„Otrzymywanie i analiza krystalograficzna wybranych białek układu roślina motylkowata – rizobium”

Magdalena Bejger

STRESZCZENIE

„Otrzymywanie i analiza krystalograficzna wybranych białek układu roślina motylkowata – rizobium” jest pracą doktorską, w której przedstawiam wyniki prac nad trzema niezależnymi zadaniami składowymi. Poszczególne zadania dotyczyły różnych obiektów badań, tj. różnych białek układu symbiotycznego i obejmowały inny zakres prac stanowiących fragment wieloetapowego procesu określania struktury przestrzennej białek. Stąd, w każdym z zadań pojawiały się inne problemy do rozwiązania.

1. Bakteryjne białka nodulacji

W pierwszym z zadań, obiektem badań była grupa pięciu białek nodulacji: NodA, NodB, NodU, NolO i NoeI, pochodzących z symbiotycznych bakterii brodawkowych. Celem zadania było przetestowanie wybranych białek pod kątem ich przydatności do badań krystalograficznych, a więc podjęcie próby uzyskania kryształów tych białek, bez których zastosowanie rentgenografii strukturalnej nie jest w ogóle możliwe. Szczegółowy zakres prac obejmował: uzyskanie plazmidowych wektorów ekspresyjnych, produkcję białek w komórkach *E. coli*, ich oczyszczanie i krystalizację.

Głównym problemem w tym zadaniu była nierozpuszczalność obiektów badań. Starałam się pokonać tę trudność na różne sposoby:

- wykorzystując odmienność sekwencji białek pochodzących z różnych szczepów;
- stosując wektory plazmidowe nadające różne cechy produkowanym białkom;
- zmieniając fizyko-chemiczno-biologiczne warunki procesu ekspresji (m. in. temperaturę, skład pożywek, komórki gospodarza);
- podejmując próbę ponownego zwinięcia białek izolowanych z ciałek inkluzyjnych.

Spośród wszystkich przetestowanych rozwiązań dwa okazały się kluczowe: termiczna indukcja białek opiekuńczych następująca przed ekspresją w 18ºC oraz obecność kowalencyjnie związanego białka fuzyjnego MBP. Dzięki tym dwóm zabiegom trzy

białka, NodA, NodB i NoeI, mogły zostać poddane procesowi oczyszczania. Niestety, mimo moich usilnych starań, dwa pozostałe obiekty badań (NodU i NolO) pozostawały nierozpuszczalne uniemożliwiając mi przejście do następnego etapu badań.

Kolejnym problemem w tym zadaniu była niestabilność białek nodulacji, które bardzo łatwo wytrącały się z roztworów. Starałam się ograniczyć agregację modyfikując protokoły oczyszczania, dodając lub usuwając poszczególne etapy. Modyfikowałam także skład stosowanych roztworów: używając buforów o różnym pH, optymalizując stężenie soli, wprowadzając czynniki redukujące oraz substancje poprawiające rozpuszczalność białek (np. glicerol, detergenty). Jedynie w przypadku białka NodA związanego z białkiem fuzyjnym MBP udało mi się skutecznie opanować agregację.

Aby zachować rozpuszczalność i stabilność białko NodA musiało pozostać związane z MBP, co źle wpływało na homogenność preparatu (weryfikowaną przy użyciu pomiarów DLS) i zmniejszało szanse pojawienia się kryształów. Zmieniłam więc plazmidowy wektor ekspresyjny tak, aby rekombinowane połączone białka NodA i MBP tworzyły sztywną konstrukcję. Ponadto zaprojektowałam dedykowany dla MBP zestaw roztworów do krystalizacji. Pomimo starań, nie uzyskałam żadnych monokryształów białek nodulacji.

Nie wiadomo dlaczego system ekspresyjny *E. coli*, który spośród wszystkich dostępnych systemów jest najbliższy genetycznie rizobiom i teoretycznie powinien być najwłaściwszy do produkcji ich białek, w zasadzie nie pozwalał uzyskać rozpuszczalnych białek. Nie wiadomo również dlaczego białka te są tak niestabilne w roztworach. Zawarta w literaturze charakterystyka białek nodulacji jest zbyt skąpa, aby moc wyciągać rzetelne wnioski. To wszystko sprawia, że białka nodulacji są niezwykle trudnymi obiektami badań i większość z nich nie nadaje się do badań krystalograficznych, z jedynym wyjątkiem białka NodA, które daje pewne nadzieje na pozytywny wynik ewentualnie kontynuowanych prac.

2. Asparaginaza z *Rhizobium* etli (AnsA)

W drugim zadaniu obiektem badań był enzym pochodzący z bakterii glebowej *Rhizobium etli*, która jest symbiotycznym partnerem fasoli zwyczajnej, zaliczany do słabo poznanej rodziny asparaginaz typu *Rhizobium etli* (AnsA). Celem zadania było umożliwienie podjęcia próby rozwiązania struktury tego enzymu, a więc przeprowadzenie obiektu przez te wszystkie etapy całego procesu określania struktury

przestrzennej białek, które dotyczą pracy z materiałem białkowym: od ekspresji, poprzez oczyszczanie i krystalizację białka, aż do rejestracji danych dyfrakcyjnych.

Prace nad tym zadaniem rozpoczęłam przejmując wektor ekspresyjny pET-Re-AnsA umożliwiający ekspresję rekombinowanego białka AnsA w komórkach gospodarza *E. coli*. Produkcja rozpuszczalnego białka i opracowanie wydajnego protokołu oczyszczania nie przysporzyły mi większych problemów. Uzyskiwane preparaty AnsA były dobrej jakości, homogenne i stabilne, co potwierdzały wyniki pomiarów DLS. Z kolei znalezienie i optymalizacja warunków krystalizacyjnych były zadaniami niezwykle pracochłonnymi oraz czasochłonnymi. Jednak wytrwale kontynuowałam próby mające na celu zmianę pokroju kryształów. Ostatecznie zamiast pozrastanych igieł i płytek uzyskiwałam osobne, duże płytki nadające się do pomiarów dyfrakcji. Najlepszy wyhodowany przeze mnie kryształ AnsA rozpraszał promieniowanie rentgenowskie do rozdzielczości 1.5 Å, a kluczowym odczynnikiem pozytywnie wpływającym na pokrój kryształów była oktyloglukoza.

W moich badaniach przyjęłam strategię wykorzystującą sygnał anomalny do rozwiązywania struktury krystalicznej. Niestety ingerencja w skład kryształów, polegająca na wprowadzeniu atomów specjalnych (nasączanie kompleksem tantalu, krystalizacja białka znakowanego selenometioniną) drastycznie pogarszała ich zdolność rozpraszania promieniowania rentgenowskiego. Podjęłam również próbę rejestracji słabego sygnału anomalnego pochodzącego od naturalnie występujących w białku atomów siarki, korzystając z najlepszych jakie udało mi się uzyskać natywnych kryształów AnsA. Niestety kryształy te cechowała anizotropia dyfrakcji, która znacząco pogarszała jakość danych dyfrakcyjnych. Z tego powodu zarejestrowanie statystycznie istotnego sygnału anomalnego nie było możliwe.

Korzystając z natywnego, rozpraszającego do ~1.5 Å kryształu białka AnsA zarejestrowano również jeden zbiór danych używając promieniowania o standardowej długości fali (0.91841 Å). Zbiór ten może posłużyć w przyszłości do rozwiązania struktury metodą podstawienia cząsteczkowego. W związku z przewidywaniami że, struktura AnsA znacznie różni się od struktury zbadanych dotąd asparaginaz, do metody MR najprawdopodobniej wykorzystany zostanie odpowiedni model wspomagany informacjami bioinformatycznymi.

Projekt dotyczący asparaginazy z *Rhizobium etli* jeszcze się nie zakończył i obecnie uczestniczą w nim kolejne osoby, wykonujące kolejne etapy prac niezbędne w procesie poznania struktury tego wyjątkowego enzymu.

3. Potasowo-zależna asparaginaza z *Phaseolus vulgaris* (PvAspG1)

W trzecim zadaniu obiektem badań była asparaginaza z *Phaseolus vulgaris* (PvAspG1), potasowo-zależny enzym typu roślinnego. Biochemiczna charakterystyka białek z tej rodziny pokazuje, że obecne w środowisku jony metali alkaicznych wpływają na ich aktywność enzymatyczną: jony K^+ zwiększa ją, natomiast jony Na^+ zmniejsza ją. Celem zadania było wyjaśnienie podstaw molekularnych tej zależności. Szczegółowy zakres prac obejmował: rozwiązanie struktury przy użyciu metody podstawienia cząsteczkowego oraz udokładnienie i przeanalizowanie kilku modeli białka.

Prace rozpoczęłam wychodząc z zarejestrowanych na synchrotronie danych dyfrakcyjnych. W sumie, rozwiązane i udokładnione zostały aż trzy struktury tego samego białka, różniące się zawartością jonów: PvAspG1-K z jonami potasu, PvAspG1-Na z jonami sodu i PvAspG1-K/Na z oboma rodzajami jonów. Istnienie trzech modeli białka, które reprezentowały enzymy uchwycone w różnych stanach aktywności enzymatycznej umożliwiło wykonanie analizy porównawczej i zaowocowało ciekawymi wnioskami.

PvAspG1 ma zasadniczo taką samą strukturę jak inne asparaginazy typu-roślinnego, posiada jednak dwa rodzaje pętli, w których koordynowane są metale. Pętla stabilizująca (Leu58-Arg68), a właściwie występująca w jej sekwencji reszta asparaginy, „stabilizuje” położenie katalitycznej Thr196 i może być bezpośrednio lub pośrednio odpowiedzialna za mechanizm reakcji. Pętla ta, w enzymach potasowo-niezależnych, nazywana jest pętlą sodową, ale została przeze mnie przemianowana, ponieważ potrafi koordynować zarówno jony sodu jak i potasu nie tracąc swojej stabilizującej funkcji. Nie wiadomo jednak jaki wpływ miałyby inne jony jednowartościowe (np. Li^+ lub Rb^+) skoordynowane w tej pętli na jej strukturę i funkcję.

Pętla aktywująca (Val111-Ser118) jest specyficzną cechą strukturalną prezentowanego w niniejszej rozprawie enzymu potasowo-zależnego. We wcześniejszych strukturach potasowo-niezależnych asparaginaz pętla ta zazwyczaj nie wiąże jonów i nie pełni żadnej funkcji. Jon metalu koordynowany w pętli aktywującej PvAspG1 wpływa na aktywność enzymu za pośrednictwem mechanizmu opartego na zmianach konformacyjnych trzech reszt (His117, Arg224, Glu250) tworzących tzw. przełącznik katalityczny. Porównanie trzech modeli potasowo-zależnej PvAspG1 zawierających dwa różne rodzaje jonów (K^+ i Na^+) pokazuje różnice strukturalne jakie występują w dwóch stanach aktywności enzymu. Gdy pętla aktywująca koordynuje jon

potasu (stan włączony) łańcuchy boczne reszt przełącznika przyjmują położenia umożliwiające stabilne kotwiczenie (przez Arg224) substratu/produktu w miejscu aktywnym. W strukturach enzymów potasowo-niezależnych taki układ przestrzenny reszt aminokwasowych występuje permanentnie. Gdy pętla aktywująca koordynuje jon sodu (stan wyłączony) reszty przełącznika zmieniają konformacje powodując częściową destabilizację architektury miejsca aktywnego (od strony grupy α-karboksylowej substratu/produktu). Pozostałe elementy tworzące miejsce aktywne (np. katalityczna Thr196, reszty wnęki oksyanionowej, triada treoninowa, itp.) zachowują swoje położenia i pozostają poza wpływem koordynowanych jonów. Fakt ten wyjaśnia, dlaczego przy nieobecności jonów K^+ potasowo-zależne enzymy zmniejszają swoją aktywność asparaginazową, lecz nie tracą jej całkowicie. Wydaje się, że wymiana jonów K^+ na Na^+ w pętli aktywującej mogłaby również powodować zmianę preferencji substratowych PvAspG1, co zauważyłam porównując tą pętlę z analogicznym obszarem w Tas1, jednak hipoteza ta musi zostać zweryfikowana za pomocą badań biochemicznych.

Oba heterodimery αβ modelu PvAspG1-K mają pętle aktywujące obsadzone jonami potasu i oba przełączniki katalityczne w konformacji stanu włączonego, jednak tylko jedna wnęka katalityczna zawiera produkt reakcji L-Asp. Wnioskuję zatem, że obecność substratu/produktu w miejscu aktywnym nie wpływa na konformację reszt przełącznika i tylko jon koordynowany w pętli aktywującej steruje tym mechanizmem. Co więcej, ostatnia reszta budująca pętlę aktywującą, Ser118, jest najprawdopodobniej odpowiedzialna za istnienie tego mechanizmu zależnego od potasu. W sekwencjach asparaginaz potasowo-zależnych reszta ta jest zawsze zachowana, a w enzymach potasowo-niezależnych zawsze zmieniona. Łańcuch boczny Ser118 tworzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody koordynującymi jon metalu w pętli aktywującej oraz pośredniczy w zmianach konformacyjnych jednej z reszt przełącznika katalitycznego, Glu250. Postulat ten należy jednak zweryfikować przy pomocy testów biochemicznych oraz badań strukturalnych ukierunkowanych mutantów PvAspG1.

Analiza PvAspG1 wyjaśnia też znaczenie czwartorzędowej struktury tego enzymu. Potasowo-zależne asparaginazy mogą funkcjonować jedynie jako dimery heterodimerów $(\alpha\beta)_2$, ponieważ miejsce aktywne położone w jednym heterodimerze (np. AB) jest kontrolowane przez pętlę aktywującą z sąsiedniego heterodimeru (CD) za pośrednictwem przełącznika katalitycznego utworzonego z reszt pochodzących z obu tych podjednostek (His117C, Arg224B, Glu250B).

Rozwiązanie struktury krystalograficznej PvAspG1 wyjaśnia zagadkę zależności tego enzymu od potasu, ale także umożliwia postawienie kolejnych pytań dotyczących funkcjonowania asparaginaz. Czy ma znaczenie region bogaty w glicyny, zawierający motyw GAG potencjalnie odpowiedzialny za oddziaływanie z β-peptydami, skoro jego sekwencja i budowa jest zachowana we wszystkich poznanych dotąd strukturach niezależnie od preferencji substratowych? Które cechy strukturalne odpowiedzialne są za rozpoznawanie różnych substratów? Jak pętla Arg283-Lys288 wpływa na aktywność enzymatyczną? Jak wzrasta nukleofilowość katalitycznej treoniny umożliwiająca przeprowadzenie reakcji? Czy możliwe jest zwiększenie aktywności tych enzymów i na ich bazie stworzenie nowych leków na białaczkę? Te wszystkie aspekty wymagają dalszych badań nad asparaginazami typu roślinnego.