



interdyscyplinarne
studia doktoranckie
matematyczno-
przyrodnicze



Projekt „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno – przyrodniczych” realizowany w ramach poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Ekspresja, analiza kinetyczna i regulacja aktywności kinaz adenylanowych dwóch szczepów bakterii termofilnych

mgr Agnieszka Ludwiczak

Kinazy adenylanowe (AK) enzymy regulujące stężenie nukleotydów

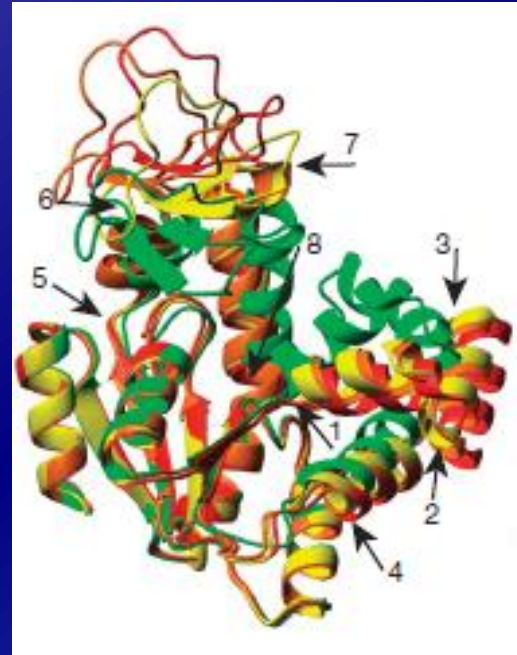
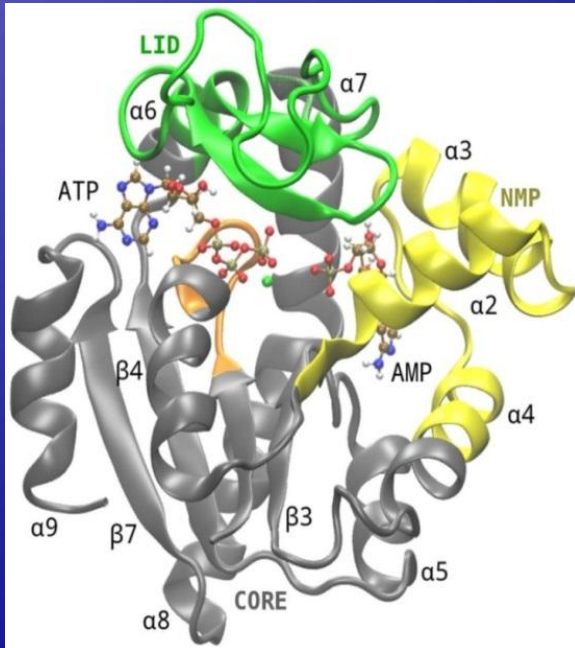
- ATP-AMP fosfotransferaza, EC 2.7.4.3, $M \approx 25$ kDa
- AK regulują poziom nukleotydów zgodnie z poniższą reakcją:



- Izoformy kinazy adenylanowej mogą tworzyć dimery i większe struktury molekularne

Struktura kinaz adenylanowych

- domena rdzeniowa (CORE)
- domena LID
- domena NMP
- pętla P



Zmiany konformacyjne cząsteczki AK
(A- czerwony, B- pomarańczowy i C- żółty)
Cyframi (1-8) oznaczono regiony zawiasowe

Regulatory aktywności kinaz adenylanowych

W literaturze brak jest doniesień o specyficznej regulacji aktywności AK przez małowcząsteczkowe regulatory.

Dlaczego regulacja aktywności AK jest tak atrakcyjna?



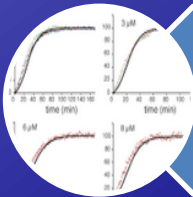
Cel badań



Zrozumienie molekularnych podstaw regulacji aktywności AK



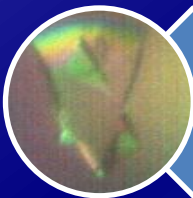
Nadekspresja i oczyszczanie AK z dwóch termostabilnych szczepów bakterii: *Aquifex aeolicus* i *Bacillus stearothermophilus*



Właściwości fizykochemiczne aktywnych katalitycznie białek



Regulacja aktywności kinazy adenylanowej przez związki z grupy chiralnych zasad Schiffa



Określenie warunków krystalizacji badanych kinaz

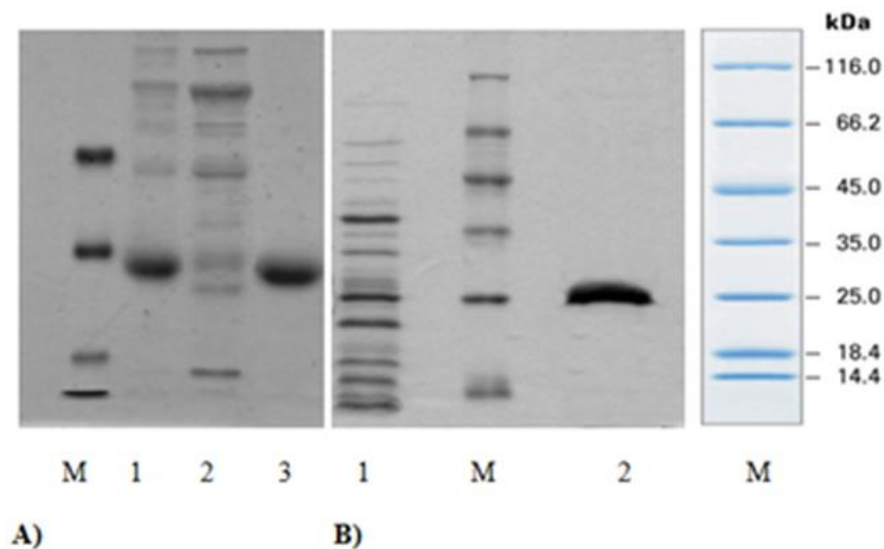


- **Klonowanie genów:**
 - Trawienie restrykcyjne wektora pUC i pET
 - Transformacja komórek szczepu ekspresyjnego *E. coli* CodonPlus BL21(DE3)pLysS
- **Ekspresja kinaz adenylanowych bakterii termofilnych w komórkach *E. coli* CodonPlus szczep BL21(DE3) pLysS**

Optymalnymi warunkami do wydajnej nadekspresji białek AK w komórkach *E. coli* była trzygodzinna hodowla w 37°C z wytrząsaniem, a następnie 12- 16 godzinna hodowla w temperaturze 22°C.



Nadekspresja i oczyszczanie AK z dwóch termostabilnych szczepów bakterii: *Aquifex aeolicus* i *Bacillus stearothermophilus*



Elektroforogramy enzymów uzyskanych w wyniku chromatografii preparatów Blue Sepharose.

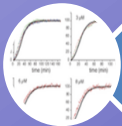
A) *Aquifex aeolicus*:

M- Marker,

- 1) białka po denaturacji termicznej naniesione na kolumnę,
- 2) białka uzyskane po elucji buforem startowym,
- 3) białka uzyskane po elucji 0,6 M roztworem NaCl.

B) *Bacillus stearothermophilus*:

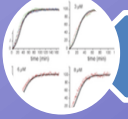
- 1) białka po denaturacji termicznej naniesione na kolumnę,
- 2) białka uzyskane po elucji 0,6 M roztworem NaCl.



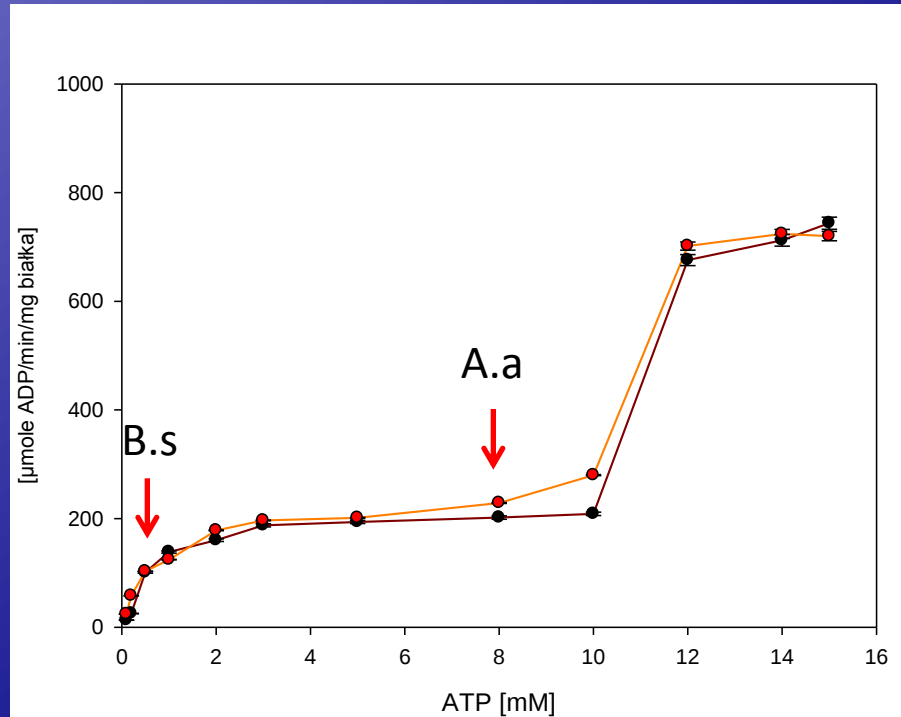
- Stężenie substratów,
- temperatura inkubacji enzymu z substratami,
- pH,
- jony metali (dwu- i jednowartościowe),
- donory grupy fosforanowej,
- inhibitor Ap5A.

Wyznaczono również parametry kinetyczne (K_M i V_{max}) obu kinaz adenylanowych.

Oznaczenia wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach i na ich podstawie obliczono odchylenia standardowe (SD).



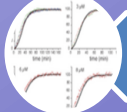
Wpływ ATP na aktywność badanych kinaz adenylanowych



A. aeolicus ■

B. stearothermophilus ■

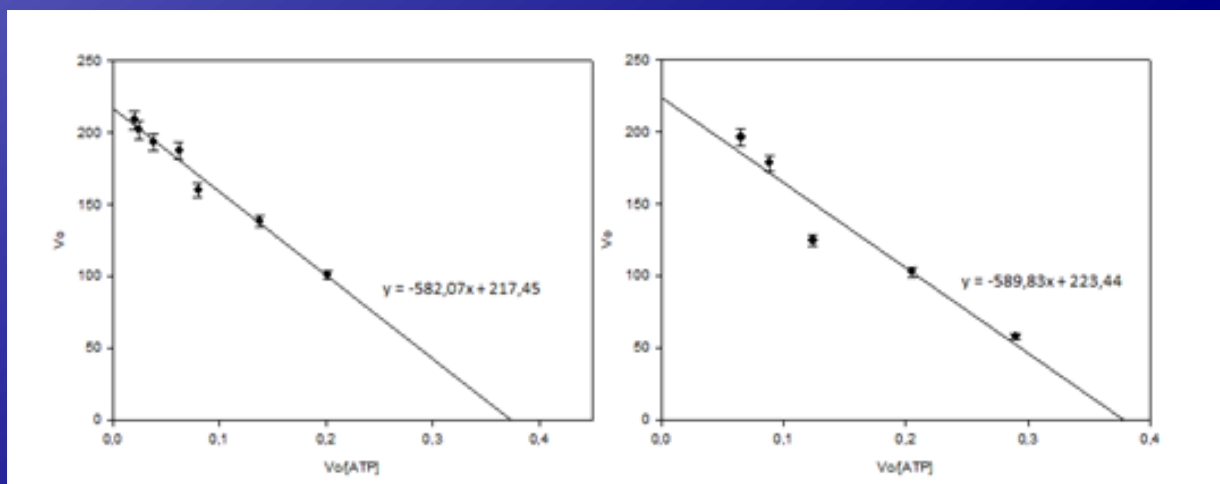
ATP niezwiązany z jonami Mg jest regulatorem allosterycznym.



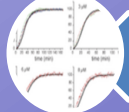
Wyznaczanie stałych K_M i V_{max} kinazy adenylanowej z *A. aeolicus* i *B. stearothermophilus* metodą Eadie-Hofstee

$$V_o = -K_M V_o/[S] + V_{max}$$

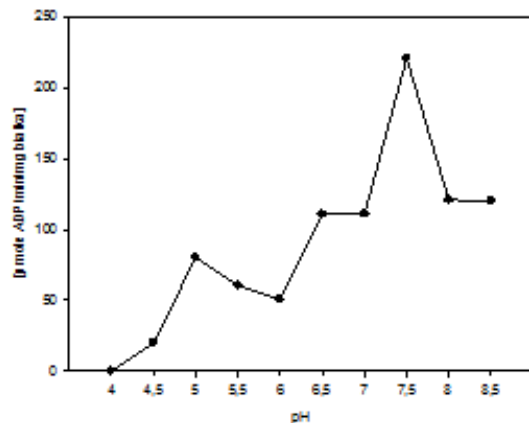
V_o - szybkość początkowa reakcji,
 K_M - stała Michaelisa
 $[S]$ - stężenie substratu



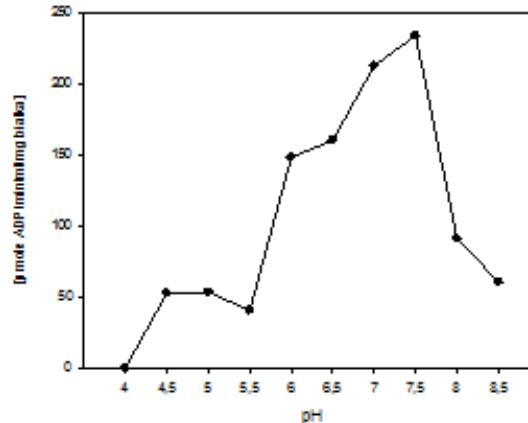
Substrat	Kinaza adenylanowa z <i>Aquifex aeolicus</i>		Kinaza adenylanowa z <i>Bacillus stearothermophilus</i>	
	V_{max} (μ mole produktu/min)	K_M (mmole)	V_{max} (μ mole produktu/min)	K_M (mmole)
AMP	204	0,7	244	1,36
ADP	105	0,42	109	0,63
ATP	217	0,58	223	0,59



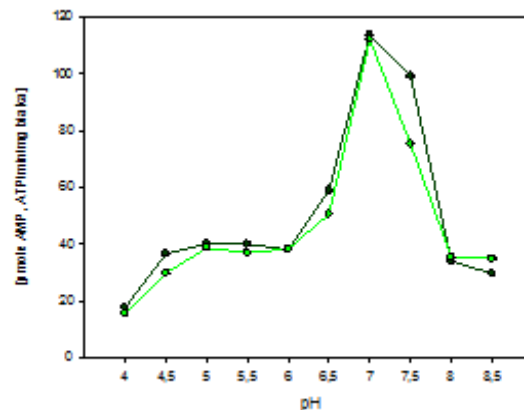
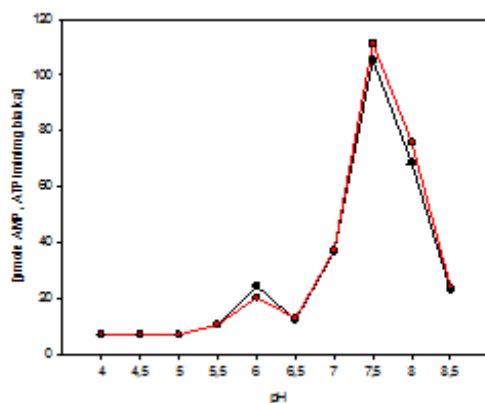
Wpływ pH na aktywność kinazy adenylanowej z *A. aeolicus* i *B. stearothermophilus*



AK z *A. aeolicus*

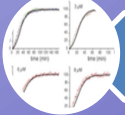


AK z *B. stearothermophilus*

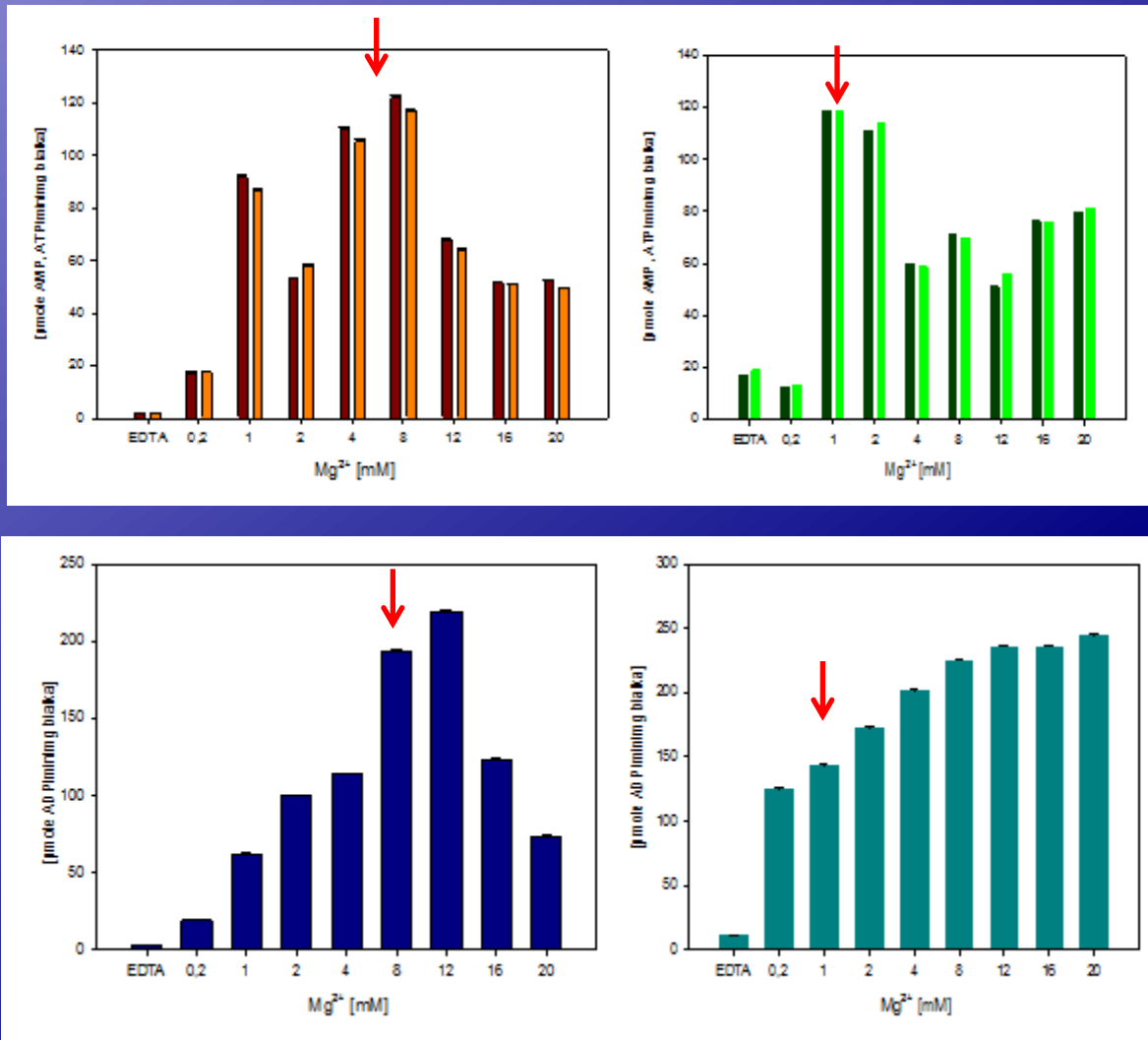


A. aeolicus AMP  ATP 

B. stearothermophilus AMP  ATP 



Wpływ jonów Mg na aktywność AK



A. aeolicus

AMP



ATP



B. stearothermophilus

AMP



ATP



A. aeolicus

ADP

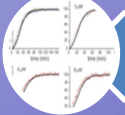


B. stearothermophilus

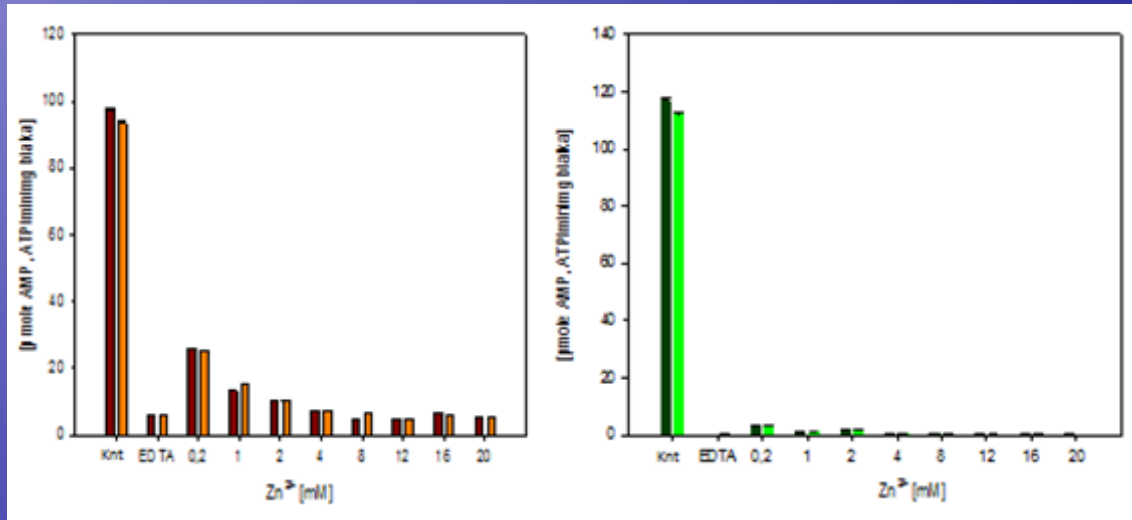
ADP



Podobny efekt regulacji stwierdzono dla jonów Ca²⁺ i Mn²⁺



Wpływ jonów Zn na aktywność AK



A. aeolicus

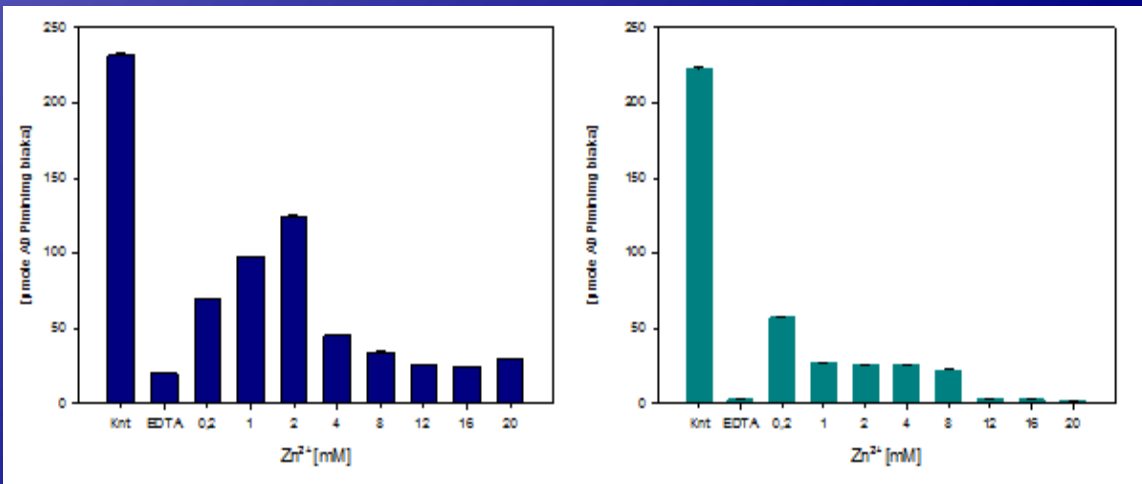
AMP

ATP

B. stearothermophilus

AMP

ATP



A. aeolicus

ADP

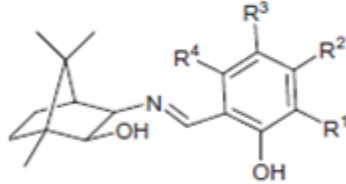
B. stearothermophilus

ADP

Jony Cu²⁺ wykazywały podobny efekt hamowania aktywności AK



Chiralne zasady Schiffa (pochodne kamfory)

Zasada Schiffa		R1	R2	R3	R4
eb19		H	H	H	H
eb50		CH ₃	H	H	H
eb71		CH(CH ₃) ₂	H	H	H
IH7		H	H	H	H
IH20		C(CH ₃) ₃	H	CH ₃	H
IH21		C(CH ₃) ₃	H	C(CH ₃) ₃	H

Wybrane zasady Schiffa różnią się:

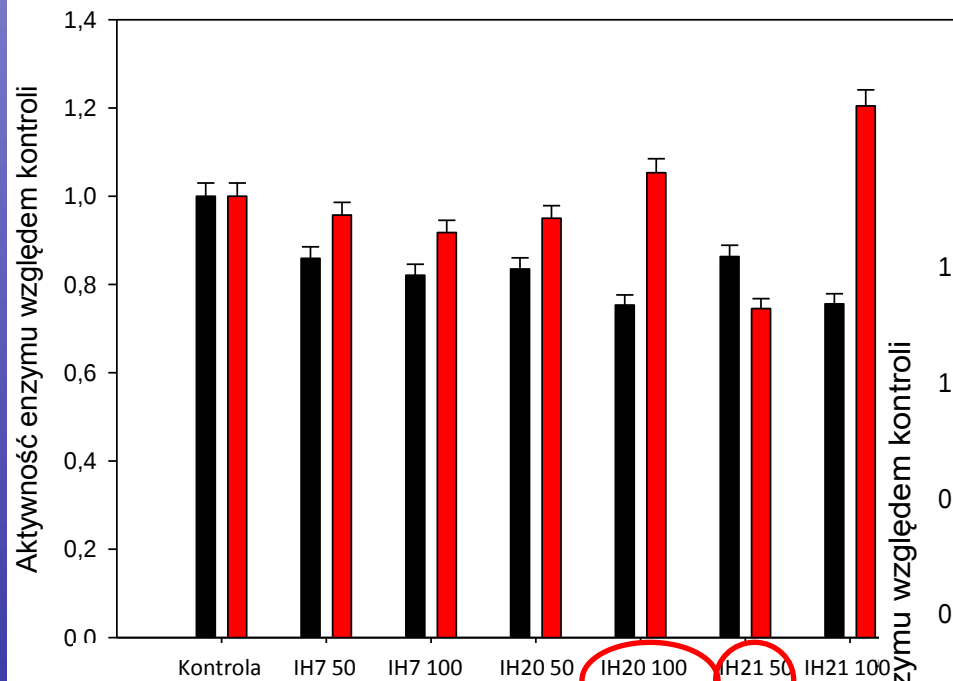
- podstawnikami w pierścieniu fenylowym
- położeniem grupy hydroksylowej i fragmentu iminowego względem pierścieniowego układu kamfory (eb: 1R,2S,3R,4S, IH: 1R,2R,3S,4S).

Chiralne zasady Schiffa zostały otrzymane jako katalizatory stereoselektywnej syntezy organicznej przez zespół **Prof. dra hab. M. Wełniaka** z Katedry Chemii Organicznej WCh



Regulacja aktywności kinazy adenylanowej przez związki z grupy chiralnych zasad Schiffa

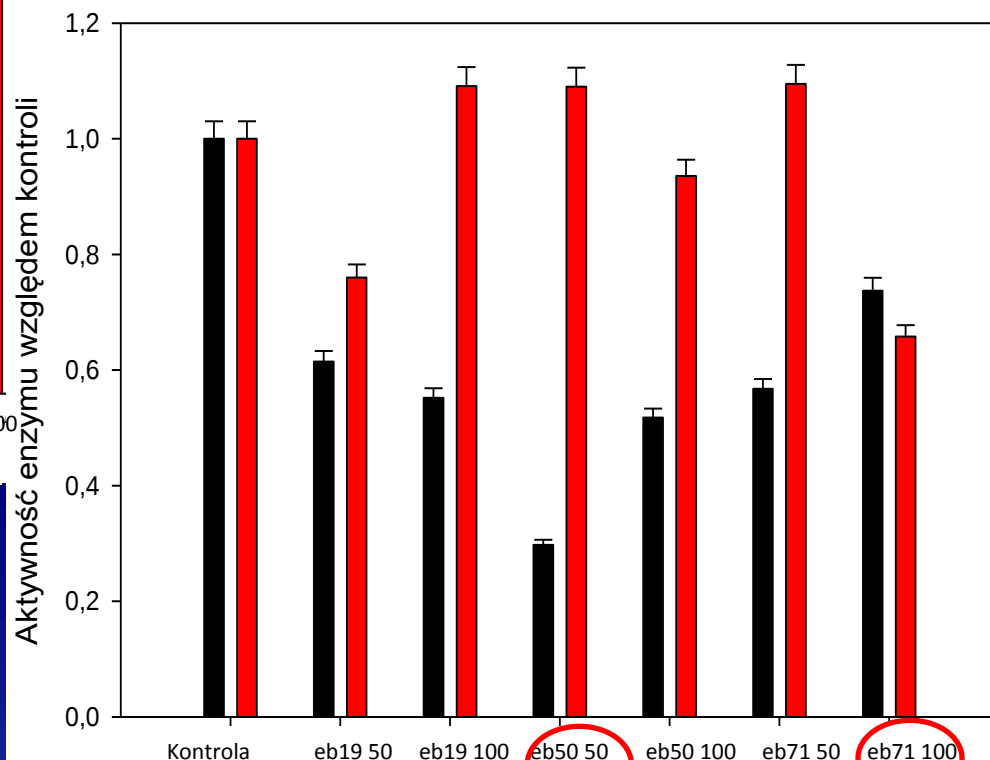
Analiza wpływu związków z grupy chiralnych zasad Schiffa (pochodne kamfory) na aktywność kinaz adenylanowych z *A. aeolicus* i *B. stearothermophilus*



AMP + ATP → 2 ADP

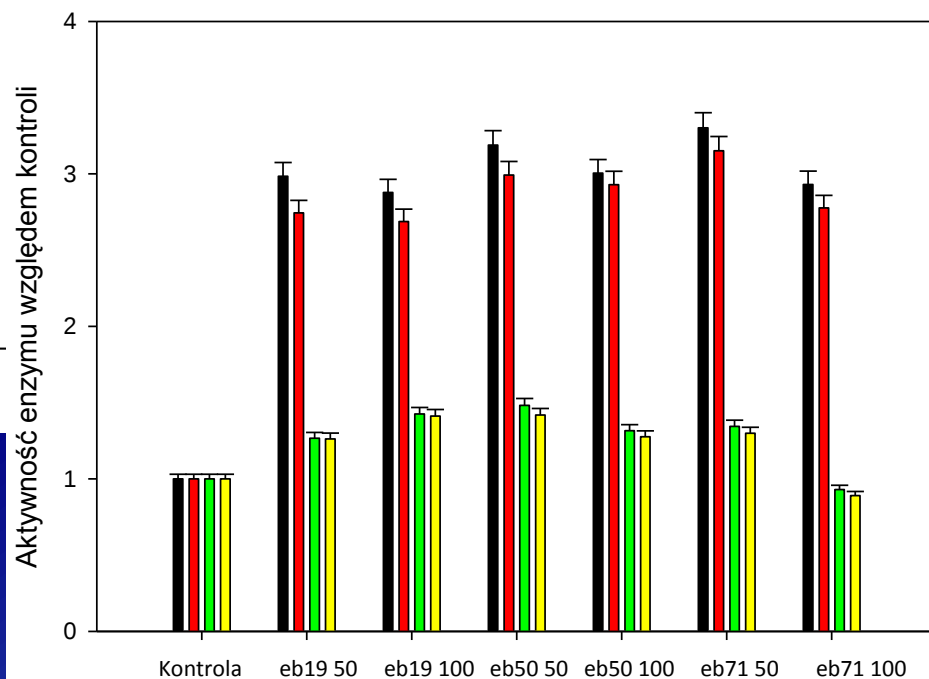
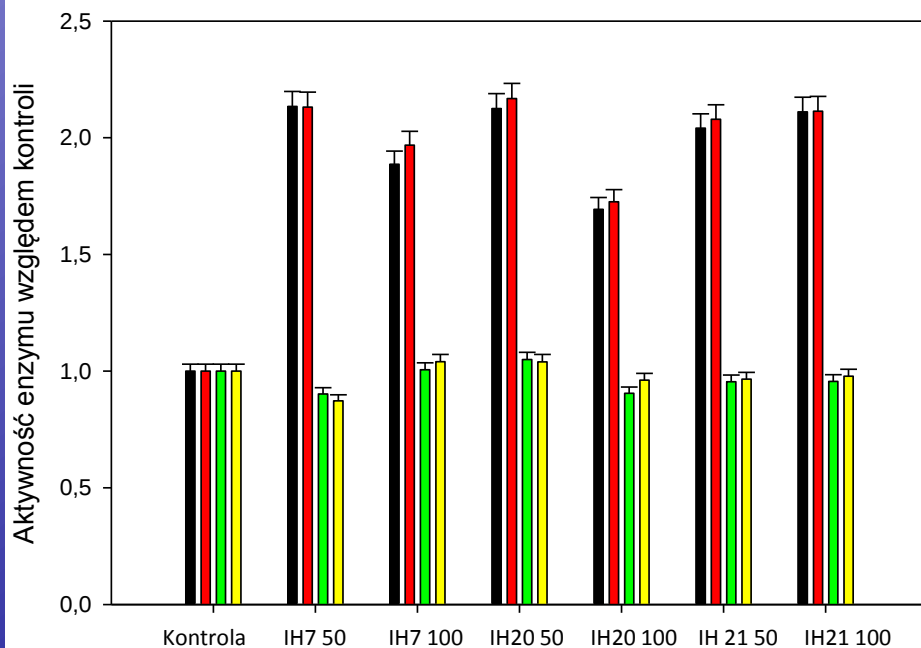
A. aeolicus █

B. stearothermophilus █





Regulacja aktywności kinazy adenylanowej przez związki z grupy chiralnych zasad Schifffa



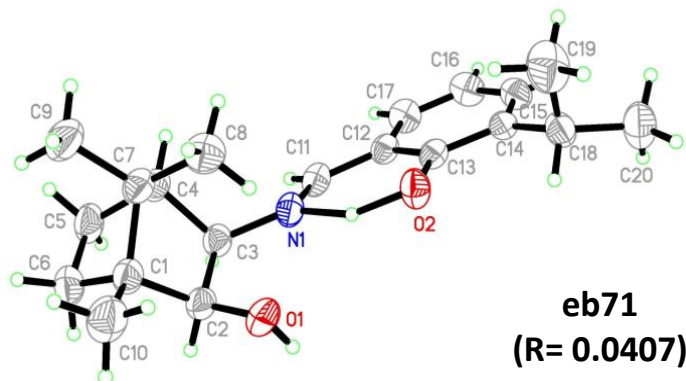
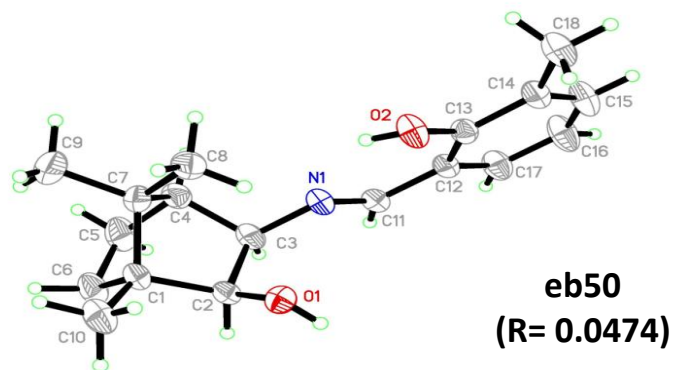
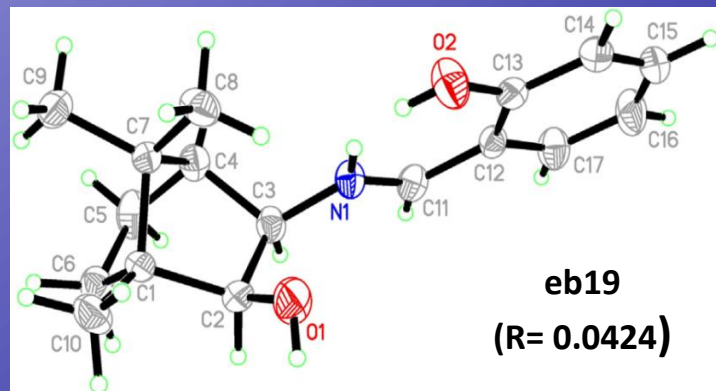
A. aeolicus AMP ■ ATP ■

B. stearothermophilus AMP ■
ATP ■

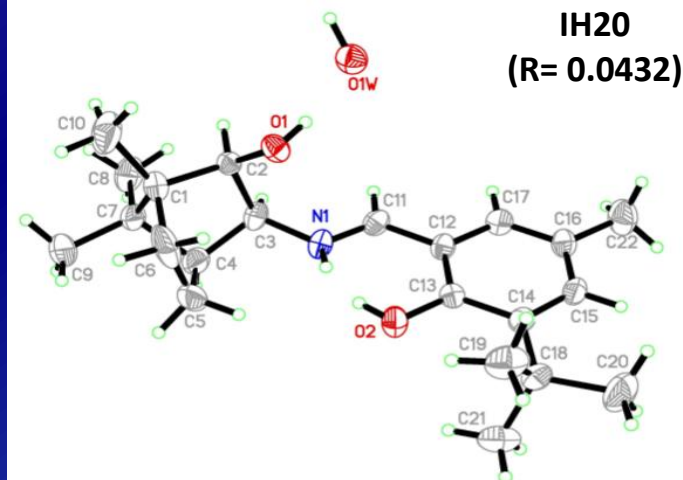
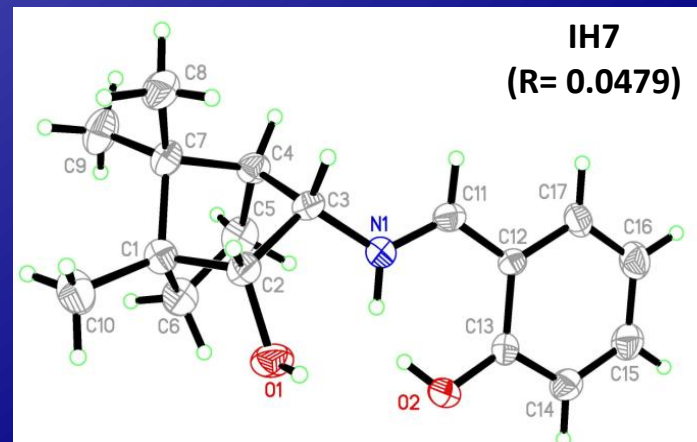


Struktury krystaliczne

eb19, eb50 ,eb71



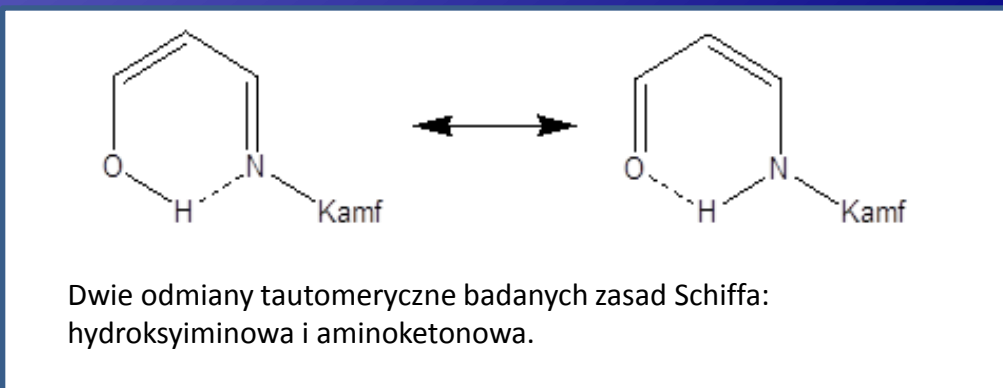
IH7, IH20





- Alternatywne położenie atomów wodoru przy fenolowym atomie O2 lub iminowym atomie N1 → dwie odmiany tautomeryczne zasad Schiffa – **hydroksyiminowa** i **aminoketonowa**

- W szeregu IH2 atomach O2 i odpowiada m. formy aminok



protonu przy z 0.4/0.6, co temu udziałowi

- W szeregu tyn długość wiązania iminowego N1-C11 → Wiązanie wodorowe O2...N1 wspomagane rezonansem **RAHB** (Resonans Assisted Hydrogen Bond) → współpłaszczyznowość grupy iminowej i pierścienia fenylowego.
- Analiza geometrii pierścienia fenylowego wykazała także wyraźny efekt podstawnikowy powodowany przez grupy metylowe, izopropylowe i tert-butyłowe.



Hipotezy dotyczące obserwowanych różnic w aktywnościach AK

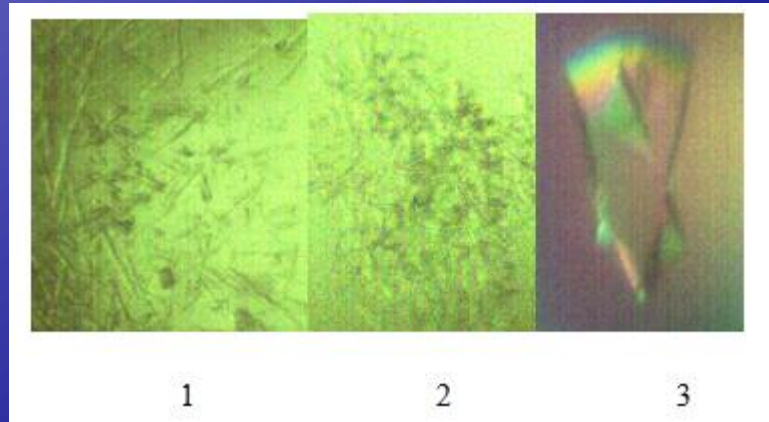
- Wewnętrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe O2...H...N1 wspomagane rezonansem (RAHB) wyklucza oddziaływanie grupy iminowej regulatora z substratami i enzymem
- Wydaje się, że podstawniki hydrofobowe są odpowiedzialne za wiązanie regulatorów w AK
- Jedna grupa hydroksylowa kamfory → ułatwienie transferu reszty fosforanowej
- Położenie tej grupy względem substratów jest kluczowe
- Konfiguracja na atomach C2 i C3 kamfory determinuje aktywność regulatorów

Weryfikacja powyższych hipotez na podstawie badań strukturalnych kompleksów AK:regulator.



Określenie warunków krystalizacji badanych kinaz

Krystalizacja kinazy adenylanowej z *B. stearothermophilus*



1. 2 M siarczan amonu, 100 mM TRIS-Cl, 6 mM MgCl₂, pH roztworu 8,5;
2. 25% w/v PEG 4000, 100 mM sól sodowa MES, 200 mM MgCl₂, pH 6,5
3. **22% PEG 8000, 100 mM Tris-Cl, pH 8,5, 2% glikol etylenowy.**
Stężenie białka wynosiło 60 mg/ml.

Warunki krystalizacja opisane w literaturze: 2.45 M siarczan amonu, 1% PEG 1000 lub PEG 750, 50 mM HEPES pH 6.8–7.8 z dodatkiem 0.1% azydku sodu i 2–5 mM Ap5A.
Stężenie białka wynosiło 10–30 mg/ml

Wnioski

- Na podstawie specyficzności substratowej wnioskuję, że **oba badane enzymy są kinazami adenylanowymi**.
- ATP niezwiązany z jonami magnezu pełni rolę allosterycznego regulatora badanych kinaz adenylanowych.
- Po raz pierwszy stwierdzono aktywację kinaz adenylanowych przez związki małowcząsteczkowe.
- Wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe w badanych zasadach Schiffa to wiązania typu **RAHB**.
- Obecność silnych wiązań wodorowych typu RAHB wyklucza udział iminowego atomu azotu i fenolowej grupy OH w wiązaniu z kinazami i regulacji ich aktywności. Zatem jedyną grupą uczestniczącą w regulacji aktywności AK jest **grupa hydroksylowa fragmentu kamforowego**.
- Wpływ zasad Schiffa na aktywność kinaz adenylanowych zależy od obecności **hydrofobowych podstawników** w pierścieniu fenylowym oraz od **konfiguracji na atomie C2 i C3**.

Dziękuję
za uwagę