieczyszczenia.
- II. chromatografia jonowymienna oczyszczanie właściwe (Materiały i Metody 4.6.3).
 W celu otrzymania jak najbardziej homogennych preparatów białkowych, rozdział przeprowadziłam w węższym zakresie gradientu od 0,15-0,55 M NaCl (Rys. 58).
 Wszystkie otrzymane piki poddałam analizie elektroforetycznej i reakcji aktywności katalitycznej enzymu. W efekcie stwierdziłam, że pochodna syntazy GlcN-6-P została wymywana z kolumny ResourceQ przy stężeniu NaCl ok. 17-23 mM i zachowała aktywność katalityczną w granicach 0,19-0,41 U/mg. Różnice w stopniu zachowanej aktywności specyficznej w różnych partiach oczyszczania oraz w porównaniu z *Ca*Gfa1 = 7,55 U/mg (wersją dziką) mogą wynikać z długości przeprowadzania



poszczególnych etapów oczyszczania oraz aktualnego stanu złoża w kolumnie chromatograficznej.

Rys. 58. Profil elucji preparatu zawierającego białko *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F z kolumny ResourceQ (linia zielona – gradient 0,15-0,55M NaCl; linia niebieska – chromatogram wypływu białka; oznaczenia czerwone – zbierane frakcje) i analiza elektroforetyczna SDS-PAGE z zebranych frakcji: M – marker PageRuler Protein Ladder: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 [kDa]; EB – ekstrakt bezkomórkowy z hodowli; 1 – frakcja z 17-23 mM NaCl; 2 – frakcja z 23-26 mM NaCl; 3 – frakcja z 26-30 mM NaCl.

Finalnie w wyniku całego procesu oczyszczania z 1 dm³ hodowli otrzymałam ok. 9 *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F o aktywności mg specyficznej rzedu 0,18-0,41 U/mg i homogenności ok. 80% (Tab. 17). Podczas takiego samego protokołu oczyszczania dzikiego typu CaGfal otrzymałam preparat o czystości blisko 95% i o aktywności 7,55 U/mg (wydajność ok. 16%, współczynnik oczyszczania ok. 9.52) [Czarnecka i in. 2012]. Wstępnie stwierdziłam, że proces oczyszczania dla muteiny zakończył się lepszą wydajnością, ale kosztem gorszej czystości preparatu białkowego. Końcowa wydajność i stopień czystości zależy głównie od aktualnego stanu kolumny chromatograficznej, ale nie jest to efekt mutagenezy. Jednakże już na tym etapie badań należy zwrócić uwagę na dużo niższą aktywność katalityczną białka rekombinantowego w stosunku do enzymu typu dzikiego, co może być spowodowane zmianami strukturalnymi, jednak brak na to jednoznacznych dowodów. Dokładna analiza parametrów kinetycznych muteiny znajduje się w dalszej części pracy.

	Objętość frakcji [ml]	Stężenie białka [mg/ml]	Całkowita ilość białka [mg]	Aktywność specyficzna enzymu [U/mg]	Aktywność całkowita enzymu [U]	Współczynnik oczyszczania	Wydajność [%]	
<i>Ca</i> Gfa1-G474LT487IG490LH492F								
EB	EB 8,50 11,67 99,20 0,03 2,48 1 100							
Ι	6,00	8,23	49,38	0,04	2,02	1,64	81,6	
II	21,00	0,44	9,24	0,18	1,66	7,20	67,1	

Tab. 17. Podsumowanie procesu oczyszczania CaGfa1-G474LT487IG490LH492F: EB – ekstrakt bezkomórkowy; I – preparat po oczyszczaniu metodą wytrąceniową; II – preparat po chromatografii jonowymiennej.

5.3.1.5. Wyznaczanie parametrów kinetycznych CaGfa1-G474LT487IG490LH492F

W celu sprawdzenia wpływu mutagenezy na aktywność katalityczną enzymu, przeprowadziłam szereg oznaczeń korzystając ze zmodyfikowanej metody Elsona-Morgana (Materiały i Metody 4.12). Reakcję katalizowaną przez enzym wykonałam przy zmiennych stężeniach substratów. Dla każdego substratu (Fru-6-P i L-Gln) przeprowadziłam co najmniej 3–krotne powtórzenie, a uzyskane wyniki przedstawiłam za pomocą wykresów Lineweavera-Burka (Rys. 59 i 60).



Rys. 59. Wykres zależności $1/\text{Akt}_{\text{sp.}} = f(1/C_{\text{Fru-6-P}}) \text{ dla } CaGfa1-G474LT487IG490LH492F.$ Wyniki z jednego powtórzenia.



Rys. 60 Wykres zależności $1/\text{Akt}_{sp.} = f(1/C_{L-Gln})$ dla *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F. Wyniki z jednego powtórzenia.

W przypadku obu substratów uzyskane zależności mają charakter liniowy. Proste przecinają oś rzędnych w punkcie odpowiadającym $1/V_{max}$, a oś odciętych w punkcie odpowiadającym $-1/K_M$. Z równań prostych wyznaczyłam punkty przecięcia z osiami współrzędnych oraz obliczyłam V_{max} oraz K_M wobec obu substratów (Tab. 18).

Tab. 18. Porównanie aktywności katality i <i>Ca</i> Gfa1-G474LT487IG490LH492F.	ycznych CaGfa1 typu	dzikiego [Czarnecka i	in. 2012]
	K _{M Fru-6-P}	$K_{M {\scriptscriptstyle \rm L}\text{-}Gln}$	V _{max}

	K _{M Fru-6-P}	$K_{M L-Gln}$	V _{max}
	[mM]	[mM]	$[\mu mol*min^{-1}*mg^{-1}]$
CaGfa1	$1,56 \pm 0,05$	$1,41 \pm 0,01$	$6,80 \pm 0,11$
<i>Ca</i> Gfa1- G474LT487IG490LH492F	1,23 ± 0,08	$0,54 \pm 0,03$	0,34 ± 0,02

Wartości K_M muteiny są niższe niż parametry kinetyczne dzikiego typu syntazy GlcN-6-P z *C. albicans.* Obniżenie stałej Michealisa-Menten dla Fru-6-P jest nieznaczne, natomiast dla L-Gln wartość K_M jest niemalże 3-krotny niższa, co w efekcie oznacza wzrost powinowactwa rekombinantowego białka do substratów. Należy również zauważyć, że dla zmutowanej syntazy GlcN-6-P wartość maksymalnej szybkości reakcji, w stosunku do białka typu dzikiego, jest w dużym stopniu obniżona. Fakt ten potwierdza wcześniej wysunięte wnioski o obniżeniu aktywności katalitycznej enzymu. Finalnie wprowadzone mutacje G474L, T487I, G490L i H492F nie blokują całkowicie aktywności katalitycznej enzymu, jednakże w dużym stopniu obniżają ją. Może to być efekt wprowadzenia

aminokwasów z bardziej rozbudowanymi łańcuchami bocznymi (Gly474Leu, Thr487Ile i Gly490Leu), które docelowo tworzą zawadę przestrzenną w kieszeni wiążącej UDP-GlcNAc, a z drugiej strony prawdopodobnie pośrednio oddziałują na centrum katalityczne białka.

5.3.1.7. Inhibicja aktywności CaGfa1-G474LT487IG490LH492F przez UDP-GlcNAc

Podczas mutagenezy wymieniłam reszty potencjalnie odpowiedzialne za wiązanie UDP-GlcNAc. W celu sprawdzenia wpływu wymienionych reszt aminokwasowych na zdolności inhibicji *Ca*Gfa1, przeprowadziłam szereg oznaczeń korzystając ze zmodyfikowanej metody Elsona-Morgana (Materiały i Metody 4.12). Reakcję katalityczną enzymu przeprowadziłam w mieszaninie ze stałą ilością substratów (7,5 mM Fru-6-P, 10 mM L-Gln), bez i ze wzrastającym stężeniem UDP-GlcNAc (0 – 5 mM) oraz z dodatkiem lub bez Glc-6-P (10 mM). Dodatek do mieszaniny reakcyjnej Glc-6-P, miał na celu zwiększenie powinowactwa enzymu do inhibitora [Milewski i in. 1999]. Przeprowadziłam również testy z dodatkową inkubacją samego białka z mieszaniną UDP-GlcNAc z/bez Glc-6-P (15 min., 4°C). We wszystkich przeprowadzonych próbach, niezależnie czy z obecnością Glc-6-P, czy z preinkubacją otrzymano bardzo zbliżone wyniki (Rys. 61).



Rys. 61. Zależność aktywności specyficznej dla *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH392F od stężenia UDP-GlcNAc.

Z otrzymanych wyników zaobserwowałam, że ze wzrostem stężenia inhibitora od 0 do 5 mM, aktywność specyficzna muteiny utrzymała się na stałym poziomie dla wszystkich badanych mieszanin. Tymczasem, aktywność *Ca*Gfa1 typu dzikiego jest hamowana przez UDP-GlcNAc w stężeniach milimolarnych, a wyznaczone wartości IC₅₀ wynoszą od 0,7 mM do 1,55 mM. [Milewski i in. 1999, Czarnecka i in. 2012]. Wynik
ten potwierdza, że reszty: G474, T487, G490 i H492, odpowiadają za wiązanie fizjologicznego inhibitora UDP-GlcNAc, a ich wymiana na reszty nie mogące odgrywać roli w wiązaniu inhibitora, skutkuje utratą podatności enzymu na jego działanie. Efekt ten mógł być wywołany każdą wprowadzoną zmianą poprzez tworzenie zawady przestrzennej w miejscu wiązania (G474 i G490) oraz likwidację grup mogących tworzyć wiązania z cząsteczką inhibitora (T487 i H492). Całkowity brak inhibicji może być też sumarycznym efektem wprowadzonych mutacji. Dlatego też w celu wskazania dokładnego udziału aminokwasów w tworzenie kieszeni białkowej i wiązanie w niej inhibitora, konieczne byłoby przebadanie pośrednich mutein z pojedynczymi mutacjami.

Niedawno opublikowane zostały wyniki prac prowadzonych w zespole prof. Badet dotyczące syntazy GlcN-6-P z *Homo sapiens*. [Assrir i in. 2014]. Francuscy naukowcy badali rolę analogicznych reszt: R343, G445, G461 (w *Ca*Gfa1 odpowiednio: R372, G474 i G490), potencjalnie odpowiedzialnych za wiązanie cząsteczki UDP-GlcNAc do *Hs*Gfat. Wyniki tych badań, prowadzonych równolegle do moich, pokrywają się z wynikami uzyskanymi przeze mnie. Otrzymanie podobnych wniosków w dwóch niezależnych instytutach badawczych i na enzymach z dwóch różnych źródeł, jednoznacznie pozwala stwierdzić, że reszty odpowiedzialne za inhibicję syntazy GlcN-6-P, przez cząsteczkę UDP-GlcNAc, są silnie zakonserwowane w sekwencji aminokwasowej w organizmach eukariotycznych i każda ingerencja w ich zakresie wpływa na zdolność wiązania UDP-GlcNAc, a zatem na inhibicję.

5.3.1.6. Struktura oligomeryczna CaGfa1-G474LT487IG490LH492F

Kolejną właściwością białka, która może ulec zmianie w wyniku punktowych zmian w sekwencji aminokwasowej, wprowadzonych podczas mutagenezy ukierunkowanej jest jego struktura przestrzenna i zdolność do oligomeryzacji. Strukture oligomeryczną CaGfa1-G474LT487IG490LH492F określiłam, analizując cząsteczkową mase rekombinowanego białka jako monomeru za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących, oraz jako masę oligomeru poprzez filtrację żelową i elektroforezę poliakrylamidową w warunkach natywnych. Jako kontrolę zmian w oligomeryzacji białka, tymi samymi metodami przebadałam syntazę GlcN-6-P z C. albicans typu dzikiego.

Dodatkowo jako kontrolę teoretyczną, za pomocą metod bioinformatycznych, wyznaczyłam prawdopodobną masę cząsteczkową enzymu (programu Protein Molecular Weight, http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html). Sekwencja nukleotydowa rekombinantowej syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, składa się z 2136 pz, które kodują

712 aminokwasów (bez kodonu START i STOP) (Rys. 62). Teoretyczna masa molekularna monomeru muteiny *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F wyniosła 79,27 kDa ($MW_{teor.} = 79,13$ kDa dla *Ca*Gfa1). Natomiast zakładając, że natywna muteina byłaby, podobnie jak białko typu dzikiego, homotetramerem, jej masa molekularna wynosiłaby około 317,08 kDa.

MCGIFGYVNFLVDKSKGEIIDNLIEGLQRLEYRGYDSAGIAVDGKLTKDPSNGDEEYMDSIIIKTTGK VKVLKQKIIDDQIDRSAIFDNHVGIAHTRWATHGQPKTENCHPHKSDPKGEFIVVHNGIITNYAALRK YLLSKGHVFESETDTECIAKLFKHFYDLNVKAGVFPDLNELTKQVLHELEGSYGLLVKSYHYPGEV CGTRKGSPLLVGVKTDKKLKVDFVDVEFEAQQQHRPQQPQINHNGATSAAELGFIPVAPGEQNLR TSQSRAFLSEDDLPMPVEFFLSSDPASVVQHTKKVLFLEDDDIAHIYDGELRIHRASTKSAGESTVR PIQTLEMELNEIMKGPYKHFMQKEIFEQPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIRRCRRIIMI ACGTSYHSCLATRSIFEELTEIPVSVELASDFLDRRSPVFRDDTCVFVSQSGETADSILALQYCLER GALTVIVSVGSSMSRQHCLVFINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSNDSISRKGRHEEIIK GLQKIPEQIKQVLKLENKIKDLCNSSLNDQKSLLLLGRGYQFATALEGALKIKEISYMHSEGVLAGEL KHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARDGRPIVICNEGDAIISNDKVHTTLEVPETVDC LQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPRNLAKSVTVESTOP

Rys. 62. Sekwencja aminokwasowa rekombinantowej syntazy GlcN-6-P po modyfikacji genetycznej w obszarze wiązania UDP-GlcNAc (*Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F). Na czerwonym tle – wymieniony aminokwas Gly474Leu; fioletowe tło – Thr487IIe; niebieskie tło – Gly490Leu; zielone tło – His492Phe.

5.3.1.6.1. Masa monomeru (SDS-PAGE)

Oczyszczony preparat białka *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F poddałam analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1) (Rys. 63)



Rys. 63. (A) Elektroforeza poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (żel 10%): M – marker Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – oczyszczony preparat białka *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F; (B) Wykres zależności logMW = $f(R_e)$.

Z otrzymanego równania wykresu zależności log $MW = f(R_e)$ wyznaczyłam wartość masy monomeru białka *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F, która wyniosła ok. 94 kDa. Zaskakująco duża różnica między eksperymentalną a teoretyczną wartością masy cząsteczkowej (79,27 kDa), prawdopodobnie wynika z niedokładności analizy.

5.3.1.6.2. Masa oligomeru (SEC, Native-PAGE)

Strukturę oligomeryczną rekombinantowego białka *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F określiłam wykorzystując filtrację żelową (Materiały i Metody 4.9). Efekt przeprowadzonej chromatografii przedstawiam na Rys. 64A. Wszystkie rozdzielone piki zebrałam i sprawdziłam ich aktywność katalityczną (Materiały i Metody 4.12). Dodatkowo z zebranych i aktywnych katalitycznie frakcji przeprowadziłam rozdział elektroforetyczny w warunkach natywnych (Materiały i Metody. 4.10.3.3) i denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1) (Rys. 64 B-E).

Obraz otrzymanych wyników jest dość zaskakujący, ponieważ analiza SEC wykazała obecność trzech form białka wykazujących aktywność syntazy GlcN-6-P. W dominującej ilości występuje białko o masie prawie 167 kDa, co może odpowiadać dimerycznej formie rekombinowanej syntazy GlcN-6-P. Pik odpowiadający białku o masie około 356 kDa (możliwa forma tetrameryczna) jest dużo mmiejszy, a jego aktywność katalityczna również jest niewielka. Najprawdopodobniej jest to efekt nałożenia się frakcji, a oznaczona aktywność pochodzi od formy dimerycznej, a nie tetramerycznej. Nie oznacza to jednak, że forma tetrameryczna nie jest aktywna, ale do testów oznaczania aktywności enzymatycznej, stężenie białka jest za niskie. Teoretycznie na podstawie aktywności dimeru można założyć, że forma tetrameryczna również zachowuje aktywność katalityczną. Szczególnie zaskakująca jest obecność słabo aktywnego katalitycznie białka o masie około 90 kDa. Masa ta jest zbliżona do masy monomeru muteiny, jednakże taka forma syntazy GlcN-6-P nie może wykazywać aktywności katalitycznej, gdyż najmniejszą katalitycznie aktywną formą tego enzymu jest dimer [Isupov i in. 1996, Mouilleron i in. 2008, Floquet i in. 2009]. Prawdopodobne jest zatem, że zmierzona aktywność katalityczna dla frakcji 14,12 ml, pochodzi od obecnych w tej frakcji form oligomerycznych tj. dimer, tetramer. Wszystkie piki otrzymane podczas rozdziału SEC, zostały poddane elektroforezie. Do rozdziału Native-PAGE wykorzystałam żel gradientowy z zestawu NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System (Life Technologies), dla którego możliwe jest wyznaczenie krzywej $\log MW = f(R_e)$ (Materiały i Metody 4.10.3.3).



Rys. 64. Analiza masy cząsteczkowe *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F: (A) Chromatogram SEC (kolumna Superdex 200 10/300 GL. Kontrolny rozdział SEC dla *Ca*Gfa1 typu dzikiego przedstawiłam na Rys 28. (B) Native-PAGE: M – marker The NativeMark Unstained Protein Standard (1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 10,89 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,69 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,12 ml; (C) Wykres zależności logMW = $f(R_e)$ dla Native-PAGE; (D) SDS-PAGE: M – Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 10,89 ml; 2 – Frakcja z SEC przy 12,69; 3 – frakcja z SEC przy 14,12 ml; (E) Wykres zależności logMW = $f(R_e)$ dla SDS-PAGE.

W obrazie rozdziału elektroforetycznego Native-PAGE bardzo zastanawiające są podwójne prążki pojawiające się na poziomie form oligomerycznych enzymu (dimeru i tetrameru). Na poziomie obecnych wyników trudno jednoznacznie wyjaśnić ten efekt. W celu wyjaśnienia tej kwestii należałoby sprawdzić wpływ osobno poszczególnych reszt na strukturę białka, bądź wykorzystać inne metody do głębszej charakterystyki białka np. krystalografię.

Pojawienie się trzech różnych form wykazuje, że wymienione reszty odgrywają rolę w kontaktach między poszczególnymi podjednostkami monomerycznymi (Tab. 19). Miejsce wiązania UDP-GlcNAc, znajduje się w bliskim obszarze kontaktu między poszczególnymi podjednostkami monomerycznymi. Wymiana reszt G474L, T487I, G490L i H492F, ma na celu zablokowanie wejścia inhibitora poprzez stworzenie zawady przestrzennej, co w konsekwenji pośrednio prawdopodobnie powoduje przesunięcie i usztywnienie dalszych struktur białka.

Tab. 19. Zebranie teoretycznej i eksperymentalnej masy cząsteczkowej *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492L w porównaniu z masą *Ca*Gfa1 [Czarnecka i in. 2012].

Masa teoretyczna monomeru [kDa]	Masa monomeru (SDS-PAGE) [kDa]	Masa oligomeru (SEC) [kDa]	Masa oligomeru (Native-PAGE) [kDa]	Aktywność katalityczna	Prawdopodobna struktura IV-rzędowa			
	CaGfa1							
79,13	79 ± 7	344	340 ± 9	+	Tetramer			
<i>Ca</i> Gfa1-G474LT487IG490LH492F								
		358,86	386 ± 20	+	Tetramer			
79,27	94 ± 15	166,94	193 ± 20	+	Dimer			
		90,86	80 ± 10	-	Monomer			

PODSUMOWANIE:

Wymiana 4 reszt (Gly474Leu, Thr487Ile, Gly490Leu i His492Phe) z obszaru wiązania cząsteczki UDP-GlcNAc skutkuje utratą podatności na działanie fizjologicznego inhibitora. Minimalnie wpływa także na powinowactwo enzymu do substratów katalizowanej reakcji, a bardzo silnie na jego aktywność katalityczną. Natomiast dość nieoczekiwanie wprowadzona zmiana wpływa na strukturę czwartorzędową białka, osłabiając wiązania między poszczególnymi podjednostkami, co skutkuje występowaniem muteiny w formie: monomeru, homodimeru i homotetrameru.

5.3.2. Próba zmiany struktury IV rzędowej syntazy glukozamino-6-fosforanu z *Candida albicans* poprzez mutagenezę ukierunkowaną

5.3.2.1. Analiza struktury przestrzennej syntazy GlcN-6-P w celu wybrania optymalnego kierunku mutagenezy

W wyniku ustalenia struktury tetramerycznej domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, stwierdzono, że w roztworze występuje ona jako dimer dimerów. Badania SAXS kompletnego białka wykazały, że analogiczną strukturę posiada natywna syntaza GlcN-6-P [Raczyńska i in. 2007]. Ponadto szczegółowo określono reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie poszczególnych monomerów w dimery, a następnie funkcjonalnych dimerów w tetramer. Reszty te w sekwencjach syntezy GlcN-6-P ze źródeł eukariotycznych są wysoce zakonserwowane, natomiast w odpowiadających im pozycjach w prokariotycznej syntazie GlcN-6-P występują inne reszty, nie mogące tworzyć wiązań wodorowych. Reszty aminokwasowe zaangażowane w połączenie dwóch dimerów w tetramer zostały zidentyfikowane w strukturze tetrameru domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* (Rys. 65) [Raczyńska i in. 2007]. Warto dodać, że miejsca kontaktu podjednostek natywnego białka pochodzenia eukariotycznego występują jedynie między domenami ISOM, natomiast domeny GAT nie kontaktują się ze sobą.

Kierując się tymi wskazówkami, uznałam za celowe sprawdzenie, czy w wyniku wymiany reszt Asp524, Ser525, Ser527, Arg394 i Arg442 na możliwie izosteryczne reszty nie mogące tworzyć wiązań wodorowych poprzez łańcuchy boczne (Ala, Ile, Val), nastąpią zmiany w strukturze czwartorzędowej i jakie będą one miały odzwierciedlenie w aktywności enzymatycznej. W pierwszym etapie tych prac dokonałam wymiany reszt zaangażowanych w oddziaływanie pomiędzy łańcuchami A-D oraz B-C, czyli Asp524, Ser525 i Ser527. Natomiast w kolejnym etapie, wymieniłam reszty stabilizujące oddziaływania A-C i B-D: Arg394 i Arg442 (Rys. 65 i 66).



Rys. 65. (A) Tetramer domen ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans.* **(B)** Obszar kontaktu pomiędzy łańcuchami A i D. Analogiczna sytuacja występuje między łańcuchami B i C. **(C)** Obszar kontaktu pomiędzy łańcuchami A i C. Analogiczna sytuacja pojawia się między łańcuchami B i D [Raczyńska i in.2007].



Rys. 66. Obraz miejsca kontaktu między domenami ISOM poszczególnych monomertów syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z zaznaczonymi resztami wymienionymi podczas mutagenery ukierunkowanej: (A) przed mutagenezą; (B) po mutagenezie; (C) przed mutagenezą z oznaczonymi resztami aminokwasowymi; (D) po mutagenezie z oznaczonymi resztami aminokwasowymi. Fragment każdego monomeru zaznaczony innym kolorem. Modelowanie wykonane przez dr M. Wojciechowskiego.

5.3.2.2. Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych

Wytypowane reszty aminokwasowe w genie kodującym syntazę GlcN-6-P z *C. albicans (CaGFA1)* wymieniłam wykorzystując mutagenezę ukierunkowaną, opartą o reakcję PCR. Podobnie jak we wcześniejszym projekcje poszczególne reszty aminokwasowe wymieniłam stopniowo, tak aby w wyniku jednego etapu wymieniana była 1 lub maksymalnie 2 reszty aminokwasowe. Takie postępowanie dawało możliwość dokładnego obserwowania wpływu poszczególnych modyfikacji genetycznych na właściwości enzymu.

Strategia stopniowej mutagenezy, umożliwia wprowadzanie zmiany genetycznej za pomocą jednego startera. Jako matrycę w pierwszej reakcji PCR wykorzystałam plazmid pET23b zawierający gen kodujący syntazę GlcN-6-P z *C. albicans* – pET23b-*CaGFA1* [Sachadyn i in. 2000], natomiast w kolejnych reakcjach – matryce stanowił produkt z poprzedniej mutagenezy (Tab. 20). Podobnie jak we wcześniej opisanych badaniach, optymalizację i właściwą reakcję PCR oraz całą procedurę wymiany poszczególnych reszt wykonałam wg schematu Rys. 34.

Tab. 20. Zestawienie szeregu mutagenez ukierunkowanych w projekcje badania funkcjonalności tetramerycznej struktury Gfa1 z *C. albicans.* Zmiany genetyczne wprowadzane w jednym kroku są zaznaczone jednym kolorem. Docelowo wymieniane nukleotydy są podkreślone. W nazwach rekombinantowych plazmidów wymienione reszty zaznaczyłam wg kolejności wprowadzanych zmian. Natomiast w dalszej części pracy wymienione reszty opisuję wg kolejności występowania w sekwencji: *CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A*.

	Matryca	Startery	Produkt	Uwagi
1.	pET23b- CaGFA1	<i>Ca</i> Gfa1-D524Am: 5'P-CTTTATCTAATGCTTCTATTTCCAGAAA GGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-D524Ak: 5'P-AAAGGGCAAACATCACCAAGGC 3'	pET23b- CaGFA1- D524A	Asp524 → Ala 5'G <u>A</u> T 3' → 5'G <u>C</u> T 3' Produkt potwierdzony.
2.	pET23b- CaGFA1- D524A	<i>Ca</i> Gfa1-S525AS527Am: 5'P-TTATCTAATGCT <mark>GCT</mark> ATT <mark>GCC</mark> AGAAA GGG 3' <i>Ca</i> Gfa1-S525AS527Ak: 5'P-AGAAAGGGCAAACATCACCAAGGC 3'	pET23b- CaGFA1- D524A- S525AS527A	Ser525 \rightarrow Ala 5' <u>T</u> CT 3' \rightarrow 5' <u>G</u> CT 3' Ser527 \rightarrow Ala 5' <u>T</u> CC 3' \rightarrow 5' <u>G</u> CC 3' Produkt potwierdzony.
3.	pET23b- CaGFA1- D524A- S525AS527A	CaGfa1-R394Im: 5'P-ATATGTAGAAGAATCATTATGATTGCT TGTGG 3' CaGfa1R394Ik: 5'P-TCTAATTGTAGATAACCATGATTTTAAT CCACC 3'	pET23b- CaGFA1- D524A- S525AS527A- R394I	Arg394 \rightarrow Ile 5'AGA 3' \rightarrow 5'ATA 3' Produkt potwierdzony.
4.	pET23b- CaGFA1- D524A- S525AS527A	CaGfa1R442Im: 5' P-TCTCCAGTTTTCATAGATGATACTTGT GTATTTGTTTCTCAATCGGG 3' CaGfa1R442Ik: 5' P-TCTTCTATCCAAGAAATCAGAAGCTA ATTCAACCGAAACGG 3'	pET23b- CaGFA1- D524A- S525AS527A- R442I	Arg442 \rightarrow Ile 5'A <u>G</u> A 3' \rightarrow 5'A <u>T</u> A 3' Produkt potwierdzony
5.	<i>pET23b-</i> <i>CaGFA1-</i> <i>D524A-</i> <i>S525AS527A-</i> <i>R3941</i> <i>lub</i> <i>pET23b-</i> <i>CaGFA1-</i> <i>D524A-</i> <i>S525AS527A-</i> <i>R4421</i>	CaGfa1-R442Im CaGfa1-R442Ik ^{lub} CaGfa1-R394I CaGfa1-R394I	pET23b- CaGFA1- D524A- S525AS527A- R394IR442I	Produkt potwierdzony.

Poprawność tak otrzymanych plazmidów rekombinantowych potwierdziłam poprzez analizę restrykcyjną (Materiały i Metody 4.3.3) oraz sekwencjonowanie (firma Genomed, Warszawa). Przykładową analizę restrykcyjną dla pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A* przedstawiam na Rys. 67.



Rys. 67. Rozdział elektroforetyczny produktów analizy restrykcyjnej plazmidu pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A*M - marker DNA M10kpz (10037; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2500; 2000; 1500/1517; 1000; 800; 600; 400; 200 [pz])
1 - pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A* trawiony *Eco*RI (3978; 1296; 498 [pz])
2 - pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A* trawiony *SspI* (4239; 1402; 131 [pz])
3 - pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A* trawiony *NdeI* i *XhoI* (3586; 2186 [pz])
4 - pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A* trawiony *Bam*HI (5772 [pz])
5 - pET23b-*CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A* (5772 [pz])
Kontrolę analizy stanowi symulacja trawienia restrykcyjnego dla *Ca*Gfa1 przedstawiona na Rys. 26.

W wyniku zmian poszczególnych reszt aminokwasowych spodziewałam się zmiany w oligomeryzacji enzymu. Ze względu na możliwość zachowania przez białko różnej formy IV-rzędowej zdecydowałam się na dokładną charakterystykę wszystkich pośrednich produktów (*Ca*Gfa1-D524A, *Ca*Gfa1-D524AS525AS527A, *Ca*Gfa1-R394ID524AS525AS527A i *Ca*Gfa1-R422ID524AS525AS527A) i końcowej (*Ca*Gfa1-R394IR442ID524AS525AS527A) wersji rekombinantowej syntazy GlcN-6-P. Sumarycznie w dalszej części pracy przedstawiam wyniki dotyczące 5 różnych wersji zmutowanej *Ca*Gfa1.

Ten sam szereg mutagenez przeprowadzałam równocześnie na bazie wcześniej otrzymanej pochodnej *Ca*Gfa1 z wewnętrznym mikro fragmentem oligoHis (*pET23b-CaGFA1-K568HS569H*, *pET23b-CaGFA1-KHSH*). Te dodatkowe muteiny mogą być pomocne, w przypadku trudności przy charakterystyce bądź późniejszej krystalizacji właściwych rekombinantów.

5.3.2.3. Nadekspresja genów kodujących rekombinantową syntazę GlcN-6-P w komórkach E. coli

Rekombinowane plazmidy: pET23b-*CaGFA1-D524A*, pET23b-CaGFA1-D524AS525AS527A, pET23b-*CaGFA1-R394ID524AS525AS527A*, pET23b-CaGFA1i pET23b-CaGFA1-R394IR442ID524AS525AS527A *R442ID524AS525AS527A* transformowałam wg standardowej procedury (Materiały i Metody 4.4.2) do następujących szczepów ekspresyjnych: E. coli BL21 (DE3)pLysS, E. coli Rosetta (DE3)pLysS i E. coli Rosetta (DE3)pLacI (Materiały i Metody 4.1.1). W wyniku transformacji dwóch pierwszych mutein otrzymałam kolonie E. coli z właściwym plazmidem. Niestety w przypadku kolejnych trzech mutein nie otrzymałam żadnej kolonii bakteryjnej. Mimo wielokrotnych prób optymalizacji transformacji nie uzyskałam oczekiwanych kolonii. Brak kolonii po transformacji przypuszczalnie mogło być spowodowane mutacją punktową, wprowadzoną przez błąd polimerazy podczas reakcji PCR. Na tym etapie możliwe były dwie strategie: 1 - sprawdzenie przez sekwencjonowanie całego plazmidu, a następnie przeprowadzenie mugatenezy ponownie; 2 - wykorzystanie do dalszych badań rekmbinantowych plazmidów bazujących na pET23b-CaGFA1-K568HS569H (pET23b-CaGFA-KHSH). Pierwsza koncepcja byłaby bardziej czaso- i kosztochłonna, w związku z tym zdecydowałam się na rozwiązanie nr 2. Dalsze badania przeprowadzałam bazując na: pET23b-CaGFA1-KHSH-D524A, pET23b-CaGFA1-KHSH-D524AS525AS527A, pET23b-CaGFA1-KHSH-R392ID524AS525AS527A, pET23b-CaGFA1-KHSH-*R442ID524AS525AS527A* i pET23b-*CaGFA1-KHSH-R392IR442ID524AS525AS527A*.

Do nadekspresji genu *CaGFA1-KHSH* z mutacjami w regionie kontaktu między podjednostkami (*CaGFA1-KHSH**) wykorzystałam te same szczepy *E. coli* jak powyżej (Materiały i Metody 4.5). Optymalizację hodowli przeprowadziłam uwzględniając rodzaj i ilość czynnika indukującego ($\leq 0,1M$ IPTG, $\leq 1,5g/1$ laktoza), wpływ fazy wzrostu w momencie indukcji (w zakresie OD 0,3-0,6) oraz czas i temperaturę inkubacji po indukcji (5-16 godz., 30°C i 37°C). Jako kontrolę nadprodukcji białka wykorzystywałam odpowiednio te same szczepy *E. coli*, transformowane "pustym" plazmidem pET23b.

Efekty przeprowadzonych optymalizacji analizowałam za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1). Rozdziały elektroforetyczne otrzymanych lizatów, z poszczególnych szczepów *E. coli* hodowanych w różnych warunkach, dla wszystkich analizowanych mutein były dość zbliżone. Jednakże zaobserwowałam następujące zjawiska:

- Podobnie jak dla ekspresji genu pET23b-CaGFA1-KHSH w komórkach E. coli BL21(DE3)pLysS i E. coli Rosetta(DE3)pLacI sygnał, odpowiadający masą, poszczególnym rekombinantom CaGfa1-KHSH* występował na niskim poziomie.
- W komórkach E. coli Rosetta(DE3)pLysS nadprodukcja wszystkich analizowanych mutein była zdecydowanie większa, a sygnał odpowiadający eksprymowanym białkom w stosunku do pozostałych białek widocznych na żelu poliakrylamidowym był dominujący.
- W przypadku ekspresji tych mutantein lepszym induktorem okazało się IPTG w stężeniu końcowym 0,1 M. Za optymalną gęstość komórek w momencie indukcji uznałam OD₆₀₀ = 0,4. Warunki dalszej inkubacji po indukcji nie miały istotnego wpływu na poziom nadekspresji, przy zachowaniu zależności, że po obniżeniu temperatury z 37°C na 30°C czas hodowli został wydłużony z 5h do ok. 16h.

Za najlepsze warunki ekspresji dla wszystkich 5 zmutowanych form *Ca*Gfa1-KHSH* uznałam hodowlę prowadzoną w komórkach *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS z indukcją ekspresji przy OD₆₀₀ ok. 0,4, poprzez dodanie IPTG ($C_k = 0,1M$) i dalszą inkubacją w warunkach 37°C przez 5h lub 30°C przez 16h (w zależności od dostępności sprzętu).



Rys. 68. (A) Analiza elektroforetyczna nadekspresji *Ca*Gfa1-R394IR442ID524AS525AS527A (10% żel poliakrylamidowy): M— marker PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 [kDa]; 1— lizat hodowli *E.coli* Rosetta(DE3)pLysS, indukcja IPTG (0,1 mM) OD₆₀₀ = 0,4 (37°C, 5h). **(B)** Analiza densytometryczna ścieżki 1, wykonana w programie GelQuantPro. Powierzchnia pod sygnałem *Ca*Gfa1-R394IR442ID524AS525AS527A stanowi 8% wszystkich białek.

Przykładowy rozdział elektroforetyczny dla finalnej wersji *Ca*Gfa1-KHSH-R392IR442ID524AS525AS527A przedstawiam na Rys. 68. W takich warunkach hodowli poszczególne muteiny stanowiły ok. 10% ze wszystkich białek występujących w *E. coli*, co odpowiadało ok. 5-15 mg/l *Ca*Gfa1-KHSH*.

5.3.2.4. Oczyszczanie otrzymanych mutein

Pamiętając, że rekombinantowe wersje *Ca*Gfa1 ze zmianami w obszarze kontaktu między monomerami, zostały otrzymane bazując na *Ca*Gfa1-KHSH, można je oczyszczać zarówno za pomocą chromatografii metalopowinnowactwa (IMAC) jak i chromatografii jonowymiennej (IEC). Izolacja białka wykorzystując IMAC jest możliwa dzięki układowi 6-His, który powstaje po zwinięciu białka w strukturę IV-rzędową. Niestety nie mam pewności w jaki sposób wprowadzane mutację wpłyną na strukturę białka, tym bardziej że są to zmiany w rejonie wiązania poszczególnych podjednostek monomerycznych. Z tego powodu pomimo dłuższej procedury i wymagającej dodatkowych etapów wytrąceniowych, postanowiłam muteiny te oczyszczać za pomocą IEC. Cały proces oczyszczania składał się z kilku etapów, ale można go podzielić na dwie charakterystyczne części:

- metody wytrąceniowe oczyszczanie wstępne (Materiały i Metody 4.6.2). Jest to etap przygotowujący preparat białkowy do oczyszczania chromatograficznego, podczas którego usuwane jest DNA i część niespecyficznych białek.
- II. chromatografia jonowymienna oczyszczanie właściwe (Materiały i Metody 4.6.3). Po przeprowadzeniu optymalizacji, najlepsze rozdziały chromatograficzne otrzymałam wykorzystując bufor fosforanowy o pH 7,0 w gradiencie NaCl 0,15-0,55 M NaCl. Dla wszystkich mutein otrzymane rozdziały były bardzo podobne (przykładowy rozdział przedstawiony na Rys. 69). Wszystkie otrzymane piki poddałam analizie elektroforetycznej i reakcji aktywności katalitycznej enzymu. Finalnie stwierdziłam, że pochodne syntazy GlcN-6-P ze zmianami w obszarze kontaktu między podjednostkami, zostają wymywane z kolumny ResourceQ przy stężeniu NaCl ok. 17-25 mM i zachowują aktywność katalityczną w następującym stopniu:
 - *Ca*Gfa1-KHSH-D524A = 1,59 U/mg;
 - *Ca*Gfa1-KHSH-D524AS525AS527A = 0,52 U/mg;
 - *Ca*Gfa1-KHSH-R394ID524AS525AS527A = 0,36 U/mg;
 - *Ca*Gfa1-KHSH-R442ID524AS525AS527A = 0,30 U/mg;
 - *Ca*Gfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A = 0,17 U/mg;



Rys. 69. Profil elucji preparatu zawierającego białko *Ca*Gfa1-R394IR442ID524AS525AS527A z kolumny ResourceQ (linia zielona – gradient 0,15-0,55M NaCl; linia niebieska – chromatogram wypływu białka; oznaczenia czerwone – zbierane frakcje) i analiza elektroforetyczna SDS-PAGE z zebranych frakcji: M – marker PageRuler Protein Ladder (250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 [kDa]); EB – ekstrakt bezkomórkowy z hodowli; 1 – frakcja z 17-25 mM NaCl; 2 – frakcja z 25-33 mM NaCl; 3 – frakcja z 33-40 mM NaCl.

Aktywność specyficzna poszczególnych rekombinantów w porównaniu z CaGfa1 = 7,55 U/mg (formą dziką) i CaGfa1-KHSH = 6,80 U/mg są sporo niższe. Pewne różnice mogą wynikać z dokładnych warunków panujących podczas oczyszczania tj. temperatura, długość poszczególnych etapów i stan złoża kolumny chromatograficznej. Zastanawiająca jest zależność, że im więcej wprowadzonych mutacji, aktywność katalityczna spada. Może to sygnalizować, że wymieniane reszty odgrywają pewną rolę w reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P z *C. albicans*. Dokładna analiza wpływu poszczególnych reszt aminokwasowych na aktywność enzymu przedstawiona jest w dalszej części.

Tab. 21. Podsumowanie procesu oczyszczania wszystkich wersji rekombinantowej *CaGFA1*-KHSH-* ze zmianami w rejonie wiązania podjednostek monomerycznych: EB – ekstrakt bezkomórkowy; I – preparat po oczyszczaniu metodą wytrąceniową; II – preparat po chromatografii jonowymiennej.

	Objętość frakcji [ml]	Stężenie białka [mg/ml]	Całkowita ilość białka [mg]	Aktywność specyficzna enzymu [U/mg]	Aktywność całkowita enzymu [U]	Współczynnik oczyszczania	Wydajność [%]	
			<i>Ca</i> Gfa1	-KHSH-D52	24A			
EB	7,30	12,08	88,18	0,26	22,93	1	100	
Ι	6,00	10,08	60,48	0,31	18,75	1,19	81,77	
II	18,00	0,22	3,96	1,59	6,29	6,11	27,42	
	CaGfa1-KHSH-D524AS525AS527A							
EB	5,90	20,00	118,00	0,03	3,54	1	100	
Ι	6,00	13,17	79,02	0,04	3,48	1,47	98,22	
II	9,00	0,24	2,16	0,52	1,11	17,20	31,48	
		Ca	Gfa1-KHSH-H	R394ID524A	S525AS52	7A		
EB	7,30	9,70	70,81	0,03	2,12	1	100	
Ι	5,50	5,95	32,73	0,06	1,96	2,00	92,43	
II	18,00	0,15	2,70	0,36	0,97	12,00	45,76	
CaGfa1-KHSH-R442ID524AS525AS527A								
EB	9,10	13,96	127,04	0,03	3,81	1	100	
Ι	6,00	16,15	96,90	0,03	2,91	1,20	76,28	
II	19,00	0,39	7,41	0,30	2,22	10,00	58,33	
CaGfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A								
EB	6,80	18,26	124,17	0,02	2,11	1	100	
Ι	5,50	9,84	54,12	0,02	1,52	1,65	71,79	
III	23,00	0,31	7,13	0,17	1,21	10,00	57,42	

Ostatecznie w wyniku chromatografii jonowymiennej z 1 litra hodowli otrzymywałam od 2 do 8 mg poszczególnych rekombinantów o czystości ok. 90% (Tab. 21). W porównaniu z procesem oczyszczania dzikiego enzymu *Ca*Gfa1, charakteryzującym się wydajnością ok. 16% i współczynnikiem oczyszczania ok. 9,52 oraz homogennością białka 95%, stwierdzam, że sumarycznie izolacja mutein przebiegała prawidłowo [Czarnecka i in. 2012].

5.3.2.4. Wyznaczanie parametrów kinetycznych

Podstawowym wyznacznikiem zmian w białku, wprowadzonych przez mutagenezę jest sprawdzenie aktywności katalitycznej enzymu. W tym celu przeprowadziłam szereg oznaczeń korzystając ze zmodyfikowanej metody Elsona-Morgana. Reakcję katalizowaną przez enzym wykonałam przy zmiennych stężeniach substratów (Materiały i Metody 4.12). Dla każdego substratu (Fru-6-P i L-Gln) przeprowadziłam co najmniej 3 powtórzenia, a uzyskane wyniki przedstawiłam za pomocą wykresów Lineweavera-Burka (Rys. 70 i 71).



Rys. 70. Wykres zależności $1/\text{Akt}_{\text{sp.}} = f(1/C_{\text{Fru-6-P}}) \text{ dla } CaGfa1-KHSH-G474LT487IG490LH492F. Wyniki z jednego powtórzenia.$



Rys. 71. Wykres zależności $1/\text{Akt}_{\text{sp.}} = f(1/C_{L-Gln})$ dla *CaGFA1*-KHSH-G474LT487IG490LH492F. Wyniki z jednego powtórzenia.

W przypadku obu substratów dla wszystkich rekombinantów uzyskane zależności mają charakter liniowy. Proste przecinają oś rzędnych w punkcie odpowiadającym $1/V_{max}$, a oś odciętych w punkcie odpowiadającym $-1/K_M$. Z otrzymanych równań prostych wyznaczyłam szybkość reakcji (V_{max}) oraz stałą Michaelisa-Menten (K_M) wobec obu substratów (Tab. 22). Jako kontrolę parametrów katalitycznych dla mutein wykorzystuję

dane otrzymane zarówno dla *Ca*Gfa1-KHSH (Rozdział 5.1.6) jak i dla *Ca*Gfa1 [Czarnecka i in. 2012].

	K _{M Fru-6-P} [mM]	K _{M L-Gln} [mM]	V _{max} [µmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]
CaGfa1	$1,56 \pm 0,05$	$1,41 \pm 0,01$	$6,80 \pm 0,11$
CaGfa1-KHSH	$1,90 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,08$	6,15 ±0,08
<i>Ca</i> Gfa1-KHSH -D524A	0,89 ± 0,43	0,11 ± 0,01	1,62 ± 0,16
<i>Ca</i> Gfa1-KHSH -D524AS525AS525S	0,77 ± 0,17	0,04 ± 0,01	$0,54 \pm 0,05$
<i>Ca</i> Gfa1-KHSH -R394ID524AS525AS525S	$1,22 \pm 0,78$	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,04
<i>Ca</i> Gfa1-KHSH -R442ID524AS525AS525S	1,36 ± 0,76	0,08 ± 0,06	0,32 ± 0,04
<i>Ca</i> Gfa1-KHSH -R394IR442ID524AS525AS525S	1,10 ± 0,10	0,03 ± 0,01	0,17 ± 0,02

Tab. 22. Porównanie aktywności katalitycznych dla rekombinantów w obszarze kontaktu między podjednostkami a z aktywnościami *Ca*Gfa1 [Czarnecka i in. 2012] i *Ca*Gfa1-KHSH (Rozdział 5.1.6).

Pierwsze zmiany w aktywności katalizowanej reakcji, po wprowadzeniu mutacji, zaobserwowałam w momencie wyznaczania aktywności specyficznej (Tab. 21). Już po wymianie pierwszej reszty aminokwasowej Asp524Ala widoczny był wyraźny spadek aktywności enzymatycznej. Po wprowadzeniu każdej kolejnej zmiany, poziom aktywności jeszcze bardziej się obniżał. Spadek aktywności katalitycznej poszczególnych mutein, potwierdziły wyniki maksymalnej szybkości katalizowanej reakcji (V_{max}). Zmiany V_{max} są stosunkowo duże: dla wersji z jedną mutacją obniżenie jest niemalże 4 krotne, natomiast dla wersji z pięcioma mutacjami jest to spadek ok. 40 krotny (Tab. 22). Takie różnice z całą pewnością muszą być wywołane wprowadzonymi zmianami w sekwencji aminokwasowej. Wartości K_M również są obniżone. W przypadku Fru-6-P stała K_M dla wszystkich wersji białek rekombinantowych była w niewielkim stopniu obniżona, natomiast K_M dla L-Gln była obniżona nawet kilkudziesięciokrotnie.

Eukariotyczna syntaza GlcN-6-P (w tym z *C. albicans*) tworzy strukturę homotetrameru, a poszczególne podjednostki łączą się przez domenę ISOM. Obszary kontaktu między poszczególnymi podjednostkami są w stosunkowo dużej odległości od centrum katalitycznego domeny izomerazowej (Rys. 53). Pozwala to przypuszczać, że wymienione reszty bezpośrednio nie odgrywają roli w katalizowanej reakcji, natomiast prawdopodobnie pośrednio poprzez zmiany w strukturze domeny ISOM wpływają na centrum katalityczne. W takiej sytuacji niewielki wzrost powinowactwa rekombinantowych enzymów do Fru-6-P prawdopodobnie jest spowodowany właśnie tymi zmianami w strukturze domeny ISOM. Natomiast nie ma podstaw, aby podejrzewać wpływ mutacji na centrum katalityczne domeny GAT, która jest zlokalizowana na zewnątrz cząsteczki, a więc jest jeszcze bardziej oddalone od miejsca mutagenezy. Zatem tak duże zmiany w powinowactwie do L-Gln są bardzo zaskakujące i obawiam się, że oznaczenia te obarczone były dużym błędem, co przy niskiej aktywności jest bardzo prawdopodobne. Jednakże na podstawie otrzymanych wyników stwierdzam, że każda z przeprowadzonych wymian: Arg394, Arg442, Asp524, Ser525 i Ser527 negatywnie wpływa na aktywność katalityczną syntazy GlcN-6-P.

5.3.2.5. Inhibicja aktywności katalitycznej mutein przez UDP-GlcNAc

W związku wcześniejszymi badaniami dotyczącymi CaGfa1-Z G474LT487IG490LH492P, z których wynika że mutageneza w miejscu wiązania UDP-GlcNAc wpłynęła także na strukturę tetrameryczną enzymu, uznałam za konieczne sprawdzenie również w przypadku tych mutein wrażliwości na fizjologiczny inhibitor UDP-GlcNAc. W tym celu wykonałam serię testów oznaczania aktywności enzymatycznej przy różnym stężeniu UDP-GlcNAc (0-5 mM) oraz z dodatkiem lub bez Glc-6-P (10 mM) (Materiały i Metody 4.12). W rezultacie już w przypadku pierwszej muteiny CaGfa1-D524A nie zaobserwowałam hamowania katalizowanej reakcji (Rys.72). Taki sam efekt otrzymałam dla pozostałych mutein. Należy tu przypomnieć, że IC_{50 UDP-GleNAc} dla CaGfa1 typu dzikiego mieści się w zakresie 0,7-1,55 mM [Milewski i in. 1999, Czarnecka i in. 2012], natomiast dla CaGfa1-KHSH IC_{50 UDP-GlcNAc} = 2,0 mM (Rozdział 5.1.7) [Czarnecka i in. 2012].



Rys. 72. Zależność aktywności specyficznej dla CaGfa1-KHSH-D524A od stężenia UDP-GlcNAc.

Z powyższych badań wynika, że syntaza GlcN-6-P z *C. albicans* już po wymianie zaledwie jednej reszty Asp524Ala utraciła podatność na inhibicyjne działanie UDP-GlcNAc.

Prawdopodobnie jest to efekt pośredni, wynikający z pewnych zmian konformacyjnych, wywołanych wymianą reszty aminokwasowej w pozycji 524. Miejsce wiązania cząsteczki UDP-GlcNAc w kieszeni na powierzchni enzymu jest bardzo specyficzne i ściśle dopasowane, a każda nawet drobna zmiana w strukturze białka, tym bardziej w niedalekim sąsiedztwie, może wpłynąć na jej kompatybilność do cząsteczki inhibitora. Natomiast dokładnego wpływu pozostałych wymienionych reszt aminokwasowych z obszaru kontaktu między podjednostkami, nie można oszacować na podstawie powyższych wyników, gdyż ich rola jest zamaskowana efektem wywołanym przez wymianę Asp524Ala. W celu dokładnej analizy znaczenia poszczególnych reszt: Arg394, Arg442, Ser525 i Ser527, należałoby otrzymać rekombinanty syntazy GlcN-6-P z pojedynczymi mutacjami.

5.3.2.6. Struktura oligomeryczna

Zgodnie z założeniem mutagenezy z obszaru kontaktu między podjednostkami, spodziewałam się znacznych zmian w zdolności białka do tworzenia form oligomerycznych. Analizę struktury IV rzędowej otrzymanych mutein przeprowadziłam wykorzystując filtrację żelową i elektroforezę poliakrylamidową w warunkach natywnych (masa oligomeru) oraz elektroforezę poliakrylamidową w warunkach denaturujących (masa monomeru). Jako kontrolę zmian w oligomeryzacji białka stanowi syntaza GlcN-6P z *C. albicans* typu dzikiego [Czarnecka i in. 2012] oraz *Ca*Gfa1-KHSH (Rozdział 5.1.8).

Ponadto za pomocą metod bioinformatycznych wyznaczyłam przewidywalną masę cząsteczkową enzymów (programu Protein Molecular Weight, http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html). Sekwencja nukleotydowa genów rekombinantowych wersji syntazy GlcN-6-P z C. albicans nie zmieniła się, składa się z 2136 pz, które kodują 712 reszt aminokwasowych (bez kodonu START i STOP) (Rys. 73). Zachowując taką sama ilość nukleotydów, ale wymieniając choćby jedną resztę aminokwasową, sumaryczna masa cząsteczkowa w minimalnym stopniu ulega zmianie (Tab. 23). Zmiany w masie cząsteczkowej wynikające z sekwencji są na tyle małe, że w dalszej analizie struktury mutein pomijam je, a jako teoretyczna masa monomeru muteiny zakładam 79 kDa.

MCGIFGYVNFLVDKSKGEIIDNLIEGLQRLEYRGYDSAGIAVDGKLTKDPSNGDEEYMDSIIIKTTGK VKVLKQKIIDDQIDRSAIFDNHVGIAHTRWATHGQPKTENCHPHKSDPKGEFIVVHNGIITNYAALRK YLLSKGHVFESETDTECIAKLFKHFYDLNVKAGVFPDLNELTKQVLHELEGSYGLLVKSYHYPGEV CGTRKGSPLLVGVKTDKKLKVDFVDVEFEAQQQHRPQQPQINHNGATSAAELGFIPVAPGEQNLR TSQSRAFLSEDDLPMPVEFFLSSDPASVVQHTKKVLFLEDDDIAHIYDGELRIHRASTKSAGESTVR PIQTLEMELNEIMKGPYKHFMQKEIFEQPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIRICRRIIMI ACGTSYHSCLATRSIFEELTEIPVSVELASDFLDRRSPVFIDDTCVFVSQSGETADSILALQYCLERG ALTVGIVNSVGSSMSRQTHCGVHINAGPEIGVASTKAYTSQYIALVMFALSLSNAAIARKGRHEEIIK GLQKIPEQIKQVLKLENKIKDLCNSSLNDQHHLLLLGRGYQFATALEGALKIKEISYMHSEGVLAGEL KHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARDGRPIVICNEGDAIISNDKVHTTLEVPETVDC LQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPRNLAKSVTVESTOP

Rys. 73. Sekwencja aminokwasowa rekombinantowej syntazy GlcN-6-P po modyfikacji genetycznej w obszarze kontaktu międzi podjednostkami (*Ca*Gfa1-KHSH-G474LT487IG490LH492F). Na niebieskim tle – wymieniony aminokwas Arg394IIe; czerwone tło – Arg442IIe; zielone tło – Asp524Ala; fioletowe tło – Ser525Ala i Ser527Ala. Niebieską czcionką – dwie reszty His (tworzące mikro oligoHis w 3D).

Tab. 23. Teoretyczna masa cząsteczkowa: *Ca*Gfa1, *Ca*Gfa1-KHSH i rekombinantów CaGfa1-KHSH-*. Wartości wyznaczone na podstawie sekwencji aminokwasowej, za pomocą programu Protein Molecular Weight (http://www.bioinformatics.org/sms/prot mw.html).

	Teoretyczna masa	
	cząsteczkowa	
	Monomeru Oligome	
CaGfa1	79,13	316,52
CaGfa1-KHSH	79,19	316,76
CaGfa1-KHSH	70.15	216 60
-D524A	/9,13	510,00
CaGfa1-KHSH	70.12	316.48
-D524AS525AS525S	79,12	510,40
CaGfa1-KHSH	70.07	216.28
-R394ID524AS525AS525S	79,07	510,28
CaGfa1-KHSH	70.07	216.28
-R442ID524AS525AS525S	/9,07	510,28
CaGfa1-KHSH	70.03	316.12
-R394IR442ID524AS525AS525S	79,05	510,12

5.3.2.6.1. Masa monomeru (SDS-PAGE)

Eksperymentalną masę cząsteczkową monomeru poszczególnych mutein wyznaczam, korzystając z rozdziałów elektroforetycznych oczyszczonych preparatów białkowych (Materiały i Metody 4.10.1). Przykładowy rozdział SDS-PAGE dla *Ca*Gfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A przedstawiam na Rys. 74.

Dla sygnałów markera wyznaczyłam wartość ruchliwości elektroforetycznej R_e oraz sporządziłam wykres zależności logMW = $f(R_e)$ (Rys. 74 B). Korzystając z równania wykresu zależności logMW = $f(R_e)$ wyznaczyłam wartość masy monomeru *Ca*Gfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A równą 93±10 kDa. Różnica pomiędzy teoretyczną a eksperymentalną masą cząsteczkową monomeru jest dość duża. Powodem jej są błędy

podczas rozdziału elektroforetycznego np. zła jakość żelu lub przeładowanie białka (za grube prążki). W celu potwierdzenia otrzymanego wyniku, rozdział elektroforetyczny muteiny został przeze mnie powtórzony kilkukrotnie.

Dla pozostałych mutein procedura określania doświadczalnie MW monomeru była taka sama. Finalnie masy cząsteczkowe wszystkich pięciu rekombinantowych wersji *Ca*Gfa1-KHSH-* są zbliżone i wynoszą ok. 85±10 kDa.



Rys. 74. (A) Elektroforeza poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (żel 10%): M – marker Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – oczyszczony preparat białka *Ca*Gfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A; **(B)** Wykres zależności logMW = $f(R_e)$.

5.3.2.6.2. Masa oligomeru (SEC, Native-PAGE)

Strukturę oligomeryczną rekombinantowych wersji syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* w obszarze kontaktu między podjednostkami, określiłam za pomocą chromatografii rozmiarów wykluczających (Materiały i Metody 4.9). Frakcje odpowiadające maksimom pików z filtracji żelowej zebrałam w celu sprawdzenia ich aktywności katalitycznej i przeprowadzenia analizy elektroforetycznej w warunkach natywnych (Materiały i Metody 4.10.3.3) oraz denaturujących (Materiały i Metody 4.10.1). Efekt analiz dla wszystkich 5 mutein przedstawiam na Rys. 75-79. Kontrolne rozdziały dla *Ca*Gfa1 typu dzikiego i dla *Ca*Gfa1-KHSH przedstawiłam na Rys. 28 i 42A.



Rys. 75. Analiza *Ca*Gfa1-KHSH-D524A: (A) Chromatogram SEC (kolumna Superdex 200 10/300 GL; (B) Native-PAGE: M – marker The NativeMark Unstained Protein Standard (1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,15 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,86 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,24 ml; (C) SDS-PAGE: M - Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,15 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,86 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,24 ml.



Rys. 76. Analiza *Ca*Gfa1-KHSH-D524AS525AS527A: **(A)** Chromatogram SEC (kolumna Superdex 200 10/300 GL; **(B)** Native-PAGE: M – marker The NativeMark Unstained Protein Standard (1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,44 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,97 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,27 ml; **(C)** SDS-PAGE: M - Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,44 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,97 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,27 ml.



Rys. 77. Analiza *Ca*Gfa1-KHSH-R394ID524AS525AS527A: (A) Chromatogram SEC (kolumna Superdex 200 10/300 GL; (B) Native-PAGE: M – marker The NativeMark Unstained Protein Standard (1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,11 ml; 2 – frakcja z SEC przy 13,13 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,33 ml; (C) SDS-PAGE: M - Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,11 ml; 2 – frakcja z SEC przy 13,13 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,33 ml; 1 – frakcja z SEC przy 11,11 ml; 2 – frakcja z SEC przy 13,13 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,33 ml.



Rys. 78. Analiza *Ca*Gfa1-KHSH-R442ID524AS525AS527A: (A) Chromatogram SEC (kolumna Superdex 200 10/300 GL; (B) Native-PAGE: M – marker The NativeMark Unstained Protein Standard (1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,02 ml; 2 – frakcja z SEC przy 13,06 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,24 ml; (C) SDS-PAGE: M - Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,02 ml; 2 – frakcja z SEC przy 13,06 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,24 ml.



Rys. 79. Analiza *Ca*Gfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A: (A) Chromatogram SEC (kolumna Superdex 200 10/300 GL; (B) Native-PAGE: M – marker The NativeMark Unstained Protein Standard (1236; 1048; 720; 480; 242; 146; 66; 20 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,14 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,81 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,18 ml; (C) SDS-PAGE: M - Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (250; 130; 100; 70; 55; 35; 25; 15; 10 [kDa]); 1 – frakcja z SEC przy 11,14 ml; 2 – frakcja z SEC przy 12,81 ml; 3 – frakcja z SEC przy 14,18 ml.

Analizując rozdział chromatograficzny SEC pierwszej muteiny CaGfa1-KHSH-D524A zaobserwowałam aż 4 piki (Rys. 75). Dominujący sygnał otrzymany przy 12,86 ml. odpowiadał masie cząsteczkowej potencjalnego dimeru (164 kDa) i wykazywał największą aktywność katalityczną syntazy GlcN-6-P. Przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w warunkach natywnych prążek z tego piku pojawił się na wysokości odpowiadającej 205 kDa, a w warunkach denaturujących - 92 kDa, co potwierdziło dimeryczną forme muteiny. Niewielkie rozbieżności między masą cząsteczkową wyznaczoną elektroforetycznie i chromatograficznie mieszczą się w błędzie dopuszczalnym. Należy zwrócić również uwagę na pik pojawiający się przy 11,15 ml, który odpowiadał masie 343 kDa i nie wykazywał aktywności katalitycznej. Podobną masę dla tego sygnału otrzymałam z rozdziału Native-PAGE (389 kDa). Z kolei w rozdziale SDS-PAGE nie zaobserwowałam prążka odpowiadającego syntazie GlcN-6-P. Powodem braku sygnału pochodzącego od monomeru w SDS-PAGE i braku aktywności enzymatycznej było przypuszczalnie zbyt niskie stężenie białka. Jednakże zakładając, że forma dimeryczna wykazała aktywność katalityczna, to forma tetrameru również zachowała aktywność katalizowanej reakcji. Kolejny pik pojawił się przy 14,24 ml, który odpowiadał masie 90 kDa i wykazywał w niskim stopniu aktywność katalityczną. Można byłoby podejrzewać, że odpowiada on formie monomerycznej. Jednakże w rozdziałach elektroforetycznych pojawiły się dodatkowe prążki na wysokości: 108 kDa w Native-PAGE i 104 kDa w SDS-PAGE, co jednoznacznie wskazało na obecność dodatkowego białka stanowiącego zanieczyszczenie, a nie pochodną CaGfa1. Natomiast zaobserwowana aktywność katalityczna była przypuszczalnie efektem nakładania się pików i pochodziła z cząsteczki dimerycznej. Dalsze sygnały odpowiadające masie poniżej 50 kDa, stanowiły zanieczyszczenia. Z powyższej analizy stwierdziłam, że syntaza GlcN-6-P z C. albicans po wymianie Asp524 na Ala, w większości występuje jako dimer, a tylko w śladowych ilościach zachowała formę tetrameryczną.

Podobna sytuacja pojawiła się w przypadku pozostałych mutein, dla których w profilu elucyjnym SEC również pojawiły się 4 piki (Rys 76-79, Tab. 24). We wszystkich przypadkach analiza Native-PAGE i SDS-PAGE potwierdziły obecność struktur dimerycznych. Dodatkowo w elektroforezie natywnej w ścieżce rozdziału eluatu z filtracji żelowej ok. 11 ml cały czas można było zaobserwować prążki na wysokości masy cząsteczkowej ok. 380 kDa, co wskazywało na niewielkie ilości tetrameru o potencjalnej aktywności katalitycznej (nie potwierdzonej doświadczalnie). W celu jednoznacznego potwierdzenia śladowych ilości formy tetramerycznej konieczne byłoby uzyskanie większego stężenia białka w tej frakcji. Na podstawie powyższych wyników stwierdzam, że stopniowe

wprowadzanie dodatkowych mutacji w obszarze kontaktu miedzy poszczególnymi podjednostkami: Arg394Ile, Arg442Ile, Ser525Ala i Ser527Ala nie wpłynęła znacząco na strukturę oligomeryczną białka. Nie oznacza to jednak, że reszty te nie mają istotnego znaczenia na siłę wiązania dwóch podjednostek dimerycznych, gdyż wiązania tworzone przez te reszty mogły być zerwane już po pierwszej mutagenezie. Aby dokładnie oznaczyć rolę poszczególnych reszt aminokwasowych: Arg394, Arg442, Ser525 i Ser527 konieczne jest wprowadzenie mutacji pojedynczo i każdej osobno do genu eukariotycznej syntazy GlcN-6-P.

Tab. 24. Zestawienie wyników z teoretycznej i eksperymentalnej analizy masy cząsteczkowej dla wszystkich 5 form rekombinantowych białek *Ca*Gfa1-KHSH-* i porównanie z danymi dla *Ca*Gfa1 [Carnecka 2012] oraz *Ca*Gfa1-KHSH (Rozdział 5.1.8). ¹⁾ "+ +" – aktywność katalityczna potwierdzona w reakcji Elsona-Morgana; "+" – aktywność katalityczna nie potwierdzona w reakcji Elsona-Morgana, ale wynikająca z założenia, że minimalna funkcjonalna podjednostka to dimer.

Masa teoretyczna monomeru [kDa]	Masa monomeru (SDS-PAGE) [kDa]	Masa oligomeru (SEC) [kDa]	Masa oligomeru (Native-PAGE) [kDa]	Aktywność katalityczna ¹⁾	Prawdopodobna struktura IV-rzędowa		
<i>Ca</i> Gfa1							
79,13	79 ± 7	344	340 ± 9	++	Tetramer		
CaGfa1-KHSH							
79,19	86 ± 8	329	300-350	++	Tetramer		
CaGfa1-KHSH-D524A							
70.15	02 + 10	343	$389\ \pm 39$	+	Tetramer		
/9,15	92 ± 10	164	205 ± 21	++	Dimer		
CaGfa1-KHSH-D524A8525AS527A							
70.12	77 ± 8	306	380 ± 38	+	Tetramer		
/9,12		156	199 ± 20	++	Dimer		
CaGfa1-KHSH-R394ID524AS525AS527A							
70.07	87 ± 9	344	412 ± 42	+	Tetramer		
/9,07		146	230 ± 23	++	Dimer		
CaGfa1-KHSH-R442ID524AS525AS527A							
70.07	77 ± 8	363	387 ± 39	+	Tetramer		
/9,07		150	225 ± 23	++	Dimer		
CaGfa1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A							
79,03	85 ± 9	344	415 ± 42	+	Tetramer		
		167	196 ± 20	++	Dimer		

Analizując wpływ przeprowadzonych mutagenez w obszarze kontaktu między poszczególnymi podjednostkami, warto przypomnieć, że wyróżniamy dwa różne rejony kontaktu między łańcuchem A-D i B-C oraz A-C i B-D (Rys. 65 i 66) [Raczyńska i in. 2007]. W ramach pierwszego obszaru wymieniłam reszty: Asp524, Ser525 i Ser527, które tworzą pętlę 524-527 odpowiadającą za kontakt między łańcuchem A i D oraz B i C. Należy również

podkreślić, że w ramach tej pętli kwas asparaginowy w pozycji 524 bierze udział we wszystkich zidentyfikowanych do tej pory w tym obszarze wiązaniach wodorowych: 3 wiązania z łańcucha bocznego (dwa z Ser527 i jedno z Ser525) oraz 1 wiązanie z łańcucha głównego Asp524 (z Ile526). Zatem pojawienie się formy dimerycznej już po wymianie zaledwie tej jednej reszty, potwierdza znaczenie i funkcjonalność Asp524. Z kolei wymiana Ser525 i Ser527, nie wpłyneła dodatkowo na siłę oddziaływania między podjednostkami, ponieważ wiązania w którym uczestniczą zostały zaburzone wcześniejszą substytucją w pozycji 524. Finalnie usunięcie silnie zakonserwowanej w eukariotycznej syntazie GlcN-6-P reszty Asp524, przekształca enzym w formę właściwą dla wersji prokariotycznej. Z kolei w ramach drugiego obszaru kontaktu między łańcuchami A-C i B-D za najistotniejsze uznałam reszty Arg394 i Arg442, które tworzą większość zidentyfikowanych wiązań wodorowych w tym rejonie. Substytucja tych reszt, przez aminokwasy pozbawione grup tworzących wiązania wodorowe, przypuszczalnie osłabiła siłę wiązania między poszczególnymi łańcuchami, ale struktura dimeryczna wciąż została zachowana, co wskazuje na występowanie dodatkowych reszt odpowiedzialnych za oddziaływanie między łańcuchami A i C oraz B i D.

PODSUMOWANIE:

Mutageneza reszt aminokwasowych (Arg394Ile, Arg442Ile, Asp524Ala, Ser525Ala i Ser527Ala) z obszaru kontaktu między poszczególnymi podjednostkami znacząco wpłynęła na strukturę oligomeryczną enzymu. W szczególności usunięcie reszty Asp524, wywołało dezintegrację naturalnej dla eukariotycznego enzymu struktury tetramerycznej i promowało tworzenie funkcjonalnej i charakterystycznej dla prokariotycznego białka formę dimeryczną. Pozostałe zmiany nie wpłynęły dodatkowo na strukturę oligomeryczną białka. Otrzymana wersja homodimeru CaGfa1-KHSH-D524A zachowała aktywność katalityczna, ale w stosunku do syntazy GlcN-6-P typu dzikiego jest ona obniżona, a z każdą kolejną zmianą aktywność ta jest na coraz niższym poziomie. Dla wszystkich mutein powinowactwo enzymu względem Fru-6-P w niewielkim stopniu wzrosło, natomiast względem L-Gln wzrosło gwałtownie i w bardzo wysokim stopniu, co jest bardzo zaskakujące, a mechanizm tej zmiany nie został wyjaśniony. Już po wprowadzeniu pierwszej zmiany nastąpiła utrata wrażliwości na działanie fizjologicznego inhibitora UDP-GlcNAc.

6. PODSUMOWANIE

- Skonstruowany plazmid ekspresyjny pET23b-*CaGFA1-K568HS569H*, zawierający gen syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* z mikro fragmentem oligoHis, jest dobrym przykładem nowoczesnego podejścia do tworzenia białek fuzyjnych. Koncepcja ta umożliwia wprowadzenie minimalnej ilości modyfikacji genetycznych, co pazwala uniknąć dodatkowych zmian na pozostałe właściwości białka. Układ ten sumarycznie składa się z 6-His, które są tworzone przez 2 triady histydynowe z dwóch sąsiednich monomerów: His568-His569-His596 (His596 naturalnie występuje w genie, natomiast dwie pozostałe His zostały wprowadzone podczas mutagenezy w pozycję Lys568 i Ser569). Uwzględniając fakt, że syntaza GlcN-6-P naturalnie występuję jako tetramer, w całej cząsteczce enzymu pojawiają się dwa takie układy. Po zoptymalizowaniu warunków nadprodukcji i oczyszczania, otrzymaną muteinę poddałam dokładnej charakterystyce.
 - a. Eksprymowana muteina stanowiła ok. 20% wszystkich białek występujących w komórkach *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, co odpowiadało ok. 15-25 mg/l *Ca*Gfa1-K568HS569H.
 - b. Wykreowany mikro fragment oligoHis umożliwił szybkie i efektywne oczyszczanie za pomocą chromatografii metalopowinnowactwa z wydajnością ok. 50%, stopniem oczyszczania ok. 9,6 i homogennością oczyszczonego preparatu rzędu co najmniej 96%.
 - c. *Ca*Gfa1-K568HS569H zachowała aktywność katalityczną na poziomie 6,80 U/mg, oraz wrażliwość na fizjologiczny inhibitor UDP-GlcNAc. Wszystkie określone parametry katalityczne (K_{M Fru-6-P} = 1,90±0,06 mM, K_{M L-Gln} = 1,33±0,08 mM, $V_{max} = 6,15\pm0,08 \mu mol*min^{-1}*mg^{-1}$) i inhibicyjne (IC_{50 UDP-GlcNAc} = 2,0±0,4 mM) dla *Ca*Gfa1-K568HS569H są zbliżone do tychże parametrów enzymu typu dzikiego.
 - d. Muteina zachowała niezmienioną strukturę homotetrameru.

Zgodnie z założeniem, uzyskane wyniki potwierdzają, że modyfikowane reszty Lys568 i Ser569 w syntazie GlcN-6-P z *C. albicans* nie odgrywają żadnej istotnej roli w katalizowanej reakcji, w miejscu wiązania cząsteczki UDP-GlcNAc i w kontaktach między poszczególnymi podjednostkami.

 Analiza bioinformatyczna syntazy GlcN-6-P z C. albicans wykazała, że jest to białko bardzo trudno krystalizujące. Zawiera wiele fragmentów elastycznych, przez co jest cząsteczką wykazującą dużą ruchliwość. W wyniku przesiewowych prób krystalizacyjnych otrzymane zostały kryształy, jednakże ich jakość nie była odpowiednia dla wykonania analizy rentgenograficznej. Tym niemniej wyselekcjonoane warunki krystalizacji mogą stanowić podstawę do dalszej optymalizacji.

- W wyniku mutagenezy reszt potencjonalnie odpowiedzialnych za wiązanie cząsteczki inhibitora UDP-GlcNAc, otrzymałam plazmid ekspresyjny pET23b-CaGFA1-G474LT487IG490LH492F. Po zoptymalizowaniu warunków nadprodukcji i oczyszczania, otrzymany rekombinant poddałam dokładnej charakterystyce.
 - a. Po zoptymalizowaniu warunków hodowli muteina stanowiła ok. 20% wszystkich białek występujących w komórkach *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, co sumarycznie odpowiadało ok. 10-20 mg/l *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F.
 - b. Podczas oczyszczania rekombinanta, za pomocą metod wytrąceniowych i chromatografii jonowymiennej, z 1 dm³ hodowli otrzymałam ok. 9 mg *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F o aktywności specyficznej rzędu 0,18-0,41 U/mg i homogenności ok. 80% (wydajność 67,1%, stopień oczyszczania 7,2).
 - c. Aktywność katalityczna muteiny w znacznym stopniu uległa obniżeniu $(V_{max} = 0.34\pm0.02 \ \mu mol^*min^{-1}*mg^{-1})$. Powinowactwo enzymu względem Fru-6-P w niewielkim stopniu wzrosło (K_{M Fru-6-P} = 1.23±0.08 mM), natomiast względem L-Gln wzrost ten był mniej więcej 3 krotny (K_{M L-Gln} = 0.54±0.03 mM).
 - d. *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F została pozbawiona wrażliwości na fizjologiczny inhibitor UDP-GlcNAc typowy dla syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego.
 - e. Ponadto zaskakujące wyniki otrzymałam z analizy masy cząsteczkowej otrzymanego rekombinanta za pomocą metod SEC, Native- i SDS-PAGE. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzam, że *Ca*Gfa1-G474LT487IG490LH492F występuje w 3 formach oligomeryzacyjnych:
 - tetramer aktywny katalitycznie
 - dimer aktywny katalitycznie
 - monomer nieaktywny katalitycznie

Finalnie: reszty Gly474, Thr487, Gly490 i His 492 odpowiadają za właściwe uformowanie kieszeni białkowej i w konsekwencji za wiązanie cząsteczki inhibitora UDP-GlcNAc. Ponadto wprowadzenie reszt aminokwasowych z bardziej rozwiniętymi łańcuchami bocznymi, wywołało zmiany w strukturze poszczególnych fragmentów białka, co pośrednio oddziałuje na centrum katalityczne enzymu i obszar kontaktu między poszczególnymi podjednostkami.

- 4. Analizując strukturę tetrameryczną domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*, wytypowałam reszty aminokwasowe potencjalnie odgrywające główną rolę w tworzeniu wiązań między poszczególnymi podjednostkami: Arg394, Arg442, Asp524, Ser525 i Ser527. Wykorzystując mutagenezę ukierunkowaną stopniowo wymieniłam zaproponowane reszty aminokwasowe, w efekcie otrzymując szereg plazmidów: pET23b-*CaGFA1-KHSH-D524A*, pET23b-*CaGFA1-KHSH-D524A*, pET23b-*CaGFA1-KHSH-D524AS525AS527A*, pET23b-*CaGFA1-KHSH-R394ID524AS525AS527A*, pET23b-*CaGFA1-KHSH-R394ID524AS525AS527A*, pET23b-*CaGFA1-KHSH-R394ID524AS525AS527A*, a pET23b-*CaGFA1-KHSH-R394ID524AS525AS527A*, pET23b-*CaGFA1-KHSH-R394IR442ID524AS525AS527A*. Następnie zoptymalizowałam warunków nadprodukcji i oczyszczania, a otrzymane muteiny poddałam dokładnej charakterystyce.
 - a. Po optymalizacji procesu ekspresji, poszczególne muteiny stanowiły ok. 10% wszystkich białek występujących w *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, co odpowiadało ok. 5-15 mg/l rekombinantowego białka.
 - b. Dla wszystkich pochonych *Ca*Gfa1-KHSH-* podczas procesu oczyszczania, wykorzystującego metody wytrąceniowe i chromatografię jonowymienną, z 1 dm³ hodowli otrzymywałam od 2 do 8 mg poszczególnych rekombinantów o czystości ok. 90% (wydajność 27-58%, stopień oczyszczania 6,11-17,20).
 - c. Aktywność katalityczna mutein znacznie spadła. Już po wymianie pierwszego aminokwasu wartość V_{max} obniżyła się prawie 4 krotnie, a po wprowadzeniu każdej kolejnej zmiany, poziom katalizowanej reakcji jeszcze bardziej się obniżał. Dla wszystkich rekombinantów powinowactwo enzymu względem Fru-6-P w niewielkim stopniu wzrosło. Natomiast względem L-Gln, wzrost powinowactwa jest gwałtowny i zaskakująco duży.
 - d. Po wymianie pierwszej reszty Asp524Ala, pochodne *Ca*Gfa1-KHSH-* utraciły podatność na inhibicyjne działanie UDP-GlcNAc.
 - e. Syntaza GlcN-6-P z *C. albicans* już po wymianie pierwszej reszty Asp524Ala, w większości występuje jako dimer, a tylko w śladowych ilościach zachowała strukturę tetrameru (obie struktury aktywne katalitycznie). Kolejne zmiany nie pogłębiły rozpadu cząsteczki enzymu i również występują w formie dimeru oraz w śladowych ilościach tetrameru.

Zgodnie z założeniem zaproponowane reszty: Arg394, Arg442, Asp524, Ser525 i Ser527 (w szczególności Asp524) odpowiadają za tworzenie wiązań między dwiema cząsteczkami dimerycznymi tworzącymi tetramer. Ponadto każda wprowadzona zmiana oddziałuje z centrum katalitycznym i kieszenią białkową wiążącą UDP-GlcNAc, zakłócając ich funkcjonalność.

W wyniku mutagenezy reszt z kieszeni białkowej wiążącej UDP-GlcNAc i z obszaru kontaktu między poszczególnymi podjednostkami zaobserwowałam zależność, że oba te obszary oddziałują wzajemnie na siebie. Podczas zmian inhibicję powodujacych desensytyzację na przez UDP-GlcNAc, struktura czwartorzędowa enzymu uległa zmianie. Natomiast muteiny ze zmianami powodujacymi zahamowanie tworzenia tetrameru nie były wrażliwe na hamowanie aktywności katakitycznej przez UDP-GlcNAc. Można z tego wnioskować, że pomiędzy elementami struktury enzymu odpowiedzialnymi za obie cechy występują wzajemne oddziaływania, a selektywne zmiany tylko jednej z tych cech nie wydają się możliwe. Otrzymane wyniki potwierdzają hipotezę, że podatność na inhibicyjne działanie UDP-GlcNAc jest uwarunkowane tetrameryczną strukturą enzymu, charakterystyczną dla syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego. Dodatkowo w obu przypadkach zaobserwowano utratę aktywności katalitycznej, co prawdopodobnie jest efektem zmian strukturalnych, które pośrednio wpływają na sąsiedni obszar, zmieniajac jego funkcjonalność.

BADANIA FINANSOWANE Z:

Grantu Ministerstwa Szkolnictwa Wyższego nr N N301 105838.

STYPENDIA NAUKOWE:

- InnoDoktorant ed. VI przyznane przez Pomorską Specjalną Strefę Ekonomiczną sp. z o.o. i Gdański Park Naukowo-Technologiczny (2015r.).
- InterPhD ed. I w ramach projektu "Rozwój interdyscyplinarny studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" (POKL.04.01.01-00-368/09, 2009-2010r.).

LITERATURA

- Adler A.J., Glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase and glycoprotein synthesis in the developing chick eye. *Curr Eye Res.* 3(2): 351-361 (1984).
- Assrir N., Richez C., Burand P., Guittet E., Badet B., Lescop E., Badet-Denisot M.A., Mapping the UDP-*N*-acetylglucosamine regulatory site of human glucosamine-6P synthase by saturation-transfer difference NMR and site-directed mutagenesis. *Biochimie* 97: 39-48 (2014).
- Badet B., Vermoote P., Haumont P.Y., Lederer F., Le Goffic F., Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* 26(7): 1940-1948 (1987).
- Badet B., Vermoote P., Le Goffic F., Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry* 27(7): 2282-2287 (1988).
- Bai L.S., Kurup P.A., Sex hormones and metabolism of glycosaminoglycans. I. Effect of orchidectomy and administration of testosterone in rabbits. *Metabolism* 25(12): 1535-1543 (1976).
- Banerjee K., Gupta U., Gupta S., Sharma S.K., Jain C.K., Functional co-evolutionary study of glucosamine-6-phosphate synthase in mycoses causing fungi. *Bioinformation* 7(1): 5-8 (2011).
- Barrick J.E., Corbino K.A., Winkler W.C., Nahvi A., Mandal M., Collins J., Lee M., Roth A., Sudarsan N., Jona I., Wickiser J.K., Breaker R.R., New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(17): 6421-6426 (2004).
- Bates C.J., Adams W.R., Handschumacher R.E., Control of the formation of uridine diphospho-*N*-acetyl-hexosamine and glycoprotein synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 241(8): 1705-1712 (1966).
- Bennett B.D., Kimball E.H., Gao M., Osterhout R., VanDien S.J., Rabinowitz J.D., Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5(8): 593-599 (2009).
- Bolanos-Gracia V.M., Davies O.R., Structural analysis and classification of native protein from *E. coli* commonly co-purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(9): 1304-1313 (2006).
- Borgia, P.T., Roles of The orla, tsE and bimG genes of *Aspergillus nidulans* in chitin synthesis. *J. Bacteriol.*, 174(2): 384-389 (1992).
- Borowski E., Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco*. 55(3): 206-208 (2000).
- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).
- Broschat K.O., Gorka C., Page J.D., Martin-Berger C.L., Davies M.S., Huang H., Gulve E.A., Salsgiver W.J., Kasten T.P., Kinetic characterization of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine-6-phosphate. J. Biol. Chem. 277(17): 14764-14770 (2002).
- Brownlee M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813-820 (2001).
- Buchanan J.M., The amidotransferases. Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mlo. Biol. 39: 91-183 (1973).
- Burt D., Brodbeck K., Haring H.U., Schleicher E.D., Weigert C., Partial characterisation of the human GFAT1 promoter: effect of single nucleotide polymorphisms on promoter function. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1740: 85-90 (2005).

- Buse M.G., Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290(1): E1-E8 (2006).
- Chang Q., Su K., Baker J.R., Yang X., Paterson A.J., Kudlow J.E., Phosphorylation of *Human* glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at Serine205 blocs the enzyme activity. *J. Biol.Chem.* 275(29): 21981-21987 (2000).
- Chevreux G., Atmanene C., Lopez P., Ouazzani J. Van Dorsselaer A., Badet B., Badet-Denisot M.A., Sanglier-Cianférani S., Minitoring the dynamics of monomer exchange using electrospray mass spectrometry the case of the dimeric glucosamine-6-phosphate synthase. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 22(3): 431-439 (2011).
- Chiew Y.Y., Shepherd M.G., Sullivan P.A., Regulation of chitin synthesis during germ-tube formation in *Candida albicans*. *Arch Microbiol.*, 125(1-2): 97-104 (1980).
- Chmara H., Borowski E., Bacteriolytic effect of cessation of glucosamine supply, induced by specific inhibition of glucosamine-6-phosphate synthase. *Acta Microbiol. Pol.* 35(1-2): 15-27 (1986).
- Chou K.C., Molecular therapeutic target for type-2 diabetes. J. Proteome Res. 3(6): 1284-1288 (2004).
- Czarnecka J., Kwiatkowska K., Gabriel I., Wojciechowski M., Milewski S., Engineering *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase for efficient enzyme purification. *J. Mol. Recognit.* 25(11): 564-570 (2012).
- DeHaven J.E., Robinson K.A., Nelson B.A., Buse M.G., A Novel variant of glutamine: fructose-6phosphate amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA is selectively expressed in striated muscle. *Diabetes* 50: 2419-2424 (2001).
- Dummitt B., Micka W.S., Chang Y.H., Yeast glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (Gfa1) requires methionine aminopeptidase activity for proper function. *J. Biol. Chem.* 280(14): 14356-14360 (2005).
- Durand P., Golinelli-Pimpaneau B., Mouilleron S., Badet B., Badet-Denisot M.A., Highlights of glucosamine-6-P synthase catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 474(2): 302–317 (2008).
- Eguchi S., Oshiro N., Miyamoto T., Yoshino K., Okamoto S., Ono T., Kikkawa U., Yonezawa K., AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes Cells* 14(2): 179-189 (2009).
- Endo A., Kaiki K., Miasto T., Feedback inhibition of L-glutamine D-fructose 6-phosphate aminotransferase by uridine diphosphate N-acetylglucosamine in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 103(3): 588-594 (1970).
- Etchebehere L.C., Maia J.C., Phosphorylation-dependent regulation of amidotransferase during the development of *Blastocladiella emersonii*. Arch. Biochem. Biophys. 272(2): 301-310 (1989).
- Floquet N., Durand P., Maigret B., Badet B., Badet-Denisot M.A., Perahia D., Collective motion in glucosamine-6-phosphate synthase : influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site. *J. Mol. Biol.*, 385(2): 653-664 (2009).
- Floquet N., Mouilleron S., Daher R., Maigret B., Badet B., Badet-Denisot M.A., Ammonia channeling in bacterial glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS): molecular dynamics simulations and kinetic studies of protein mutants. *FEBS Lett.* 581(16): 2981-2987 (2007).
- Freese E.B., Cole R.M., Klofat W., Freese E., Growth, sporulation and enzyme defects of glucosamine mutants of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 101(3): 1046-1062 (1970).
- Frisa P.S., Sonneborn D.R., Developmentally regulated interconversions between end productinhibitable and noninhibitable forms of a first pathway-specific enzyme activity can be mimicked *in vitro* by protein dephosphorylation-phosphorylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79(20): 6289-6293 (1982).

- Gabriel I., Olchowy J., Stanisławska-Sachadyn A., Mio T., Kur J., Milewski S., Phosphorylation of glucosamine-6-phosphate synthase is important but not essential for germination and mycelial growth of *Candida albicans. FEMS Microbiol. Lett.*, 235(1): 73-80 (2004).
- Ghosh S., Blumenthal H.J., Davidson E., Rosman S., Glucosamine metabolism: V. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate. J. Biol. Chem. 235: 1265-1273 (1960).
- Golinelli-Pimpaneau B., Badet B., Possible involvement of Lys603 from *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase in the binding of its substrate fructose 6-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 201(1): 175-182 (1991).
- González-Ibarra J., Milewski S., Villagómez-Castro J.C., Cano-Canchola C., López-Romero E., *Sporothrix schenckii*: purification and partial biochemical characterization of glucosamine-6-phosphate synthase, a potential antifungal target. *Med. Mycol.* 48(1): 110-121 (2010).
- Graack H.R., Cinque U., Kress H., Functional regulation of glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFAT1) of *Drosophila melanogaster* in a UDP-*N*-acetylglucosamine and cAMP-dependent manner. *Biochem.J.* 360(Pt2): 401-412 (2001).
- Gupta U., Banerjee K., Gabrani R., Gupta S., Sharma S.K., Jain C.K., Variability analyses of functional domain within glucosamine-6-phosphate synthase of mycoses-causing fungi. *Bioinformation* 6(5): 196-199 (2011).
- Hebert L.F.Jr., Baniels M.C., Zhou J., Crook E.D., Turner R.L., Simmons S.T., Neidigh J.L., Ahu J.S., Baron A.D., McClain D.A., Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. J. Clin. Invest. 98(4): 930-936 (1996).
- Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., Lindahl E., GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4: 435-447 (2008).
- Hosoi K., Kobayashi S., Ueha T., Sex difference in L-glutamine D-fructose-6-phosphate aminotransferase activity of mouse submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta* 543(3): 283-292 (1978).
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K., VMD: Visual molecular dynamics. J. Mol. Graphics 14: 33-38 (1996).
- Huynh Q.K., Gulve E.A., Dian T., Purification and characterization of glutamine: fructose 6-phosphate amidotransferase from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 379(2): 307-313 (2000).
- Imada Y., Nozaki F., Kawashima M., Yoneda Y., Regulation of glukosamine utilization in *Syaphylococcus aureus* and *Escherichia coli. J. Gen. Microbiol.* 100(2): 329-337 (1977).
- Isupov M.N., Obmolova G., Butterworth S., Badet- Denisot M.A., Badet B., Polikarpov I., Littlechild J.A., Teplayakov A., Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine-6 –phosphate synthase. *Structure* 4(7): 801-810 (1996).
- Jaffe E.K., Morpheeins a new structural paradigm for allosteric regulation. *Trends Biochem. Sci.* 30(9): 490-497 (2005).
- Jędrzejczak R., Wojciechowski M., Andruszkiewicz R., Sowiński P., Kot-Wasik A., Milewski S., Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthase by N^3 -oxoacyl derivatives of L-2,3-diaminopropanoic acid. *Chembiochem.* 13(1): 85-96 (2012).
- Joanny G., Le Derout J., Bréchemier-Baey D., Labas V., Vinh J., Régnier P., Hajnsdorf E., Polyadenylation of a functional mRNA controls gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic*. *Acids Res.* 35(8): 2494-2502 (2007).
- Kalamorz F., Reichenbach B., März W., Rak B., Görke B., Feedback control of glucosamine-6phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli. Mol. Microbiol.* 65(6): 1518-1533 (2007).
- Katerina Z., Krupka M., Chamrad I., Belakova J., Horynova M., Weigl E., Sebela M., Raska M., Novel modification of growth medium enables efficient *E. coli* expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine Hsp70 protein. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(7): 727-733 (2009).
- Kening M., Vandamme E., Abraham E.P., The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. J. Gen. Microbiol. 94(1): 46-54 (1976).
- Kornfeld, R., Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate aminotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 242: 3135-3141 (1967).
- Kucharczyk N., Denisot M.A, Le Goffic F., Badet B. Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*: determination of the mechanism of inactivation by N³-fumaroyl-L-2,3-diaminopropanic derivatives. *Biochemistry* 29: 3668-3676 (1990).
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685 (1970).
- Le Derout J., Bréchemier-Baey D., Labas V., Vinh J., Régnier P., Hajnsdorf E., Polyadenylation of a functional mRNA controls gene expression in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 35(8): 2494-2502 (2007).
- Leriche C., Badet-Denisot M.A., Badet B., Characterisation pf a phosphoglucose isomerase-like activity associated with the carboxy-terminal domain of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase. J. Am. Chem. Soc. 118(7): 1797-1798 (1996).
- Li Y., Roux C., Lazereg S., LeCaer J.P., Laprévote O., Badet B., Badet-Denisot M.A., Identification of a novel serine phosphorylation site in *human* glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase isoform 1. *Biochemistry* 46(45): 13163-13169 (2007).
- Link K.H., Guo L., Breaker R.R., Examination of the structural and functional versatility of *glmS* ribozymes by using *in vitro* selection. *Nucl. Acids Res.* 34(17): 4968-4975 (2006).
- Luo C., Ahao W., Li X., Chen Z., Lin Y., Molecular cloning, sequencing and expression of a L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase gene from *Volvariella volvacea*. *Protein* J. 28(1): 34-43 (2009).
- Maia J.C., Hexosamine and cell wall biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *FASEB J.* 8(11): 848-853 (1994).
- Marshall S., Bacote V., Traxinger R.R., Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.*266(16): 10155-10161 (1991).
- Massière F, Badet-Denisot M.A., The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 54(3): 205-222 (1998).
- McClain D.A., Crook E.D., Hexosamines and insulin resistance. Diabetes 45(8): 1003-1009 (1996).
- McKnight G.L., Mudri S.L., Mathewes A.L., Rraxinger R.R., Marshall S., Sheppard P.O., O'Hara P.J., Molecular cloning, cDNA sequence and bacterial expression of *Human* glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* 267(35): 25208-25212 (1992).
- Milewski, S., Glucosamine-6-phosphate synthase the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1597: 173-192 (2002).
- Milewski S., Chmara H., Andruszkiewicz R., Borowski E., Zaremba M., Borowski J., Antifungal peptides with novel specific inhibitors of glucosamine 6-phosphate synthase. *Drugs Exp. Clin. Res.* 14(7): 461-465 (1988).
- Milewski S., Chamara H., Borowski E., Antibiotic tetaine a selective inhibitor of chitin and mannoprotein biosynthesis in *Candida albicans. Arch. Microbiol.* 145(3): 234-240 (1986).

- Milewski S., Kuszczak D., Jędrzejczak R., Smith R.J., Brown A.J.P., Gooday G.W., Oligomeric structure and regulation of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 274(7): 4000-4008 (1999).
- Miszkiel A., Wojciechowski M., Milewski S., Long range molecular dynamics study of regulation of eukaryotic glucosamine-6-phosphate synthase activity by UDP-GlcNAc. J. Mol. Model. 17(12): 3102-3115 (2011).
- Miyagi T., Tsuiki S., Effect of phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate on UDP-N-acetylglucosamine inhibition of L-glutamine-D-fructose 6-phosphate aminotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 250(1): 51-62 (1971).
- Mohanty B.K., Kusher S.R., The majority of *Escherichia coli* mRNAs undergo post-transcriptional nodification in exponentially growing cells. *Nucl. Acids Res.* 34(19): 5695-5704 (2006).
- Mouilleron S., Badet-Denisot M.A., Badet B., Golinelli-Pimpaneau B., Dynamics of glucosamine-6-phosphate synthase catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 505(1): 1-12 (2010).
- Mouilleron S., Badet-Denisot M.A., Golinelli-Pimpaneau B., Glutamine binding opens the ammonia channel and activates glucosamine-6P synthase. J. Biol. Chem. 281(7): 4404-4412 (2006).
- Mouilleron S., Badet-Denisot M.A., Golinenlli-Pimpaneau B., Ordering of C-terminal loop and glutaminase domains of glucosamine-6-phosphate synthase promotes sugar ring opening and formation of the ammonia channel. J. Mol. Biol. 377(4): 1174-1185 (2008).
- Mouilleron S., Badet-Denisot M.A., Pecqueur L., Madiona K., Assrir N., Badet B., Golinelli-Pimpaneau B., Structural basic for morpheein-type allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine-phosphate synthase: equilibrium between inactive hexamer and active dimer. *J. Biol. Chem.* 287(41): 34533-34546 (2012).
- Nakaishi Y., Bando M., Shimiz H., Watanabe K., Goto F., Tsuge H., Kondo K., Komatsu M., Structural analysis of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase a key regulator in type 2 diabetes. *FEBS Lett.* 583(1): 163-167 (2009).
- Nerlich A.G., Sauer U., Kolm-Litty V., Wagner E., Koch M., Schleicher E.D., Expression of glucosamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes* 47(2): 170-178 (1998).
- Niimi M., Ogawara T., Yamashita T., Yamamoto Y., Ueyama A., Lambe T., Okamoto T., Ban T., Tamanoi H., Ozaki K., Fujiwara T., Fukui H., Takahashi E., Kyushiki H., Tanigami A., Identification of *GFA1-L*, *a* navel splice wariant of human glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferaze (*GFAT1*) that is expressed abundantly in skeletal muscle. *J. Hum. Genet.* 46(10): 566-571 (2001).
- Obmolova G., Badet-Denisot M.A., Badet B., Teplyakov A. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the two domain of glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 242(5): 703-705 (1994).
- Oki T., Yamazaki K., Kuromitsu J., Okada M., Tanaka I., cDNA cloning and mapping of a novel subtype of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT2) in human and mouse. *Genomics* 57(2): 227-234 (1999).
- Olchowy J., Gabriel I., Milewski S., Functional domains and interdomain communication in *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *Biochem. J.* 404(1): 121-130 (2007).
- Olchowy J., Kur K., Sachadyn P., Milewski S. Construction, purification and functional characterization of His-tagged *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 46(2): 309-315 (2006).
- Plumbridge J., Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites. *The EMBO J.* 14(16): 3958-3965 (1995).

- Plumbridge J.A., Cochet O., Souza J.M., Altamirano M.M., Calgano M.L., Badet B., Coordinated regulation of amino sugar-synthesising and – degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 175(16): 4951-4956 (1993).
- Raczyńska J., Olchowy J., Konariev P.V., Svergun D. I., Milewski S., Rypniewski W., The crystal and solution studies of glucosamine-6-phosphate synthase from *Candida albicans*. J. Mol. Biol. 372(3): 672-688 (2007).
- Richards T.C., Greengard O., Distribution of glutamine hexosephosphate aminotransferase in rat tissues; changes with state of differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 304(3): 842-850 (1973).
- Richez C., Boetzel J., Floquet N., Koteshwar K., Stevens J., Badet B., Badet-Denisot M.A., Expression and purification of active human internal His(6)-tagged L-glutamine: D-fructose-6P amidotransferase I. *Protein Expr. Purif.* 54(1): 45-53 (2007).
- Rossetti L., Hawkins M., Chen W., Gindi J., Barzilai N., *In vivo* glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycamin but not in hyperglycemic conscious rats. *J. Clin. Invest.* 96(1): 132-140 (1995).
- Rukmini V., Reddy P.R., Androgen influences on glucosamine 6-phosphate synthase in the epididymis of the rat. *Arch. Androl.* 11(1): 29-31 (1983).
- Sachadyn P., Jędrzejczak R., Milewski S., Kur J., Borowski E., Purification to homogeneity of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 19(3):343-349 (2000).
- Sachadyn P., Sobiewska G., Gooday G.W., Milewski S., Kur J., Cloning and seguence analysis of *Histoplasma capsulatum* glucosamine-6-phosphate synthase gene fragment. *Mycopathologia* 142(2): 67-70 (1998).
- Sali A., Blundell T.L., Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234(3): 779-815 (1993).
- Sarvas M., Mutant od *Escherichia coli* K-12 defective in D-glucosamine biosynthesis. *J. Bacteriol.* 105(2): 457-471 (1971).
- Sayeski P.P., Wang D., Su K., Han I.-O., Kudlow J.E., Cloning and partial characterization of the mouse glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (*GFAT*) gene promoter. *Nucl. Acids Res.* 25(7): 1458-1466 (1997).
- Selwood T., Jaffe E.K., Dynamic dissociating homo-oligomers and the control of protein function. *Arch. Biochem, Biophys.* 519(2): 131-143 (2012).
- Sharaev P.N., Bogdanov N.G., Sarycheva I.K., Zhukova E.E., Allosteric regulation of glucosamine synthetase activity by naphthoquinone derivatives and ethyl ester of di-(4-oxycumarinyl-3)-acetic acid. *Biokhimiia*. 46(2): 342-346 (1981).
- Sharaev P.N., Ivanov V.G., Bogdanov N.G., Regulation of glucosamine synthetase activity by cholesterol and hydrocortisone. *Biokhimiia*. 53(9): 1505-1508 (1988).
- Smith R.J., Milewski S., Brown A.J.P., Gooday G.W., Isolation and characterization of the *GFA1* gene encoding the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 178(8): 2320-2327 (1996).
- Sudarsan N., Barrick J.E., Breaker R.R., Metabolite-binding RNA domain are present in the genes of eukaryotes. *RNA* 9(6): 644-647 (2003).
- Teplyakov A., Obmolova G., Badet B., Badet-Denisot M.A., Channeling of ammonia on glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Mol. Biol.* 313(5): 1093-1102 (2001).
- Teplyakov A., Obmolova G., Badet-Denisot M.A., Badet B., The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Sci.* 8(3): 596-602 (1999).

- Teplyakov A., Obmolova G., Badet-Denisot M.A., Badet B., Polikarpov I., Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.5Ä crystal structure of the isomerase domain. *Structure* 6(8): 1047-1055 (1998).
- Todorova R., Isomerase activity of the C-terminal fructose-6-phosphate binding domain of glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*. J. Enz. Inhib. 16(4): 373-380 (2001).
- Tsuiki S., Miyagi T., Neoplastic alternation of glucosamine 6-phosphate synthase in rat liver. *Adv. Enzyme Regul.* 15: 35-52 (1976).
- Urban J.H., Papenfort K., Thomsen J., Schmitz R.A., Vogel J., A conserved small RNA promoters discoordinate expression of the glmUS operon mRNA to activate GlmS synthesis. *J. Mol. Biol.* 373(3): 521-528 (2007).
- Valerio-Lepiniec M., Aumont-Nicaise M., Roux C., Raynal B., England P., Badet B., Badet-Denisot M.A., Desmadril M., Analysis of the *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase activity by isothermal titration calorimetry and differential scanning calorinetry. *Arch. Biochem. Biophys.* 498(2): 95-104 (2010).
- Vogler A.P., Tretmann S., Lengeler J.W., Alternative route for biosynthesis of amino sugars in *Escherichia coli* K-12 mutants by means of a catabolic isomerase. *J. Bacteriol.* 171(12): 6586-6592 (1989).
- Wang S., Li P., Su J., Wu X., Liang R., Characterization and expression of glucosamine-6-phosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* DOI 10.1007/s10529-014-1561-y.
- Winkler W.C., Nahvi A., Roth A., Collins J.A., Breaker R.R., Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428(6980): 281-286 (2004).
- Winterburn P.J., Phelps C.F., Purification and some kinetic properties of liver glucosamine synthetase. *Biochem. J.* 121(4): 701-709 (1971).
- Whelan W.L., Ballou C.E., Sporulation in D-glucosamine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*: meiosis with defective ascospore wall formation. *J. Bacteriol.* 124(3): 1545-1557 (1975).
- Wojciechowski M., Milewski S., Mazerski J., Borowski E., Glucosamine-6-phosphate synthase, a novel target for antifungal agents. Molecular modelling studies in drug desing. *Acta Biochim. Pol.* 52(3): 647-653 (2005).
- Wu H.C., Wu T.C., Isolation and characterization of a glucosamine-requiring mutant of *Escherichia coli* K-12 defective in glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Bacteriol.* 105(2): 455-466 (1971).
- Xin Y., Hamelberg D., Deciphering the role of glucosamine-6-phosphate in the riboswich action of *glmS* ribozyme. *RNA* 16(12): 2455-2463 (2010).
- Yamazaki K., Mizui Y., Oki T., Okada M., Tanaka I., Cloning and characterization of mouse glutaminę:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 gene promoter. *Gene* 261(2): 329-336 (2000).
- Yki-Järvinen H., Daniels M.C., Virkamäki A., Mäkimattila S., DeFronzo R.A., McClain D., Increased glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in skeletal muscle of patient with NIDDM. *Diabetes* 45(3): 302-307 (1996).
- Yki-Järvinen H., Nyman T., Rissanen E., Leino M., Hämäläinen S., Virkamäki A., Hauguel-de Mouzon S., Glutamone:fructose-6-phosphate amidotransferase activity and gene expression are regulated in a tissue-specific fashion in pregnant rats. *Life Sci.* 65(2): 215-223 (1999).
- Zalkin H., Glutamine amidotransferases. Methods Enzymol. 113: 263-263 (1985).
- Zalkin H., The amidotransferases. Adv. Enzymol. 66: 203-309 (1993).
- Zheng J., Khalil M., Cannon J.F., Glc7p protein pjosphatase inhibits expression of glutamine-fructoze-6-phosphate transaminase from *GFA1. J. Biol. Chem.* 275(20): 18070-18078 (2000).

Zhou J., Huynh Q.K., Hoffman R.T., Crook E.D., Daniels M.C., Gulve E.A., McClain D.A., Regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase. *Diabetes* 47(12): 1836-1840 (1998).

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje w czasopismach z listy ISI

- 1. Czarnecka J., **Kwiatkowska K.**, Gabriel I., Wojciechowski M., Milewski S., Engineering *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase for efficient enzyme purification. *J Mol Recognit.* 25(11): 565-70 (2012)
- 2. **Kwiatkowska-Semrau K.**, Czarnecka J., Wojciechowski M., Milewski S., Heterogeneity of quaternary structure of glucosamine-6-phosphate deaminase from *Giardia lamblia*. Manuskrypt przyjęty do druku w *Parasitology Research*
- 3. **Kwiatkowska-Semrau K.**, Wojciechowski M., Milewski S., Modification of quaternary structure and desensitization to inhibition by UDP-GlcN-6-P of *C. albicans* GlcN-6-P synthase. manuskrypt w przygotowaniu.

Komunikaty na konferencjach naukowych:

- 1. **Kwiatkowska K.**, Napiórkowska A., Wojciechowski M., Milewski S., Desensitization of GlcN-6-P synthase to inhibition by UDP-GlcNAc. 48 Zjazd PTBioch w Toruniu, 02-05.09.2013, PL ISSN 0001-527X 35 11 13 (plakat).
- Cyman M., Myszka H., Kwiatkowska K., Milewski S., Liberek B., Synthesis of phosphono and phosphate derivatives of hydroxyimino-D-alditols as new potential antifungal agents. GLYCO22 XXII International Symposium on Glycoconjugates w Dalian, China, 23-28.06.2013 (plakat).
- 3. **Kwiatkowska K.**, Milewski S., Syntaza GlcN-6-P z *Candida albicans* jako cel molekularny w chemoterapii przeciwgrzybowej. Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki ed. IV, Gdańsk, 12-14.04.2013 (plakat).
- 4. **Kwiatkowska K.**, Czarnecka J., Gabriel I., Wojciechowski M., Milewski S., Engineering of glucosamine-6-phosphate synthase for efficient enzyme purification by metal affinity chromatography. 19th Meeting of the International Society for Molecular Recognition Affinity 2011, Tavira, Portugaial, 16-19.06.2011 (plakat).
- 5. **Kwiatkowska K.**, Czarnecka J., Wojciechowski M., Milewski S., Glucosamine-6phosphate synthasewith an oligoHis insert. XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wisła, 20-23.09.2010, PL ISSN: 0001-527X 35 11 13 (plakat).
- 6. **Kwiatkowska K.**, Czarnecka J., Construction of glucosamine-6-phosphate synthase with an inernal hexahistydyl fragment. XIII International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: Advences In Chemical and Mechanical Engineering, Gdańsk, 20-22.05.2010, ISBN: 978-83-88579-42-4 (prezentacja ustna).
- Kwiatkowska K., Czarnecka J., Milewski S., Mutageneza ukierunkowana enzymu deaminazy GlcN-6-P z Giardia lamblia. XXX Ogólnopolska Szkoła Chemii Akademickiego Stowarzyszenia Studentów Chemii – Chemia łączy, Przysieka, 30.04-04.05.2009 (plakat).
- Kwiatkowska K., Czarnecka J., Milewski S., Konstrukcja deaminazy glukozamino-6fosforanu z *Giardia lamblia* z metką poliHis na N-końcu łańcucha. X Ogólnopolskie Akademickie Seminarium Studentów Biotechnologii, Gdańsk, 21-23.11.2008, (plakat).

- 9. Kwiatkowska K., Doping genowy. XXVII Ogólnopolska Szkoła Chemii Akademickiego Stowarzyszenia Studentów Chemii – Ezoteryczna Chemia, Ciążeń, 15-19.11.2007 (plakat).
- 10. **Kwiatkowska K.**, Zdrowie i piękno, czyli moc pierwiastków. XLIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006, ISBN: 83-922424-4-0 (plakat).
- 11. Laszecka K., **Kwiatkowska K.**, Na ratunek ciemniejącym owocom. XLIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006, ISBN: 83-922424-4-0 (plakat).
- Włodarczyk Ł., Kwiatkowska K., Kropidłowska A., Poszukiwany poszukiwana, dukat – moneta. Zjazd Wiosenny Naukowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Św. Katarzyna, 04-06.04.2006, ISBN: 83-920343-4-1 (plakat).