

Katarzyna Banaszak

**Badania krystalograficzne fosfofruktokinazy  
z organizmów eukariotycznych:  
*Saccharomyces cerevisiae* i *Oryctolagus cuniculus*.**

Rozprawa doktorska przedstawiona  
Radzie Naukowej Instytutu Chemii  
Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w  
Poznaniu w celu uzyskania stopnia  
naukowego doktora nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Wojciech Rypniewski

Poznań 2008

*Badania były częściowo finansowane z grantów MNiSW:*

- ◆ „Struktura i mechanizm działania fosfofruktokinazy z *S. cerevisiae* oraz syntazy glukozamino-6-fosforanu z *C. albicans* – enzymów o kluczowym znaczeniu dla organizmu grzybów. Analiza rentgenograficzna.” Numer grantu: 3PO4A03625
- ◆ „Struktura rentgenograficzna fosfofruktokinazy 1 z mięśnia szkieletowego królika (*Oryctolagus cuniculus*).” Numer grantu: 2PO4A06229

*W wyniku tej pracy zgłoszono dwa zastrzeżenia patentowe:*

- ◆ numer zgłoszenia: P383866
- ◆ numer zgłoszenia: P383868

*Otrzymane wyniki były tematem następujących komunikatów konferencyjnych:*

- ◆ „The structure of yeast phosphofructokinase 1”. W. Rypniewski, K. Banaszak, I. Attinost, G. Kopperschlaeger. XX Congress of the International Union of Crystallography, Florencja, 23-31.08.2005 – komunikat ustny na zaproszenie.
- ◆ „The refinement of the yeast phosphofructokinase-1 atomic model”. K. Banaszak, I. Attinost, G. Kopperschlaeger, W. Rypniewski. XX Congress of the International Union of Crystallography, Florencja, 23-31.08.2005 - plakat.
- ◆ „The structure of yeast phosphofructokinase 1”. K. Banaszak, I. Attinost, G. Kopperschläger, W. Rypniewski. The Eighth Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting, Karlovy Vary, 29.09-1.10.2005 – komunikat ustny.

*Pragnę serdecznie podziękować:*

*Profesorowi Wojciechowi Rypniewskiemu*

*Magister Agnieszce Kiliszek*

*Magister Joannie Raczyńskiej*

*mojej rodzinie i przyjaciołom ...*

## Spis Treści

<b>Zastosowane skróty</b> .....	<b>7</b>
<b>Cel pracy</b> .....	<b>8</b>
<b>Wstęp</b> .....	<b>9</b>
Wprowadzenie.....	10
Fosfofruktokinaza ATP-zależna w różnych organizmach.....	13
Fosfofruktokinaza prokariotyczna.....	14
Sposób wiązania substratów i mechanizm reakcji katalizowanej przez Pfk z <i>Escherichia coli</i> .....	16
Fosfofruktokinaza eukariotyczna.....	17
Fosfofruktokinaza-1 z <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
Ograniczona proteoliza drożdżowej Pfk.....	20
Fosfofruktokinaza-1 z <i>Trypanosoma brucei</i> .....	22
Fosfofruktokinaza-1 w organizmach ssaków.....	23
Zarys ewolucji enzymu.....	26
Fosfofruktokinaza w medycynie.....	28
Choroba spichrzania glikogenu. Typ VII – niedobór fosfofruktokinazy.....	28
Fosfofruktokinaza w komórkach rakowych.....	29
<b>Metodyka</b> .....	<b>31</b>
Krystalizacja.....	32
Pomiary dyfrakcyjne.....	32
Procesowanie i skalowanie danych dyfrakcyjnych.....	33
Obliczenie amplitud czynników struktury.....	35
Rozwiązanie problemu fazowego - podstawienie cząsteczkowe.....	36
Modyfikacja gęstości elektronowej.....	40
Udokładnianie modelu białkowego.....	42
Pozostałe programy użyte w pracy.....	45
<b>Wyniki</b> .....	<b>47</b>
12S Pfk z <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
Preparatyka i oczyszczanie białka.....	48
Krystalizacja.....	49
Pomiary dyfrakcyjne i obróbka danych.....	50
Podstawienie cząsteczkowe.....	51

Udokładnianie struktury.....	51
Analiza jakości modelu.....	54
Mapy gęstości elektronowej.....	55
Asymetryczna część komórki elementarnej.....	56
Struktura czwartorzędowa Pfk z <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	56
Struktura drugorzędowa.....	59
Łańcuch $\alpha'$ i $\beta'$ - efekt proteolizy.....	60
Podjednostka drożdżowa a bakteryjna.....	62
Ligandy związane w strukturze yeast-12S-Pfk.....	64
Centrum aktywne.....	65
Fruktozo-2,6-bisfosforan w miejscu efektorowym.....	67
Porównanie miejsc wiązania związków cukrowych.....	69
Enzym w konformacji R.....	73
Fosfofruktokinaza z mięśnia szkieletowego królika.....	75
Preparatyka białka.....	75
Krystalizacja.....	76
Pomiary dyfrakcyjne i procesowanie.....	77
Podstawienie cząsteczkowe.....	79
Udokładnianie struktur Pfk z mięśnia szkieletowego królika.....	79
Analiza jakości modeli białkowych.....	81
Mapy gęstości elektronowej.....	82
Asymetryczna część komórki elementarnej.....	82
Struktura fosfofruktokinazy z mięśnia szkieletowego królika.....	83
Identyfikacja związanych ligandów.....	84
Ligandy nukleotydowe.....	85
Centrum aktywne.....	86
Miejsce wiązania nukleotydu pomiędzy domenami.....	88
Miejsce wiązania nukleotydu w subdomenie mniejszej N-terminalnej połowy....	91
Ligandy nienukleotydowe.....	92
Miejsce wiązania aktywatora.....	92
Pozostałe dwa miejsca wiązania związku nienukleotydowego.....	94
<b>Dyskusja.....</b>	<b>97</b>
Ewolucja a struktura trójwymiarowa fosfofruktokinazy eukariotycznej.....	98
Sposób oligomeryzacji podjednostek eukariotycznych.....	99

Funkcje miejsc wiążących ligandy.....	103
Mutacje sekwencji aminokwasowej Pfk związane z chorobą Taruiego.....	107
Podsumowanie.....	110
<b><i>Literatura</i></b> .....	<b><i>111</i></b>

## Zastosowane skróty

acetylo-CoA	acetylo-koenzymA
ADP	adenozynodifosforan
AMP	adenozynomonofosforan
AMPPNP	$\beta$ -iminoadenozynotrifosforan, niehydrolizujący analog ATP
ATP	adenozynotrifosforanu
BsPFK	Pfk z <i>Bacillus stearothermophilus</i>
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DTT	DL-ditiotreitol; 2,3-dihydroksybutan-1,4-ditiol
EcPFK	Pfk z <i>Escherichia coli</i>
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Fru1,6-P <sub>2</sub>	fruktozo-1,6-bisfosforan
Fru2,6-P <sub>2</sub>	fruktozo-2,6-bisfosforan
Fru6-P	fruktozo-6-fosforan
GDP	guanozynodifosforan
Glu1,6-P <sub>2</sub>	glukoza-1,6-bisfosforan
HmPfk	Pfk z mięśnia człowieka
IPTG	izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozyd
LB	pożywka Luria-Bertani
LbPFK	Pfk z <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
MES	kwas 2-N-(morfolino)etylosulfonowy
MPD	2-metylopentano-2,4-diol
NAD <sup>+</sup>	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy - utleniony
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy - zredukowany
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NCS	symetria niekrystalograficzna ( <i>ang.: non-crystallographic symmetry</i> )
PDB	bank danych białkowych ( <i>ang.: Protein Data Bank</i> )
PEG	glikol polietylenowy
PEP	fosfoenolopirogronian
Pfk	fosfofruktokinaza
PGA	kwas fosfoglicerynowy
Pi	anion fosforanowy
PMSF	fluorek fenylo-metylosulfonowy
PPi	pirofosforan
RmPfk-ATP	struktura Pfk z mięśnia szkieletowego królika, kryształ nasączony ATP
RmPfk-lig	struktura Pfk z mięśnia szkieletowego królika z ADP
rmsd	średnie kwadratowe odchylenie ( <i>ang.: root-mean-square deviation</i> )
TbPFK	Pfk z <i>Trypanosoma brucei</i>
Tris	2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
yeast-12S-Pfk	struktura 12S Pfk z <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## **Cel pracy**

Celem pracy ogólnie określonym w tytule rozprawy było zbadanie struktur rentgenograficznych fosfofruktokinazy (Pfk) z dwóch organizmów eukariotycznych. Zadania prowadzące do jego realizacji polegały na rozbudowie, uzupełnieniu i udokładnieniu modelu struktury krystalicznej kompleksu fosfofruktokinazy 12S z *Saccharomyces cerevisiae* z ligandami oraz krystalizację Pfk z mięśnia szkieletowego królika w obecności ligandów, następnie rozwiązanie i udokładnienie struktur krystalograficznych.

Szczegółowo cel pracy obejmował:

- ustalenie współrzędnych atomowych cząsteczek enzymów
- identyfikację związków małocząsteczkowych związanych z białkiem pod względem ich rodzaju, stechiometrii oraz sposobu oddziaływania z białkiem
- interpretację miejsc wiązania ligandów
- ocenę różnic i podobieństw w obrębie eukariotycznych miejsc katalitycznych, w stosunku do enzymów prokariotycznych
- analizę zmian ewolucyjnych, które doprowadziły do powstania miejsc wiązania aktywatora, fruktozo-2,6-bisfosforanu w enzymach eukariotycznych
- określenie w jaki sposób duplikacja i fuzja genów przekłada się na strukturę trójwymiarową enzymów oraz rozwój dodatkowych elementów kontroli białka.



# Wstęp

## **Wprowadzenie**

Podstawę życia w ujęciu biologicznym stanowi nieustanne przetwarzanie materii i energii, zwane metabolizmem. W każdej komórce przebiegają setki reakcji chemicznych powiązanych w misterną sieć wzajemnie przenikających się szlaków. Procesy te pozwalają komórkom rosnąć i reprodukować, utrzymywać właściwą budowę i oddziaływać z otoczeniem.

Procesy metaboliczne zachodzące w organizmie dzielą się na dwie główne grupy: kataboliczne (degradujące) i anaboliczne (syntetyzujące). Celem procesów katabolicznych jest uwalnianie energii z substratów energetycznych takich jak białka, węglowodany czy tłuszcze i magazynowanie jej w postaci najważniejszego i uniwersalnego nośnika energii chemicznej we wszystkich komórkach - adenozyntrifosforanu (ATP).

W przyrodzie istnieją trzy zasadnicze procesy uzyskiwania ATP z ADP: fosforylacja oksydacyjna, fosforylacja substratowa i fosforylacja fotosyntetyczna.

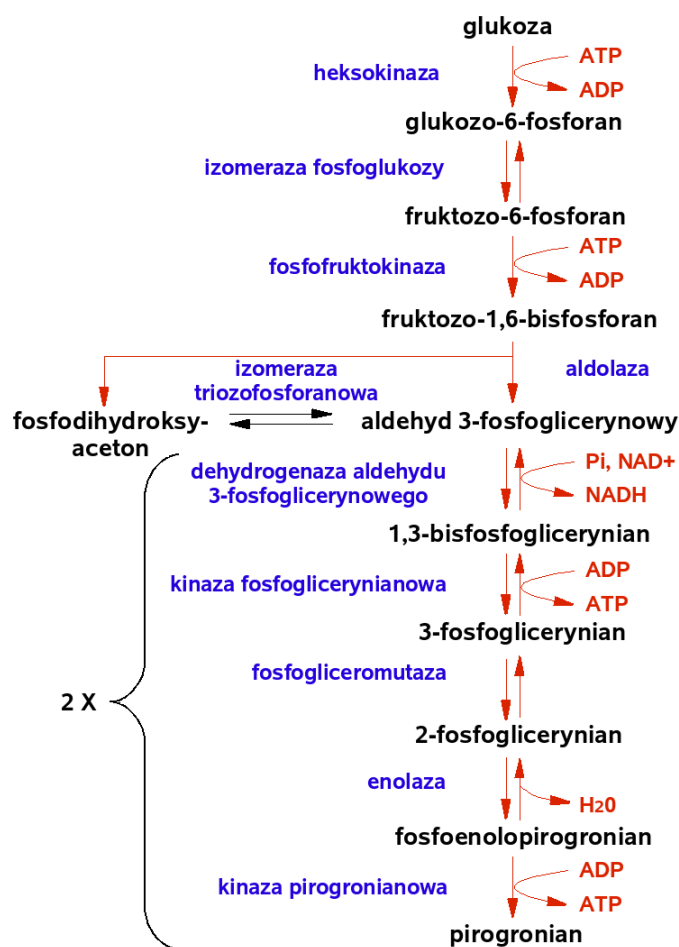
Oczywistym jest, że tworzenie wysokoenergetycznego wiązania z grupą fosforanową  $\gamma$  poprzez przyłączenie  $P_i$  (anionu fosforanowego) do ADP przebiegać może jedynie kosztem sprzężonego z tą reakcją procesu dostarczającego energię. Dwie pierwsze drogi, fosforylacja oksydacyjna i fosforylacja substratowa, wykorzystują energię zawartą w związkach chemicznych, natomiast fosforylacja fotosyntetyczna możliwa jest dzięki energii świetlnej słońca.

Najwięcej komórkowego ATP powstaje w wyniku fosforylacji oksydacyjnej podczas cyklu kwasu cytrynowego i łańcucha oddechowego. Fosforylacja oksydacyjna jest jednak bezwzględnie zależna od obecności tlenu w środowisku.

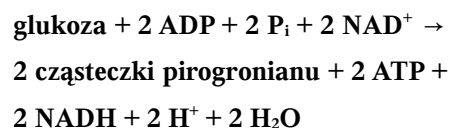
Proces fosforylacji substratowej nie jest tak wydajny energetycznie jak proces fosforylacji oksydacyjnej, ale ma tę przewagę, że przebiegać może także bez udziału tlenu. Fosforylacja substratowa, mówiąc ogólnie, polega na powstawaniu, w toku procesu metabolicznego, fosforanowych związków wysokiej energii zawierających grupę fosforanową. Ponieważ wartość standardowej entalpii swobodnej ( $\Delta G^0$ ) dla reakcji hydrolizy tych związków jest wyższa niż wartość  $\Delta G^0$  dla reakcji hydrolizy ATP do ADP, nie istnieje bariera energetyczna dla przebiegu reakcji wymiany wysokoenergetycznej grupy  $\sim(P)$  (grupy fosforanowej): pomiędzy jej donorem  $X\sim(P)$ , a akceptorem ADP.

Fosforylacja substratowa jest charakterystycznym procesem związanym przede wszystkim z glikolizą. Glikoliza, jako szlak metaboliczny glukozy, ma niebagatelne znaczenie ze względu na to, iż dla niektórych komórek glukoza stanowi jedyny (erytrocyty) lub prawie jedyny (komórki mózgu) substrat energetyczny. Ponadto, przy braku dostępu tlenu, glikoliza pozwala komórkom organizmów tlenowych przetrwać i syntetyzować choćby niewielkie ilości ATP wówczas, gdy całkowite utlenianie monocukrów do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O w cyklu kwasu cytrynowego i łańcuchu oddechowym jest niemożliwe. Natomiast w przypadku organizmów anaerobowych glikoliza stanowi jedyne źródło pozyskiwania ATP.

Szlak glikolityczny jest obecny, przynajmniej częściowo, we wszystkich organizmach, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Glikoliza zachodzi w cytozolu i obejmuje trzy fazy. Pierwsza faza – przekształcenie glukozy w fruktozo-1,6-bisfosforan (Fru1,6-P<sub>2</sub>) – składa się z trzech etapów: fosforylacji, izomeryzacji i kolejnej fosforylacji. Druga faza obejmuje rozszczepienie fruktozo-1,6-bisfosforanu do dwóch fragmentów trójwęglowych. W trzeciej fazie natomiast, w wyniku utleniania trójwęglowych fragmentów do pirogronianu, powstaje ATP (Rys.1).



Sumaryczny wzór glikolizy:



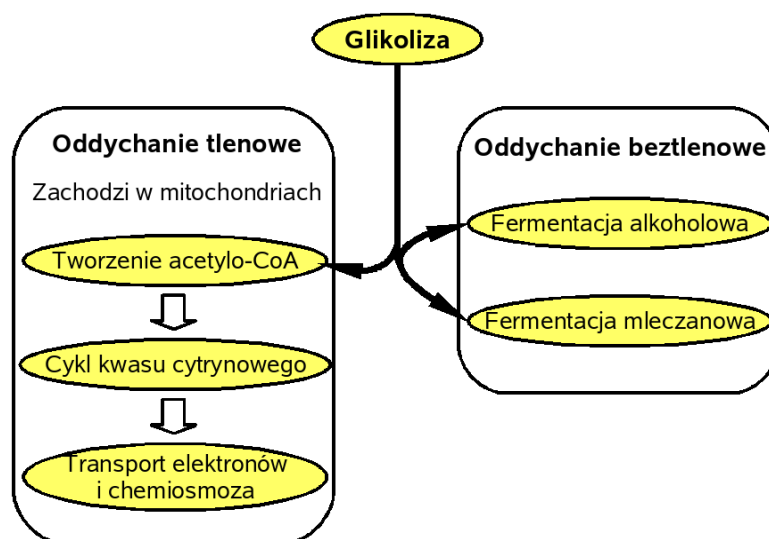
Rys. 1. Schemat procesu glikolizy.

Pierwszy etap glikolizy obejmuje reakcje zachodzące kosztem energii powstałej przez zużycie 2 cząsteczek ATP. Drugi etap to faza generująca energię, prowadząca do syntezy 4 cząsteczek ATP. Zysk netto wynosi 2 cząsteczki ATP w przeliczeniu na jedną cząsteczkę glukozy.

Większość reakcji szlaku glikolitycznego jest odwracalna i zachodzi także w trakcie glukoneogenezy. Etapy nieodwracalne są natomiast potencjalnymi miejscami regulacji szybkości przebiegu procesu glikolitycznego. Towarzyszy im znaczna zmiana entalpii swobodnej, a ich równowaga jest przesunięta w kierunku produktów. Fosfofruktokinaza, katalizująca nieodwracalną reakcję szlaku, jest najważniejszym punktem kontroli ze względu na największą liczbę czynników wpływających na jej aktywność.

Wszystkie powstające w trakcie szlaku glikolitycznego związki pośrednie (oprócz produktu końcowego – pirogronianu) są estrami fosforowymi. Grupa fosforanowa spełnia podwójną rolę: po pierwsze uaktywnia wszystkie związki pośrednie glikolizy destabilizując je i ułatwia ich dalszy metabolizm, po drugie dzięki ujemnemu ładunkowi zlokalizowanemu na grupie fosforanowej (w pH 7 środowiska komórkowego grupa fosforanowa jest zdysocjowana) utrzymuje związki pośrednie glikolizy w cytoplazmie nie pozwalając im swobodnie dyfundować przez błony komórkowe.

Produkt końcowy glikolizy, pirogronian, ulega dalszym przemianom zależnie od organizmu i panujących warunków. W warunkach tlenowych pirogronian jest transportowany do macierzy mitochondrialnej i dekarboksylowany oksydacyjnie do acetylo-CoA by wziąć udział w cyklu kwasu cytrynowego (Rys.2). Ciągłą regenerację  $\text{NAD}^+$  podtrzymującą mitochondrialny metabolizm zapewnia transport elektronów w łańcuchu oddechowym gdzie  $\text{O}_2$  jest końcowym akceptorem elektronów.



Rys. 2. Szlaki oddychania komórkowego.

W warunkach anaerobowych, przy braku  $O_2$ , ustaje nie tylko mitochondrialna synteza ATP, lecz prawie cały metabolizm w macierzy mitochondrialnej (Rys.2). Ze względu na brak  $NAD^+$  reakcja syntezy acetylo-CoA oraz cykl kwasu cytrynowego zostają zahamowane, a komórka staje się całkowicie uzależniona od glikolitycznego wytwarzania ATP. Jednak aby glikoliza mogła być kontynuowana, powstający w cytoplazmie NADH także musi ulegać nieustannie reoksydacji. W komórkach zwierzęcych dzieje się to poprzez redukcję pirogronianu do mleczanu przez dehydrogenazę mleczanową. Proces ten nazywa się fermentacją mleczanową, a regenerowany w ten sposób  $NAD^+$  pozwala na kontynuację glikolizy mimo braku tlenu. Fermentacja mleczanowa zachodzi w bakteriach z rodziny *Lactobacillus* oraz komórkach mięśniowych organizmów zwierzęcych. W przypadku tych ostatnich w momencie pojawienia się tlenu mleczan z powrotem przekształcany jest w pirogronian by ulegać dalszym reakcjom.

W mikroorganizmach takich jak drożdże regeneracja  $NAD^+$  zachodzi poprzez fermentację alkoholową. Utworzony z glukozy pirogronian ulega reakcji dekarboksylacji do aldehydu octowego. Reakcja ta katalizowana jest przez dekarboksylazę pirogronianową – enzymem niewystępujący w metabolizmie organizmów zwierzęcych. Powstały aldehyd octowy jest następnie redukowany przez dehydrogenazę alkoholową z udziałem NADH do etanolu, a powstający  $NAD^+$  umożliwia ciągły przebieg glikolizy.

## **Fosfofruktokinaza ATP-zależna w różnych organizmach**

Ssaki, grzyby, a także wiele pierwotniaków i bakterii używa ATP jako donora grupy fosforanowej w reakcji katalizowanej przez tzw. fosfofruktokinazę ATP-zależną, podczas gdy rośliny i niektóre z pierwotniaków posiadają fosfofruktokinazy, które wykorzystują w tym celu nieorganiczny pirofosforan (tzw. fosfofruktokinaza P<sub>Pi</sub>-zależna). Istnieje wiele przykładów organizmów w których występują oba typy enzymu. Te dwie rodziny Pfk mają wyraźnie wspólnego przodka, ale identyczność ich sekwencji wynosi zwykle około 20-25%.

ATP-zależna fosfofruktokinaza-1 katalizuje przeniesienie grupy fosforanowej z ATP na fruktozo-6-fosforan (Fru6-P) z wytworzeniem fruktozo-1,6-bisfosforanu (w obecności jonów magnezu). W warunkach fizjologicznych reakcja jest praktycznie nieodwracalna, a reakcja przeciwna jest katalizowana przez fruktozo 1,6-bisfosfatazę w trakcie

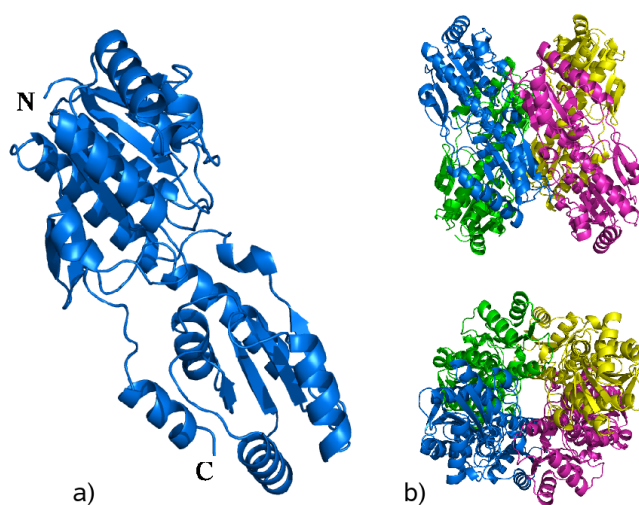
glukoneogenezy.

Fosfofruktokinaza jest enzymem allosterycznym, którego aktywność jest modulowana przez szereg specyficznych efektorów, zarówno aktywatorów jak i inhibitorów, odpowiadając na potrzeby energetyczne organizmu. Pfk komórek eukariotycznych ma bardziej złożoną architekturę niż prokariotycznych, a jej mechanizm działania jest odmiennie regulowany. Dodatkowo, wśród eukariotów, Pfk z grzybów różni się znacznie architekturą od Pfk organizmów wyższych.

## **Fosfofruktokinaza prokariotyczna**

Do tej pory poznano kilka struktur krystalograficznych enzymów bakteryjnych. Rozwiązano struktury dla aktywnej formy enzymu z *Bacillus stearotherophilus* (BsPfk) w obecności Fru6-P i MgADP, dla formy nieaktywnej (z PGA) oraz dla białka z dwupunktową mutacją (z rozdzielczością odpowiednio 2.4 Å, 2.6 Å i 3.2 Å) (Evans, 1981; Schirmer, 1990; Riley-Lovingshimer, 2002). Poznano także strukturę enzymu z *Escherichia coli* (EcPfk) (Shirakihara, Evans, 1988) oraz całkiem niedawno z *Lactobacillus bulgaricus* z najlepszą jak dotąd rozdzielczością 1.86 Å (Paricharttanakul, 2005).

Bakteryjna fosfofruktokinaza funkcjonuje jako homotetramer złożony z identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 35 kDa (Blangy, 1968). Podjednostka bakteryjna jest wyraźnie podzielona na dwie domeny, mniejszą i większą, każda o strukturze trójwarstwowej kanapki  $\alpha\beta\alpha$ . Na każdą podjednostkę enzymu z *B. stearotherophilus* i *E. coli* przypadają trzy miejsca wiązania, dwa z nich tworzą centrum aktywne, trzecie natomiast stanowi miejsce efektorowe. Miejsca aktywne dwóch sąsiednich podjednostek znajdują się pomiędzy tymi podjednostkami, we wnęcie pomiędzy domenami każdej z nich. Miejsca efektorowe natomiast znajdują się w głębokich wnękach pomiędzy podjednostkami w pobliżu terminalnych odcinków łańcuchów białkowych. Enzymy z *B. stearotherophilus* i *E. coli* wykazują podobną kinetykę poprzez kooperatywne wiązanie jednego substratu Fru6-P i niekooperatywne wiązanie drugiego - ATP. W kieszeni efektora wiążą się oba allosteryczne efekторы, ADP będący aktywatorem i PEP (fosfoenolopirogronian) jako inhibitor.



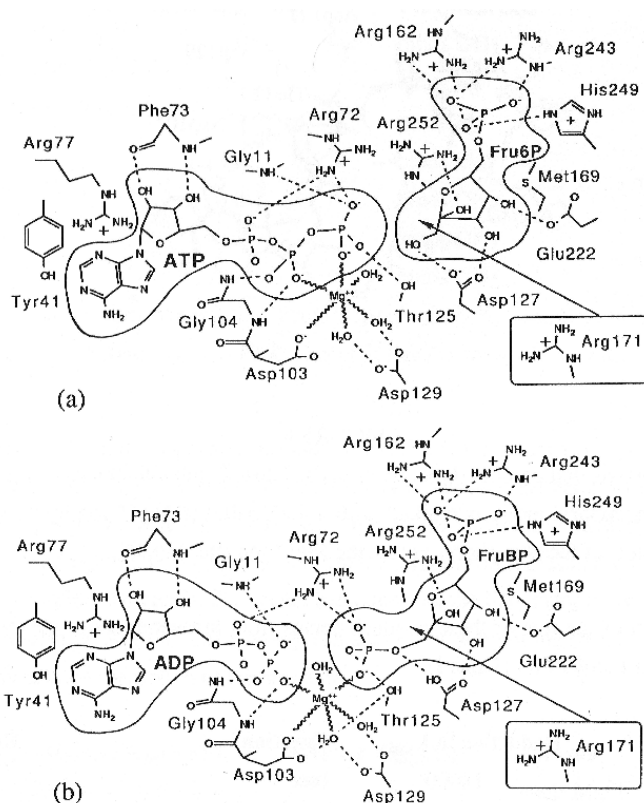
**Rys. 3.** a) podjednostka prokariotyczna enzymu z *E. coli* (Shirakihara, 1988; kod PDB: 1PFK); b) bakteryjny homotetramer w dwóch położeniach.

Studia nad enzymem z *Lactobacillus bulgaricus* (LbPFK) wykazały, że jego kinetyka jest inna niż Pfk z *B. stearothermophilus* i *E. coli* pomimo zachowanej struktury trzeciorzędowej i bardzo podobnych miejsc wiązania substratów (Paricharttanakul, 2005). Enzym z *Lactobacillus bulgaricus* uważany był za nieallosteryczną odmianę fosfofruktokinazy (Le Bras, 1991). Ostatnie badania wykazały jednak pewną zdolność enzymu do allosterycznego wiązania ADP i PEP niezależnie od pH. Efekty allosteryczne były obserwowane jedynie przy wysokich stężeniach ligandów, przy czym oba dawały efekt inhibicji. Struktura krystalograficzna ujawniła duże różnice w obrębie efektorowego miejsca wiązania w porównaniu do dwóch poprzednio wspomnianych enzymów, co tłumaczy różnice w allosterycznej regulacji. Podobieństwo sekwencyjne LbPFK do pozostałych enzymów bakteryjnych jest jednak bardzo wysokie, 47% identyczności i 66% podobieństwa w stosunku do EcPFK oraz 56% identyczności i 74% podobieństwa do BsPFK.

## Sposób wiązania substratów i mechanizm reakcji katalizowanej przez Pfk z *Escherichia coli*

Rozwiązane struktury krystalograficzne Pfk z *E. coli* w kompleksach z substratami (Fru6-P i AMPPNP – analog ATP) (Schirmer, nieopublikowane) i produktami (Fru1,6-P<sub>2</sub> i ADP) (Shirakihara, 1988; kod PDB: 1PFK) pozwoliły na poznanie sposobu wiązania ligandów w centrum katalitycznym i wyróżnienie reszt ważnych dla katalizy (Evans, 1992).

Rysunek 4 przedstawia reszty aminokwasowe Pfk z *E. coli* tworzące kieszeń katalityczną oraz wiązania wodorowe z wiązаныmi ligandami. Reakcja katalizowana przez enzym przebiega z odwróceniem konfiguracji grupy fosforanowej (Jarvest, 1981), co świadczy o tym, iż transfer grupy fosforanowej następuje przez bezpośredni atak nukleofilowy grupy OH<sub>1</sub> Fru6-P na grupę fosforanową γ ATP. Enzym powinien zapewnić zasadę odciągającą proton od OH<sub>1</sub>, a także grupy stabilizujące grupę fosforanową w pięciokoordynacyjnym stanie przejściowym.



**Rys. 4.** Schemat miejsca aktywnego w “zamkniętej” podjednostce, a) kompleks Pfk z substratami: Fru6-P, ATP (na podstawie struktury analogu AMPPNP); b) kompleks Pfk z produktami: Fru1,6-P<sub>2</sub>, ADP. Arg162 i Arg243 należą do sąsiedniej podjednostki. Arg171 znajduje się nad C<sub>1</sub> i O<sub>1</sub> pierścienia fruktozy. Źródło rysunku: Evans, 1992.



Z analizy struktury enzymu wynika, że w bliskim sąsiedztwie OH<sub>1</sub> Fru6-P znajduje się Asp127, która może działać jak zasada. Reszty Thr125, Arg72, Gln11 i Arg171 mogą stabilizować grupę fosforanową  $\gamma$ , a Asp103 i Asp129 mogą pomagać w utrzymaniu jonu Mg<sup>2+</sup> w odpowiednim położeniu.

Mutageneza potwierdziła znaczenie Asp127 dla przebiegu reakcji katalitycznej (Hellings, 1987; Laine, 1992), wykazała także, że spośród dwóch reszt Asp oddziałujących z Mg<sup>2+</sup>, Asp129 ma większe znaczenie dla katalizy mimo, że oddziałuje z jonem za pośrednictwem dwóch cząsteczek wody (Berger, 1992; Laine, 1992).

W wiązaniu substratu uczestniczą dwie reszty pochodzące z sąsiedniej podjednostki Arg162 i Arg243, wiążące grupę fosforanową  $\delta$  z Fru6-P. Oddziaływania te mogą mieć wpływ na powinowactwo enzymu do Fru6-P podczas allosterycznego przejścia.

W strukturze krystalograficznej zaobserwowano podjednostki różniące się konformacją w obrębie zewnętrznych warstw helikalnych większej domeny. Podjednostkom nadano nazwę "otwartej" (obserwowanej już we wcześniej rozwiązanych strukturach) i "zamkniętej" (której szczegóły przedstawia rysunek 4). W obu podjednostkach odległość między substratami w centrum aktywnym jest znacząco różna. W podjednostce "otwartej" odległość pomiędzy grupą fosforanową  $\gamma$  i jej akceptorem – O<sub>1</sub> Fru6-P wynosi ponad 4 Å, co stanowi zbyt duży dystans dla bezpośredniego nukleofilowego ataku. Natomiast w podjednostce "zamkniętej" dystans ten wynosi około 3 Å, a substraty ustawione są w sposób umożliwiający zajście reakcji. Zaobserwowanie podjednostek w dwóch konformacjach pozwala sądzić, iż ulega ona zmianie w trakcie reakcji. Substraty mogłyby wiązać się do formy "otwartej", następnie dochodziłoby do zbliżenia się domen tak by mogła zajść reakcja (forma "zamknięta") i ponownego przyjęcia konformacji "otwartej" w celu oddysocjowania produktów (Evans, 1992).

## **Fosfofruktokinaza eukariotyczna**

Eukariotyczne fosfofruktokinazy są enzymami bardziej złożonymi pod względem genetycznym, kinetycznym i strukturalnym w stosunku do swych prokariotycznych odpowiedników. Tworzą struktury tetrameryczne (ssaki i *Rhodotorula glutinis*) lub oktameryczne (większość gatunków drożdży) zbudowane z podjednostek o masach cząsteczkowych w przedziale 80 – 110 kDa. O wiele bardziej skomplikowana jest również

regulacja enzymów, na ich aktywność może mieć wpływ co najmniej 20 różnych związków chemicznych (efektorów) (Sols, 1981).

Większość z eukariotycznych Pfk ewoluowało przez proces duplikacji i fuzji genu bakteryjnego, co doprowadziło do powstania eukariotycznego enzymu podwójnej wielkości. Eukariotyczna podjednostka składa się z N- i C-terminalnych połówek zwanych również domenami, z których każda ma sekwencję podobną do prokariotycznej podjednostki oraz dzieli się na dwie subdomeny mniejszą i większą (Poorman, 1984; Heinisch, 1986; Ruiz, 2007). Przypuszczano, że podwójnej wielkości Pfk eukariotyczne mają dwie klasy miejsc efektorowych: pierwszą odpowiadającą bakteryjnemu miejscu efektorowemu wiążącemu nukleotydy, i drugą wymutowaną z miejsca aktywnego (Poorman, 1984). Badania wskazują, iż mutacje w C-terminalnej połówce podjednostki, w obszarze odpowiadającym miejscu aktywnemu (jak wynika z nałożenia sekwencji bakteryjnej) doprowadziły do zaniku funkcji katalitycznej i powstania miejsca efektorowego wiążącego najsilniejszy aktywator enzymu eukariotycznego – fruktozo-2,6-bisfosforan (Fru2,6-P<sub>2</sub>).

### **Fosfofruktokinaza-1 z *Saccharomyces cerevisiae***

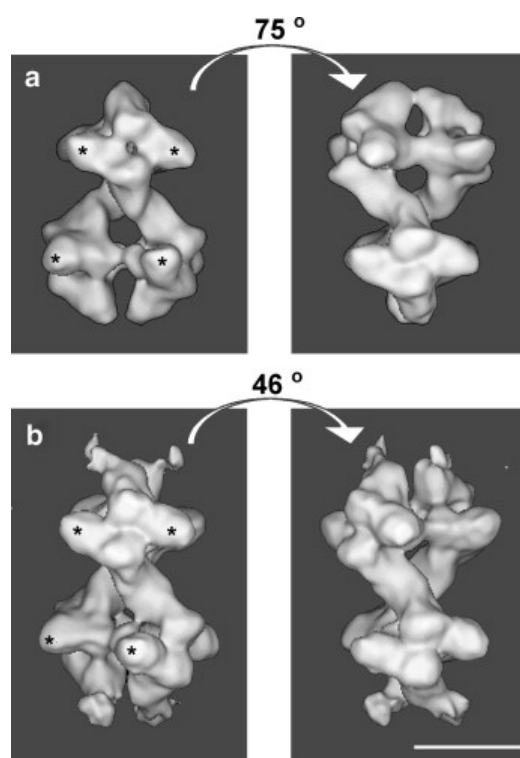
Drożdżowe fosfofruktokinazy tworzą struktury homooktameryczne (*Schizosaccharomyces pombe*) (Reuter, 2000) lub heterooktameryczne (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*) (Bär, 1997; Kopperschläger, 1977; Lorberg, 1999; Plietz, 1978; Reuter, 2000; Tijane, 1979).

Fosfofruktokinaza z *S. cerevisiae*, będąca heterooktamerem, złożona jest z dwóch typów podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$ . Łańcuch  $\alpha$  zbudowany jest z 987 reszt aminokwasowych, natomiast  $\beta$  z 959 (Heinisch, 1989). Natywny enzym o współczynniku sedymentacji 21S i masie cząsteczkowej 835 kDa składa się z czterech podjednostek  $\alpha$  i czterech  $\beta$  (Kopperschläger, 1977), przy czym podjednostki  $\alpha$  tworzą rdzeń cząsteczki natomiast podjednostki  $\beta$  są ulokowane od zewnątrz (konformacja  $\beta_2\alpha_4\beta_2$ ) (Kricke, 1999).

Pierwsze doniesienia potwierdzające oktameryczną strukturę enzymu z *S. cerevisiae* pochodzą z badań metodą SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) (Plietz, 1978) następnie z mikroskopii elektronowej na próbkach barwionych negatywowo (Nissler, 1985). Pierwszą niskorozdzielczą (20 Å) trójwymiarową strukturę enzymu, w obecności Fru6-P, otrzymano metodą mikroskopii elektronowej w obniżonej temperaturze (cryo-electron microscopy,

cryo-EM) (Ruiz, 2001). Następnie, używając tej samej techniki, otrzymano trójwymiarowe modele enzymu w dwóch formach: R - w obecności Fru6-P; i T - w obecności ATP, z wyższą rozdzielczością (odpowiednio 11 Å i 13 Å) (Ruiz, 2003; Ruiz, 2007).

Cząsteczka enzymu, zarówno w stanie T jak i w stanie R, może być postrzegana jako dimer tetramerów. Pomiedzy dwoma tetramerami, górnym  $\alpha_2\beta_2$  i dolnym  $\alpha_2\beta_2$ , istnieje duża asymetria, a ich wzajemna orientacja różni się w zależności od stanu w którym znajduje się enzym. Rotację pomiędzy górnym i dolnym tetramerem w formie R wyliczono na 75° i 46° w formie T (Rys.5).



**Rys. 5.** Struktura drożdżowej Pfk1 w obecności Fru6-P (a) i ATP (b) zbadana metodą cryo-EM. Dwie projekcje każdego stanu skorelowane wzdłuż dłuższej osi cząsteczki. Większe subdomeny w podjednostkach  $\alpha$  i  $\beta$  oznaczone przez (\*). Pasek skali - 10 nm (źródło rysunku: Ruiz, 2007).

W wyniku przejścia enzymu z formy R do T zauważono zwiększenie rozmiarów cząsteczki, której wymiary w przybliżeniu wynoszą 21,5 nm - długość i 15,2 nm - szerokość, w obecności Fru6-P oraz odpowiednio 24,5 nm i 16,2 nm w obecności ATP. Przearanżowanie podjednostek spowodowało, że centralny kanał biegnący wzdłuż dłuższej osi oktameru stał się bardziej otwarty na obu końcach (jak wynika z badań cryo-EM).

Podobnie jak prokariotyczny enzym drożdżowa Pfk wykazuje kooperatywne wiązanie Fru6-P i niekooperatywne wiązanie ATP (Reuter, 1979). Jednak na temat stechiometrii wiązania obu substratów toczy się nadal otwarta dyskusja. Jedna grupa badaczy sugeruje 4 miejsca wiązania ATP i 4 miejsca wiązania Fru6-P (Laurent, 1978, 1979), druga natomiast 8 miejsc wiążących ATP i 8 wiążących Fru6-P (Nissler, 1977a, b). Jak już wspomniano, miejsca katalityczne w C-terminalnych połówkach drożdżowych podjednostek w wyniku mutacji dały miejsca efektorowe wiążące cukier (8 takich miejsc na oktamer), natomiast z badań wynika wiązanie się 4 cząsteczek Fru<sub>2,6</sub>-P<sub>2</sub> na oktamer (Kessler, 1982). Stąd istnieją przypuszczenia, że nawet jeśli możliwych jest 8 miejsc wiązania dla każdego z substratów i 16 możliwych miejsc regulatorowych (8 dla nukleotydów i 8 dla związków cukrowych) jedynie połowa z nich jest obsadzona w warunkach wysycenia enzymu (Ruiz, 2007). Według autorów tezę tę miałyby wspierać asymetria widoczna w strukturze oktameru.

### **Ograniczona proteoliza drożdżowej Pfk**

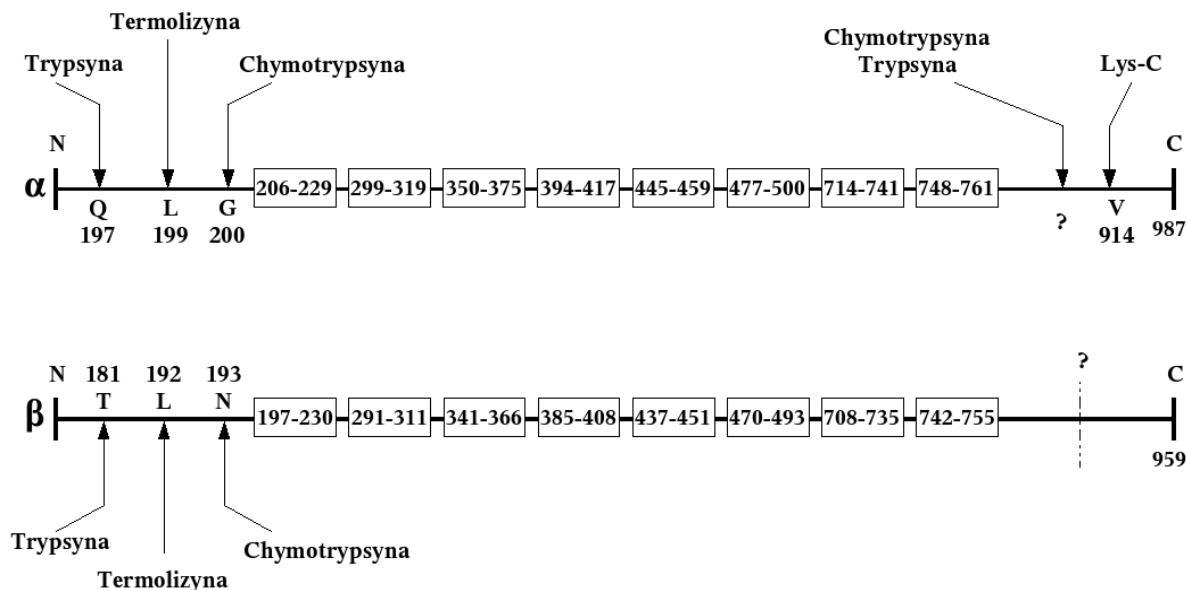
Fosfofruktokinaza drożdżowa ulega trawieniu przez enzymy proteolityczne w stopniu zależnym od rodzaju enzymu oraz obecności związków wiążących się z Pfk (Kopperschläger, 1993). Badania wykazały, że przy braku substratów i allosterycznych efektorów, aktywność katalityczna fosfofruktokinazy szybko zanika podczas działania termolizyny, endopeptydazy lys-C, trypsyny i chymotrypsyny. Obecność ATP w stężeniu wysycającym enzym chroni go przed proteolityczną dezaktywacją, czasem chroniąc także przed proteolizą (termolizyna). Natomiast jednoczesna obecność Fru6-P, AMP i Fru<sub>2,6</sub>-P<sub>2</sub> zapewnia przejściowy wzrost katalitycznej aktywności podczas proteolizy.

Działanie termolizyny na drożdżową Pfk w obecności Fru6-P, AMP i Fru<sub>2,6</sub>-P<sub>2</sub> powoduje cięcie wiązania peptydowego poprzedzającego Leu199 w łańcuchu  $\alpha$  i Leu192 w łańcuchu  $\beta$ . W ten sposób powstaje białko o współczynniku sedymentacji 17S i masie cząsteczkowej 680 kDa, zachowujące swą oktameryczną strukturę. Masy cząsteczkowe podjednostek oznaczanych  $\alpha'$  i  $\beta'$  wynoszą odpowiednio 86 kDa i 76 kDa i stworzone są

z reszt 199-987 oraz 192-959.

Endopeptydaza lys-C w obecności ATP powoduje trawienie tylko C-końca łańcucha  $\alpha$  na wiązaniu peptydowym poprzedzającym Val914. Skutkuje to dysocjacją oktamerycznej formy Pfk do dwóch tetramerów złożonych z podjednostek  $\alpha^{\circ}$  (reszty 1-913) i  $\beta$ . Jest to forma enzymu o współczynniku sedymentacji 13S.

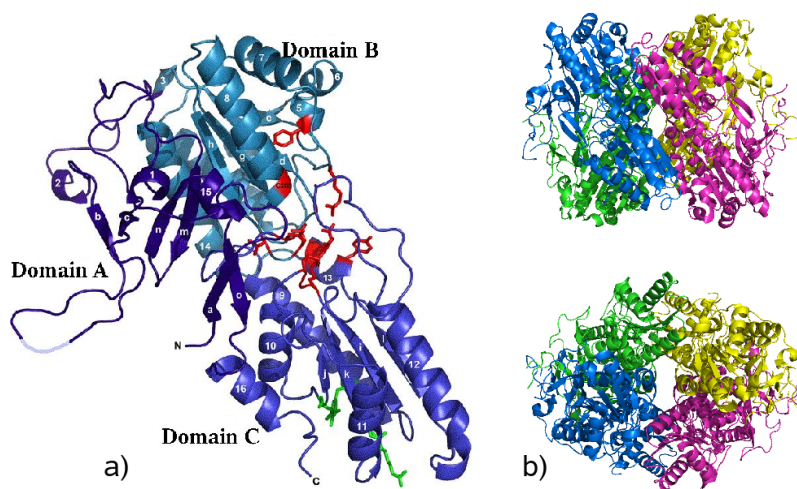
W przypadku proteolizy trypsyną lub chymotrypsyną obecność ATP chroni Pfk przed dezaktywacją, ale nie chroni przed cięciem zarówno N- jak i C-terminalnych regionów. W wyniku proteolizy powstaje białko tetrameryczne o masie cząsteczkowej około 300 kDa charakterystycznej dla formy 12S. Trypsyna powoduje cięcie wiązania pomiędzy Arg196 i Gln197 w łańcuchu  $\alpha$  oraz pomiędzy Lys180 i Thr181 w łańcuchu  $\beta$ . Chymotrypsyna tnie wiązanie pomiędzy Leu199 i Gly200 w łańcuchu  $\alpha$  i między Leu192 a Asn193 w łańcuchu  $\beta$ . N-terminalne cięcie podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  w rejonie około reszty 200, nie tłumaczy powstania łańcuchów o masach cząsteczkowych 69 kDa i 76 kDa, oznaczanych odpowiednio  $\alpha''$  i  $\beta'$ . Cięcie łańcucha  $\alpha$  musi następować także na C-końcu, jednak miejsce cięcia nie zostało zidentyfikowane. Skutki proteolizy wskazują, iż C-koniec łańcucha  $\alpha$  jest odpowiedzialny za stabilizację formy oktamerycznej.



**Rys. 6.** Lokalizacja miejsc cięcia łańcuchów polipeptydowych drożdżowej Pfk. Przedziały reszt aminokwasowych zaznaczone w ramkach odpowiadają fragmentom łańcuchów drożdżowych  $\alpha$  i  $\beta$  wykazującym maksymalną zgodność aminokwasową z sekwencjami Pfk z *E. coli*, *B. stearothermophilus*, człowieka i z mięśnia królika wg Heinisch (1989) (źródło rysunku: Kopperschläger, 1993).

## Fosfofruktokinaza-1 z *Trypanosoma brucei*

W tym roku Walkinshaw i współpracownicy rozwiązali strukturę krystalograficzną eukariotycznego enzymu z *Trypanosoma brucei* (TbPFK) (Martinez-Oyanedel, 2007; kod PDB: 2HIG). *Trypanosoma brucei* to pasożytniczy pierwotniak należący do rodziny świdrowców wywołujący śpiączkę afrykańską, charakteryzującą się wysoką śmiertelnością. Fosfofruktokinaza z tego organizmu, jest enzymem pośredniej wielkości pomiędzy bakteryjnym i ssaczym białkiem. TbPFK zbudowana jest z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 50 kDa. Pod względem sekwencji wykazuje zaledwie 20-30% identyczności w porównaniu do ATP-zależnych enzymów bakteryjnych i ssaczych. Nie jest regulowana przez efekторы regulujące aktywność ATP-zależnych fosfofruktokinaz w innych organizmach, jedynie AMP jest znany jako jej allosteryczny aktywator (Cronin, 1985; Cronin, 1987). Rdzeń strukturalny podjednostki bakteryjnej jest obecny w podjednostce TbPFK, a dodatkowo w okolicach miejsca aktywnego występuje pętla znacznej wielkości, charakterystyczna dla TbPFK, oraz domena A, której większa część nie jest obecna w strukturze enzymu z bakterii czy ssaków (Rys.7). Różnice w budowie podjednostki najprawdopodobniej mają wpływ na aktywność i strukturę czwartorzędową enzymu. Reszty aminokwasowe miejsca aktywnego TbPFK są w większości zachowane w stosunku do enzymu z *E. coli*. Natomiast zaledwie dwie z dwunastu reszt tworzących miejsce efektorowe białka z *E. coli* są obecne w potencjalnym miejscu efektorowym TbPFK (Martinez-Oyanedel, 2007).



Rys. 7. a) podjednostka Pfk z *Trypanosoma brucei* (Martinez-Oyanedel, 2007; kod PDB: 2HIG); b) homotetramer w dwóch położeniach.

Pod względem sekwencyjnym i strukturalnym ATP-zależna TbPFK wykazuje większe podobieństwo do PPI-zależnej rodziny Pfk, używa jednak ATP jako donora grupy fosforanowej. Przypuszcza się, że jej ewolucyjnym przodkiem był enzym PPI-zależny (Michela, 1997; López, 2002). Strukturalne różnice fosfofruktokinazy z *Trypanosoma brucei* w stosunku do ATP-zależnych fosfofruktokinaz są przypisywane ulokowaniu enzymu w glikosomach, gdzie glikolityczne enzymy biorą udział w tworzeniu wielo-enzymatycznych kompleksów (Aman, 1985). Przypuszcza się, że odmienna lokalizacja 7 pierwszych enzymów glikolitycznych w organizmach świdrowców miała wpływ na powstanie cech odróżniających je od enzymów z tkanek ludzkich. Te różnice, według badaczy, mogą być punktem zaczepienia przy projektowaniu przeciwpasożytniczych leków, a Pfk, jako enzym katalizujący kluczowy regulatorowy etap glikolizy, stanowi obiecujący obiekt tego typu badań.

## **Fosfofruktokinaza-1 w organizmach ssaków**

Fosfofruktokinaza występująca w organizmach ssaków jest enzymem o najbardziej złożonym mechanizmie regulacji. Poza szeregiem allosterycznych efektorów, wywołujących negatywny efekt allosteryczny, takich jak ATP, cytrynian czy  $H^+$ , oraz stymulujących aktywność enzymu, między innymi AMP, ADP, Pi, Fru2,6-P<sub>2</sub>, Fru1,6-P<sub>2</sub>, Glu1,6-P<sub>2</sub> (glukoza-1,6-bisfosforan) i  $NH_4^+$ , istnieją dowody na to, iż enzym jest także regulowany hormonalnie (Zancan, 2005; Silva, 2004).

Ssacza fosfofruktokinaza wykazuje enzymatyczną aktywność jako tetramer lub też wyżej zorganizowane oligomery, masa cząsteczkowa podjednostek wynosi 80-85 kDa (Uyeda, 1979). Zidentyfikowano trzy rodzaje podjednostek ssaczego Pfk: PFK-M, PFK-L i PFK-C, kodowane przez różne geny. Podjednostki te różnią się w pewnym stopniu rozmiarem i fizyko-chemicznymi właściwościami, a także stopniem ekspresji zależnie od tkanki. Pfk-M występuje w największej ilości w tkance mięśniowej (zarówno mięśnia sercowego jak i mięśni szkieletowych), Pfk-L w wątrobie, a Pfk-C głównie w mózgu. Poszczególne podjednostki mogą agregować przypadkowo tworząc tetramery, stąd każda tkanka posiada nie tylko homotetrameryczne enzymy ale także różnego typu heterotetramery, przez co charakteryzuje się specyficzną dla siebie populacją izoenzymów, o różnych właściwościach kinetycznych (Vora, 1983).

Każdy z trzech rodzajów podjednostek charakteryzuje się inną wrażliwością na

działanie allosterycznych efektorów. Tkankowo-specyficzny wzór opisujący ekspresję poszczególnych podjednostek, determinuje aktywność Pfk, a przez to i przebieg glikolizy w poszczególnych tkankach. Dla przykładu, PFK-C wykazuje niskie powinowactwo do aktywatora Fru2,6-P<sub>2</sub> i jest kompletnie niewrażliwa na Fru1,6-P<sub>2</sub>, podczas gdy PFK-M i PFK-L są silnie aktywowane przez te metabolity. PFK-C oraz PFK-M cechują się silnym powinowactwem do substratu, Fru6-P, także przy nieobecności żadnego z allosterycznych efektorów, podczas gdy PFK-L wymaga obecności Fru2,6-P<sub>2</sub> do aktywności w warunkach fizjologicznych (Narabayashi, 1985). Uzależnienie aktywności PFK-L od obecności Fru2,6-P<sub>2</sub> pozwala na jej hormonalną regulację, dlatego też przebieg glikolizy w wątrobie jest zintegrowany ze stanem energetycznym całego organizmu. Zależność PFK-L od allosterycznych aktywatorów może być zmniejszona przez asocjację z PFK-M i PFK-C.

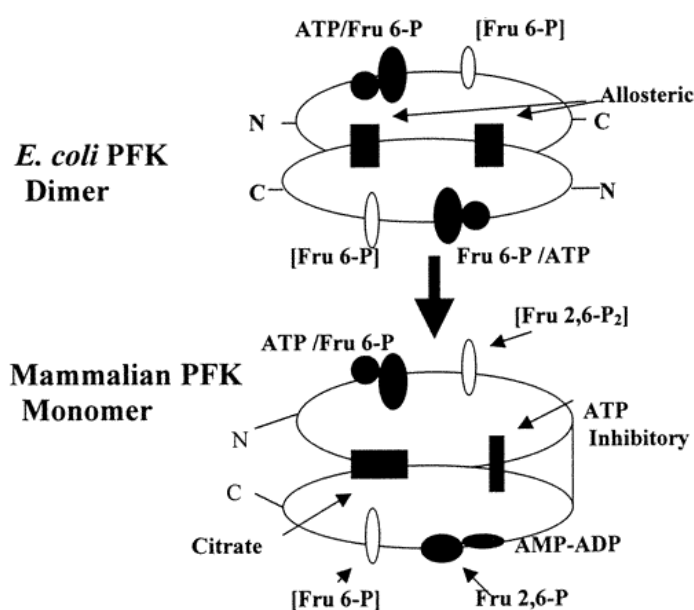
Mięśnie wymagają szybkiej produkcji ATP na początku szybkiego skurczu i długotrwałego utleniania glukozy podczas wysiłku. PFK-M przypuszczalnie została wyspecjalizowana by sprostać tym wymaganiom poprzez niską wrażliwość na inhibicję przez ATP oraz wysokie powinowactwo do Fru6-P podczas nieobecności allosterycznych aktywatorów (Dunaway, 1985).

Fosfofruktokinaza wyewoluowała poprzez proces duplikacji genów, ich różnicowania i fuzji, dając białko, które jest więcej niż podwójnej wielkości w stosunku do prokariotycznego przodka. Posiada sześć miejsc wiązania organicznych ligandów: miejsca wiązania substratów ATP i Fru6-P, miejsca wiązania aktywatorów – AMP lub ADP i Fru2,6-P<sub>2</sub> oraz miejsca dla inhibitorów – ATP i cytrynianu (Kemp, 1983).

Bazując na analizie sekwencji i określeniu zachowanych reszt aminokwasowych pomiędzy bakteryjną Pfk, a N- i C-terminalnymi połówkami podjednostki eukariotycznego enzymu wnioskuje się, że miejsce aktywne ssaczego białka jest ulokowane w N-terminalnej połówce łańcucha peptydowego (Poorman, 1984). Punktowa mutagenesa (Li, 1999) i chemiczne modyfikacje (Kemp, 1987) wykazały, że miejsce wiążące cytrynian w Pfk eukariotycznej jest homologiczne do allosterycznego miejsca wiążącego PEP/ADP w Pfk *E. coli* (Lau, 1989). Natomiast miejsce wiązania Fru2,6-P<sub>2</sub> jest homologiczne do miejsca katalitycznego Fru6-P w enzymie bakteryjnym, przy czym dotyczy to zduplikowanej połowy podjednostki (Li, 1999; Chang, 2002). Istnieją spekulacje dotyczące ulokowania miejsca wiązania inhibitora ATP i aktywatora AMP/ADP ssaczego enzymu. Rozważa się hipotezę, zgodnie z którą miejsca wiązania dla tych ligandów ewoluowały poprzez mutacje w zduplikowanym, katalitycznym miejscu wiązania ATP i allosterycznym miejscu wiązania PEP/ADP, enzymu przodka, co odpowiada C-terminalnej połówce eukariotycznego łańcucha.



Zaproponowano model ewolucyjny wiązania ligandów do ssaczego Pfk (Rys.8; Kemp, 2002). Rysunek 8 przedstawia schemat bakteryjnego dimeru i ssaczego monomeru, przy czym jak pisano wyżej, aktywne formy obu enzymów to tetramery. Miejsca katalityczne ATP znajdują się w pokazanych podjednostkach, natomiast wszystkie pozostałe miejsca wiążące ligandy są podzielone pomiędzy podjednostki. Drugi dimer modelu bakteryjnego (górny rysunek) byłby ulokowany za płaszczyznę rysunku z miejscem wiązania Fru6-P pomiędzy podjednostkami. Dolna połowa rysunku pokazuje proponowany ssaczy monomer, który powstał w wyniku tandemowej duplikacji i fuzji prokariotycznego prekursora, z proponowanymi miejscami wiązania ligandów. Drugi ssaczy monomer może być zlokalizowany za płaszczyznę rysunku z miejscami wiązania Fru6-P i Fru2,6-P<sub>2</sub> podzielonymi pomiędzy podjednostki. Drugi identyczny ssaczy dimer, mógłby być ulokowany po prawej stronie, tak by stworzyć tetramer, w którym główne oddziaływania dimer-dimer tworzyłyby peptydowe fragmenty łączące N- i C-terminalne połówki ssaczego monomeru.



**Rys. 8.** Model ewolucji ssaczej podjednostki Pfk z dimeru prokariotycznego przodka. Zaznaczono allosteryczne i substratowe (ATP/Fru6-P) miejsca wiązania. Miejsca wiązania umieszczone w nawiasach należą w większej części do podjednostek znajdujących się za płaszczyznę rysunku. Dimer bakteryjny na podstawie struktury Pfk z *E. coli* (Shirakihara, 1988). Źródło rysunku: Kemp, 2002.

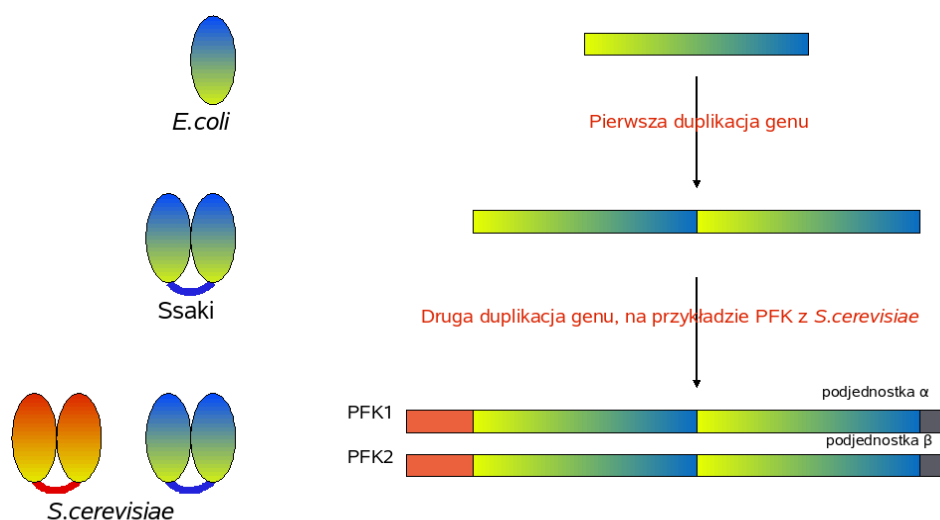
Należy jeszcze wspomnieć, że wpływ na aktywność fosfofruktokinazy ma również jej rozmieszczenie w komórce, a dokładniej mówiąc, jej asocjacja do struktur komórkowych (Silva, 2004). Wiele badań dotyczących komórkowego rozmieszczenia mięśniowej fosfofruktokinazy wykazało, że enzym ten asocjuje z dużym powinowactwem do włókien aktynowych, głównego składnika cienkich filamentów w mięśniach szkieletowych (Arnold, 1968; Arnold, 1971; Clarke, 1975). Wykazano także, że kinetyczne właściwości enzymu mogą zależeć od tej asocjacji. Prawdopodobnie proces ten reprezentuje ważny mechanizm w kontroli szlaku glikolitycznego, ponieważ zasocjowany enzym jest bardziej aktywny niż jego rozpuszczona (niezasocjowana) forma (Liou, 1980; Roberts, 1987; Andres, 1996). Hormony takie jak adrenalina i insulina są przypuszczalnie zaangażowane w indukcję asocjacji Pfk do cytoszkieletu komórki (Chen-Zion, 1992; Ashkenazy-Shahar, 1998; Alves, 2003).

## **Zarys ewolucji enzymu**

Struktury enzymów glikolitycznych jakie znane są obecnie oraz skomplikowane mechanizmy ich kontroli są świadectwem długiej ewolucji, a siłą napędową dla ich rozwoju były wymagania metaboliczne komórek. Na drodze ewolucji powstały enzymy o odpowiedniej specyficzności i powinowactwie do substratów, a wzrost ich wydajności katalitycznej i rozwinięcie mechanizmów regulacji dało bardziej złożone glikolityczne szlaki.

Jednym z kluczowych procesów w ewolucji enzymów jest duplikacja genu. Powstawanie nowego białka może rozpocząć się od przypadkowej duplikacji całego odcinka materiału kodującego dane białko. Powstała w ten sposób dodatkowa kopia genu wolna jest od presji ograniczającej powstawanie i gromadzenie się mutacji w genach ulegających ekspresji, dzięki czemu może akumulować mutacje zazwyczaj nie zaburzając funkcjonowania organizmu. Zmiany w sekwencji nukleotydowej dodatkowej kopii genu mogą doprowadzić do powstania zupełnie nowych możliwości funkcjonalnych, które mogą zostać zachowane podczas ewolucji. W innym przypadku w dodatkowej kopii może nastąpić mutacja prowadząca do powstania pseudogenu.

Przejawem ewolucji przez duplikację i fuzję genów jest wielkość i kształt podjednostek Pfk w różnych organizmach (Rys.9).



Rys. 9. Schemat duplikacji genów enzymu Pfk (po prawej) oraz jego przełożenie na rozmiar podjednostek (po lewej).

Złożona struktura czwartorzędowa enzymów eukariotycznych jest wynikiem skomplikowanych zmian ewolucyjnych. Studia nad bakteryjną Pfk wykazały ulokowanie miejsc aktywnych i efektorowych pomiędzy sąsiednimi podjednostkami w strukturze białka, co tłumaczy fakt aktywności enzymu w formie tetramerycznej. W przypadku enzymu eukariotycznego, zważywszy na duplikację genu, można by się spodziewać aktywnego dimeru odpowiadającego prokariotycznemu tetramerowi. Jest jednak inaczej. Pfk ssaka wykazuje aktywność jako tetramer (odpowiadający bakteryjnemu oktamerowi) i może ulegać agregacji do bardziej złożonych form, które są mniej wrażliwe na inhibicję wywołaną przez ATP (Hofer, 1987). Enzym drożdżowy natomiast, który złożony jest z dwóch typów łańcuchów polipeptydowych  $\alpha$  i  $\beta$ , asocjuje do heterooktameru  $\alpha_4\beta_4$ . Stąd wnioskuje się, że proces pierwszej duplikacji genu nastąpił bardzo wcześnie po rozdzieleniu się prokariotycznych i eukariotycznych dróg ewolucji. Natomiast druga duplikacja genu prowadząca do powstania dwóch odrębnych łańcuchów polipeptydowych obecnych w enzymie drożdżowym, miała miejsce już po oddzieleniu się drogi ewolucyjnej grzybów od głównej drogi eukariotów (Heinisch, 1989).

W toku ewolucji nastąpił wzrost skomplikowania mechanizmu regulacji enzymu kluczowego dla glikolizy. Bakteryjna Pfk (np. z *E. coli*. i *B. stearothermophilus*) jest aktywowana jedynie przez ADP i GDP, a inhibowana przez PEP. Dzięki ewolucji pojawiły się

nowe efekторы dla komórek eukariotycznych. ATP – jako allosteryczny inhibitor, oraz AMP – jako allosteryczny aktywator, pozwalają enzymowi reagować na aktualny poziom energetyczny komórki, wyrażony jako stosunek ATP/AMP, przyspieszając lub hamując przebieg szlaku glikolitycznego. Ponadto najbardziej efektywnym aktywatorem eukariotycznej Pfk stał się Fru2,6-P<sub>2</sub>, który jednocześnie inhibuje działanie Fru-1,6-bisfosfatazy, odgrywając w ten sposób kluczową rolę w regulacji przeciwstawnych procesów glikolizy i glukoneogenezy. Produkt reakcji fosfofruktokinazy, Fru1,6-P<sub>2</sub>, stał się również allosterycznym aktywatorem, ale tylko w ssaczych enzymach; nie wywiera żadnego wpływu na aktywność drożdżowego białka (Vinuela, 1963; Bartrons, 1982).

## **Fosfofruktokinaza w medycynie**

### **Choroba spichrzania glikogenu. Typ VII – niedobór fosfofruktokinazy**

Choroba Taruiego (Glycogen Storage Disease VII, GSD-VII) jest spowodowana wrodzonym brakiem lub niedoborem aktywności fosfofruktokinazy w mięśniach lub erytrocytach. Choroba uniemożliwia wykorzystanie glukozy do celów energetycznych. W komórkach zwiększa się zawartość metabolitów poprzedzających reakcję katalizowaną przez fosfofruktokinazę. Zwiększa się zawartość glukozo-6-fosforanu i Fru6-P, a zawartość Fru1,6-P<sub>2</sub> jest niska. Glikogen nie jest wykorzystywany do produkcji glukozy. Jego zawartość w mięśniach rośnie.

Istnieje kilka podtypów GSD-VII, np. GSD-VIIb - forma ujawniająca się w późniejszym wieku, czy GSD-VIIc - forma niemowlęca (Nakajima, 2002).

GSD-VIIb zwykle nie daje widocznej miopatii we wczesnym dzieciństwie. Większość pacjentów nie doświadcza skurczów lub bólu mięśni w młodości. Zamiast tego, pacjenci doświadczają łatwego męczenia się mięśni i osłabienia. Zdolność pacjentów do wysiłku fizycznego jest relatywnie niska od dzieciństwa i zmniejsza się z wiekiem prowadząc często do poważnego upośledzenia codziennej aktywności.

Symptomy formy niemowlęcej pojawiają się krótko po narodzinach. Niemowlę ma hipotonię i zwykle umiera w pierwszym roku życia. Istnieją także przypadki dłuższego przeżycia, jednak towarzyszy temu fizyczny i umysłowy niedorozwój. W niektórych

przypadkach obserwowano ogólną sztywność stawów.

Za upośledzenie aktywności Pfk odpowiedzialne są mutacje wykryte w obrębie mRNA różnych pacjentów. Niektóre z mutacji zlokalizowane były w ewolucyjnie zachowanych regionach, związanych przypuszczalnie z centrum katalitycznym, miejscem wiązania ADP/AMP czy też Fru2,6-P<sub>2</sub>, będąc odpowiedzialnymi za utratę enzymatycznej aktywności Pfk.

Prace nad odkryciem właściwej terapii trwają. U chorych stosuje się jedynie terapię zastępczą, wykorzystywaną w leczeniu pacjentów cierpiących na GSD-II.

## **Fosfofruktokinaza w komórkach rakowych**

Komórki rakowe charakteryzują się wysoką szybkością przebiegu glikolizy, która jest dla nich głównym źródłem energii. Wzmożony metabolizm glukozy jest wywołany wieloma czynnikami, między innymi jakościowymi i ilościowymi zmianami w transporterach glukozy oraz zmianą w aktywności enzymów glikolitycznych, w tym także fosfofruktokinazy (El-Bacha, 2003).

Ważnym mechanizmem kontrolującym glikolizę jest odwracalne wiązanie enzymów glikolitycznych do cytoszkieletu. Badania wykazały, że w tkankach pochodzących z guza aktywność fosfofruktokinazy jest znacząco wyższa w porównaniu do zdrowych tkanek. Wydaje się, że na wzrost aktywności Pfk ma wpływ zmieniony rozkład enzymu w komórce, związany z inną jego asocjacją do struktur cytoszkieletu. Wzmożona aktywność fosfofruktokinazy musi mieć wpływ na żywotność i szybki rozwój komórek rakowych.

Dane sugerują, że wpływ hormonów na komórkowe rozmieszczenie Pfk może być istotnym punktem dla regulowania glikolitycznego szlaku w tkankach ludzkich raka.

Zdaniem wielu badaczy rozmieszczenie Pfk w komórkach pochodzących z tkanek rakowych może wpływać na aktywność enzymu i stymulować rozwój guzów, będąc przez to ważnym celem w badaniach nad antyrakowymi lekami. Niektórzy badacze (Nakamura, 1986) sugerują nawet, że aktywność Pfk mogłaby być użyta jako biochemiczny marker dla pewnych typów raka.

Idąc tym tropem naukowcy odkryli, że miejscowe środki znieczulające, takie jak *Lidocaini* i *Bupivacaini*, powodują, zależne od dawki, odczepianie fosfofruktokinazy i aldolazy od cytoszkieletu komórek czerniaka. Dysocjacja enzymów glikolitycznych od

cytoszkieletu może redukować ilość dostarczanego ATP, a co za tym idzie żywotność komórek czerniaka. Dysocjacja indukowana przez lek poprzedza śmierć komórki rakowej. Obecne rezultaty sugerują, że miejscowe środki znieczulające, głównie *Bupivacaini*, są obiecującymi lekami w leczeniu czerniaka (Schwartz, 2000).

# Metodyka

## **Krystalizacja**

Proces krystalizacyjny prowadzono metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli. W technice tej kropla znajduje się na szkiełku krystalizacyjnym nad roztworem rezerwuarowym. W skład roztworu rezerwuarowego wchodzi bufor oraz organiczny lub nieorganiczny czynnik strącający bądź też mieszanina czynników strącających. Kropla zawiera roztwór krystalizowanego białka oraz roztwór rezerwuarowy, zwykle w stosunku 1:1. Stężenie czynnika strącającego w kropli jest mniejsze niż w roztworze rezerwuarowym, co stanowi siłę napędową krystalizacji. Układ dąży do stanu równowagi, dyfuzja składników lotnych prowadzi do wyrównania stężeń czynnika strącającego w obu roztworach, co powoduje zagęszczenie kropli i tworzenie kryształów.

## **Pomiary dyfrakcyjne**

W krystalografii makrocząsteczek najczęściej wykorzystywanym źródłem promieniowania jest promieniowanie synchrotronowe. Charakteryzuje się ono wysoką intensywnością, monochromatycznością oraz wysokim stopniem polaryzacji i zogniskowania. Ma to duże znaczenie ze względu na niewielkie rozmiary jakie zwykle osiąga kryształ białkowy przy jednocześnie stosunkowo dużych rozmiarach komórki elementarnej.

Przed rozpoczęciem pomiarów kryształ zwykle zamraża się w strumieniu par azotu (Teng, 1990), by poprawić jego wytrzymałość na działanie wiązki. Obniżona temperatura ogranicza uszkodzenia radiacyjne, do których dochodzi w dużej mierze na skutek dyfuzji wolnych rodników w sieci krystalicznej (Garman, 1999). Kriogenika pozwala zatem na zastosowanie promieniowania o większej intensywności lub wydłużenie czasu naświetlania, co przekłada się zwykle na lepszą jakość rejestrowanych danych.

W celu uniknięcia powstawania kryształków lodu podczas zamrażania, kryształ nasącza się roztworem zawierającym czynnik krioprotekcyjny, który dzięki dużej lepkości utrudnia cząsteczkom wody krystalizację w trakcie chłodzenia. Zadanie krioprotektanta spełniać może glicerol, glikol etylenowy lub polietylenowy o masie cząsteczkowej około 400, MPD (2-metylopentano-2,4-diol) lub też proste związki cukrowe takie jak glukoza.

W trakcie pomiaru kryształ jest obracany wokół osi prostopadłej do wiązki promieniowania. Dla każdego obrotu o niewielki kąt (od 0,2 – 2°) rejestrowany jest obraz



dyfrakcyjny. Minimalna liczba obrazów, które powinny zostać zarejestrowane by zgromadzić kompletny zbiór danych, inaczej mówiąc zakres kąta dla którego należy zarejestrować refleksy, zależy od symetrii grupy przestrzennej. W celu zminimalizowania błędów pomiarowych i osiągnięcia maksymalnej kompletności zaleca się zarejestrowanie każdego refleksu więcej niż raz poprzez zmierzenie intensywności refleksów symetrycznych.

Dane dyfrakcyjne dla monokryształów Pfk zarejestrowano przy użyciu promieniowania synchrotronowego, w obniżonej temperaturze, w ośrodku synchrotronowym EMBL/DESY w Hamburgu, na stacji pomiarowej wyposażonej w płytę odwzorowującą (Mar Research).

W eksperymentach dyfrakcyjnych dla kryształów z *O. cuniculus* w celu krioprotekcji użyto 30% stężenie PEG 400. Przy pomiarach dla kryształów z *S. cerevisiae* Ingrid Mechin zastosowała szereg roztworów krioprotekcyjnych o rosnącym stężeniu glicerolu 5%, 10%, 15% i 20%.

## **Procesowanie i skalowanie danych dyfrakcyjnych**

Zbiór obrazów otrzymany w wyniku eksperymentu dyfrakcyjnego przetwarza się w celu otrzymania zbioru intensywności. W niniejszej pracy do tego celu wykorzystano pakiet HKL2000 (Otwinowski, Minor, 1997), w którego skład wchodzi: XdisplayF - służący do wizualizacji obrazów dyfrakcyjnych; DENZO - służący do wskaźnikowania i integracji danych oraz SCALEPACK - służący do uśredniania i skalowania intensywności uzyskanych w programie DENZO.

Analiza danych obejmuje kilka głównych etapów:

1. Badanie wzrokowe obrazów dyfrakcyjnych w programie XdisplayF i wstępną ocenę jakości refleksów.
2. Autoindeksowanie – na podstawie jednego obrazu dyfrakcyjnego wybierany jest zbiór silnych refleksów, współrzędne tych refleksów służą do wstępnego wskaźnikowania. Przy założeniu układu trójosowego, oblicza się współczynnik niedopasowania względem różnych sieci Bravais'ego. Biorąc pod uwagę najwyższą symetrię, która daje niski współczynnik niedopasowania, ustala się prawidłową sieć Bravais'ego, parametry komórki elementarnej oraz grupę przestrzenną. Ponieważ obraz dyfrakcyjny nie odzwierciedla

symetrii translacyjnej czasami na tym etapie jednoznaczne określenie grupy przestrzennej nie jest możliwe. Na podstawie informacji uzyskanej ze wskaźnikowania silnych refleksów przypisuje się wskaźniki Millera słabszym refleksom.

3. Udokładnianie geometrii dyfrakcji – poprawiane są parametry kryształu (rotacje kryształu, parametry komórki elementarnej) i układu pomiarowego m. in. pozycja wiązki i detektora.
4. Integracja pików dyfrakcyjnych – następuje oddzielenie sygnału od tła oparte na założeniu, że kształt profilu słabych i silnych refleksów jest podobny. Na podstawie silnych refleksów tworzy się profil, który jest następnie stosowany dla słabszych refleksów. Powierzchnia pod krzywą profilu jest sumowana jako intensywność refleksu.
5. Konwersja danych do wspólnej skali – obliczany zostaje czynnik skali uwzględniający zmiany w intensywności rozpraszanego promieniowania rentgenowskiego, które mogą być spowodowane wahaniami intensywności wiązki pierwotnej, różnym czasem naświetlania lub uszkodzeniami radiacyjnymi. Dla każdego obrazu obliczany jest indywidualny czynnik skali opisujący te zmiany.
6. Precyzyjne określenie parametrów kryształu z wykorzystaniem całego zbioru danych. Powtórnie udokładnione zostają parametry komórki elementarnej i mozaikowość oraz sprawdzana jest poprawność grupy przestrzennej.
7. Łączenie refleksów związanych symetrią – intensywność refleksów symetrycznych jest uśredniana co pozwala wyeliminować część błędów. Dane dyfrakcyjne łączone są w jeden zbiór.

Etapy od 1 do 4 przeprowadzono w programie Denzo i XdisplayF, natomiast do wykonania punktów od 5 do 7 użyto programu Scalepack.

Jakość zbioru danych dyfrakcyjnych jest oceniana na podstawie takich parametrów jak kompletność,  $R_{\text{sym}}$  oraz  $I/\sigma(I)$ . Błąd zbioru danych określa się na podstawie różnicy pomiędzy intensywnościami refleksów symetrycznych, które w idealnej sytuacji powinny być identyczne.

$$R_{\text{sym}}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

Im niższa wartość  $R_{\text{sym}}$  tym lepiej, jednak na wysokość  $R_{\text{sym}}$  wpływa także ilość zmierzonych refleksów symetrycznych czyli krotność. Gdy każdy refleks zostanie zmierzony tylko raz wówczas  $R_{\text{sym}}$  będzie miało wartość 0. Jednak nie świadczy to wcale o poprawności

takiego zbioru. Im wyższa krotność tym więcej przypadkowych błędów pomiarowych może zostać wyeliminowanych, wpływając korzystnie na jakość zbioru, przy jednocześnie nieco wyższej wartości czynnika  $R_{\text{sym}}$ .

$\sigma(I)$  jest oszacowaniem dokładności każdego indywidualnego pomiaru. Na jej wartość wpływa wysokość i zmienność tła oraz ile razy zmierzono refleks.  $I/\sigma(I)$  stanowi często kryterium odrzucenia refleksów, jeśli stosunek ten jest mniejszy niż 2, refleksy są często pomijane jako niewiarygodne.

## **Obliczenie amplitud czynników struktury**

Aby zbiór intensywności refleksów był użyteczny w dalszym etapie rozwiązywania struktury musi zostać przekształcony na zbiór amplitud czynników struktury.

$$I(hkl) = |F(hkl)|^2$$

W pierwszym kroku plik wyjściowy pochodzący ze skalowania musi zostać przekształcony na format MTZ (plik binarny) czytelny dla programów z pakietu CCP4. W niniejszej pracy w tym celu skorzystano z programu SCALEPACK2MTZ (CCP4, 1994).

W kolejnym etapie program TRUNCATE (French, 1978) z pakietu CCP4 posłużył do obliczania amplitud czynników struktury. Są dwie drogi według których program może wykonać obliczenia. Prostsza polega na obliczeniu pierwiastka kwadratowego z intensywności i przyjęciu negatywnych intensywności za zero. Druga, a zarazem zalecana procedura polega na obliczeniu amplitud przy uwzględnieniu czynników skali oszacowanych z wykresu Wilsona i umieszczających dane w skali bezwzględnej. W ten sposób negatywne obserwacje są przesuwane do wartości pozytywnych, sztucznie podnosi się wartość słabszych refleksów.

TRUNCATE może być również przydatny do stworzenia użytecznej statystyki dotyczącej rozkładu intensywności, która może ujawnić ewentualne problemy z danymi, takie jak silna anizotropowość danych, bądź też potencjalne zbliżnienia.

Aby być pewnym, że wszystkie refleksy należące do zbioru danych znajdują się w tej samej części asymetrycznej, użyto programu CAD (CCP4, 1994). Program sortuje refleksy krystalograficzne i jeśli to konieczne przekonwertowuje je z jednego obszaru w przestrzeni

odwrotnej do drugiego.

Z każdego zbioru danych Pfk przy użyciu programów UNIQUE i FREE z pakietu CCP4, wydzielono zbiór refleksów testowych w ilości 5% całego zbioru, służących do obliczania czynnika  $R_{\text{free}}$  w trakcie udokładniania.

## **Rozwiązanie problemu fazowego - podstawienie cząsteczkowe**

Gęstość elektronowa dla kryształu może zostać otrzymana przez syntezę Fouriera:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

$|F(hkl)|$  - amplituda czynnika struktury dla refleksu  $(hkl)$

$\alpha(hkl)$  – kąt fazowy

$x, y, z$  – współrzędne w komórce elementarnej w przestrzeni rzeczywistej

$h, k, l$  – współrzędne w przestrzeni odwrotnej

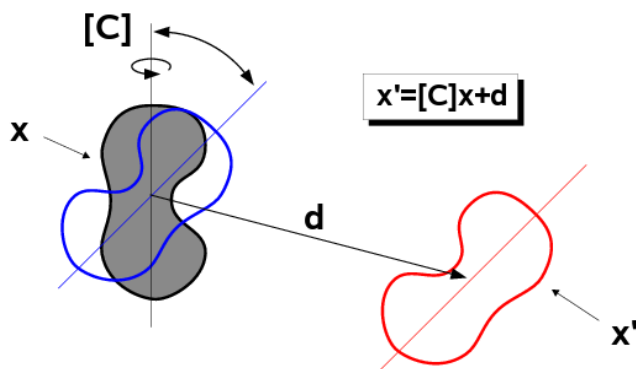
Ponieważ intensywności na obrazach dyfrakcyjnych zawierają jedynie informacje na temat amplitud czynników struktury, brak informacji o fazach stanowi tzw. problem fazowy. Rozwiązanie struktury polega na rozwiązaniu problemu fazowego poprzez przypisanie refleksom wstępnych faz, na tyle dobrych by uznać rozwiązanie za poprawne, chociaż obarczone błędami, które należy usunąć w procesie udokładniania.

Jedną z metod rozwiązania problemu fazowego jest metoda podstawienia cząsteczkowego (Molecular Replacement, MR), zapoczątkowana przez Rossmanna i Błowa (Rossmann, 1962). Polega ona na wykorzystaniu faz czynników struktury pochodzących ze znanej struktury białka jako wstępnych faz dla struktury nowego białka. Metoda ta pozwala na uzyskanie struktury nowego białka z jednego natywnego zbioru danych dyfrakcyjnych. Znana struktura białka jest w tej sytuacji traktowana jako model fazowy.

Metoda podstawienia cząsteczkowego może być zastosowana gdy szukana struktura i model fazowy są podobne, tzn. ich sekwencje aminokwasowe wykazują przynajmniej 20% homologię. Ta procedura bowiem jest oparta na obserwacji, że białka o homologicznej sekwencji mają bardzo zbliżony sposób fałdowania łańcucha polipeptydowego.

Mówiąc bardzo ogólnie, celem podstawienia cząsteczkowego jest znalezienie takiej

orientacji i położenia dla modelu fazowego, które nałożą go na docelowe białko w jego komórce elementarnej, a wówczas z prawidłowo zorientowanego modelu obliczone zostaną wstępne fazy dla badanego białka.



**Rys. 10.** Schematyczna prezentacja metody podstawienia cząsteczkowego, gdzie  $x$  to model fazowy,  $x'$  poszukiwany model,  $[C]$  macierz rotacji,  $d$  wektor translacji.

Powyższy rysunek przedstawia schemat podstawienia cząsteczkowego, gdzie  $x$  jest modelem fazowym natomiast  $x'$  docelową cząsteczką. Aby rozwiązać badaną strukturę potrzebna jest macierz rotacji  $[C]$ , dzięki której model fazowy znajdzie się w tej samej przestrzennej orientacji co szukana cząsteczka, oraz wektor translacji  $d$  potrzebny do nałożenia poprawnie zorientowanej cząsteczki modelu fazowego na cząsteczkę badaną.

Jeśli w części asymetrycznej znajduje się jedna cząsteczka, szukanych jest sześć parametrów, trzy parametry rotacji i trzy translacji. Jednoczesne poszukiwanie wszystkich parametrów ogromnie wydłuża obliczenia ze względu na dużą liczbę kombinacji. Procedurę tę upraszcza oddzielenie poszukiwań najlepszej orientacji od poszukiwań najlepszego położenia.

Tradycyjne metody podstawienia cząsteczkowego opierają się na właściwościach funkcji Pattersona. Ważną cechą funkcji Pattersona jest to, iż można ją obliczyć bez informacji o fazach. Mapy Pattersona są mapami wektorowymi, przedstawiającymi odległości pomiędzy atomami w strukturze rzeczywistej jako wektory od początku układu współrzędnych do maksimum na mapie Pattersona.

Wektory na mapie Pattersona mogą być podzielone na dwie kategorie. Wektory wewnątrzcząsteczkowe (pomiędzy atomami tej samej cząsteczki) zależą tylko od orientacji cząsteczki, nie zależą natomiast od jej położenia w komórce elementarnej, z tego względu

mogą być wykorzystane do obliczenia funkcji rotacyjnej. Wektory międzycząsteczkowe (pomiędzy atomami sąsiednich cząsteczek) zależą zarówno od orientacji cząsteczki jak i od jej położenia, zatem jeśli właściwa orientacja zostanie ustalona w funkcji rotacyjnej, wektory międzycząsteczkowe mogą posłużyć do określenia właściwej translacji.

Funkcja rotacyjna jest oparta na rotacji funkcji Pattersona i określa zgodność mapy Pattersona docelowego białka z mapą Pattersona modelu fazowego. Celem poszukiwań jest znalezienie takiej rotacji przy której największa liczba pików obu map Pattersona pokryje się, czyli gdy funkcja rotacyjna przyjmie maksymalną wartość.

Zapis pierwszej funkcji rotacyjnej dla podstawienia cząsteczkowego jako całki iloczynu dwóch funkcji Pattersona zaproponowali Rossmann i Blow (Rossmann, 1962):

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P(\mathbf{u}) \cdot P_r(\mathbf{u}_r) d\mathbf{u}$$

gdzie  $U$  jest objętością mapy Pattersona, zajęta przez wektory wewnątrzcząsteczkowe, a funkcje Pattersona mogą być przedstawione jako szeregi Fouriera:

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})|^2 \exp[-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{u}]$$

$$P_r(\mathbf{u}_r) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}'} |F(\mathbf{h}')|^2 \exp[-2\pi i \mathbf{h}' \cdot \mathbf{u}_r]$$

gdzie:  $\mathbf{u}_r = [C]\mathbf{u}$

wektor  $\mathbf{h} = (h \ k \ l)$

wektor  $\mathbf{u} = (u \ v \ w)$

Ostatecznie funkcja rotacyjna przedstawia się wzorem:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \frac{U}{V^3} \sum_{\mathbf{h}} \sum_{\mathbf{h}'} |F(\mathbf{h})|^2 |F([\mathbf{C}]\mathbf{h}')|^2 \cdot G[-(\mathbf{h} + \mathbf{h}')] ]$$

$$G = \frac{3(\sin 2\pi x - 2\pi x \cos 2\pi x)}{(2\pi x)^3}$$

gdzie:

$\mathbf{x} = (\mathbf{h} + \mathbf{h}') \cdot \mathbf{r}$

$\alpha, \beta, \gamma$  – kąty Eulera

$P(u)$  – funkcja Pattersona badanej struktury

$P_r(u_r)$  - funkcja Pattersona modelu fazowego

$[C]$  – macierz rotacji

$F(h); F(h')$  – czynniki struktury odpowiednio badanej struktury i modelu fazowego

$U$  jest objętością sfery, o promieniu  $r$ ;  $U = (4\pi r^3) / 3$

Gdy właściwa orientacja modelu fazowego zostanie określona, należy znaleźć wektor translacji. Może to być wykonane na dwa sposoby, poprzez obliczenie funkcji translacyjnej lub też przez tzw. poszukiwanie translacji.

W metodzie pierwszej, do obliczenia funkcji translacyjnej wykorzystuje się wektory międzycząsteczkowe obecne na mapie Pattersona. Określenie prawidłowej translacji jest czasem bardziej skomplikowane niż określenie rotacji, ponieważ funkcja translacyjna cząsteczek poprawnie i niepoprawnie ułożonych różni się jedynie wektorami międzycząsteczkowymi. Wektory wewnątrzcząsteczkowe, które nie są zależne od położenia cząsteczki tworzą w tym przypadku duże tło.

Funkcja translacyjna szeroko stosowana w metodzie podstawienia cząsteczkowego przedstawia się wzorem:

$$T2(X) = \sum |F_{\text{obs}}(\mathbf{h})|_{\text{cross}}^2 2 \sum_i \sum_j F_{M_i} F_{M_j}^* e^{-2\pi i \mathbf{h} \cdot X}$$

Wewnątrzcząsteczkowe wektory powinny być odjęte z funkcji Pattersona obserwacji, by dać w przybliżeniu zbiór wektorów międzycząsteczkowych.

$$|F_{\text{calc}}(\mathbf{h})|_{\text{cross}}^2 = |F_{\text{calc}}(\mathbf{h})|^2 - k(F_{M_1}^2 + F_{M_2}^2)$$

$$|F_{\text{calc}}(\mathbf{h})|^2 = F_{\text{calc}}(\mathbf{h}) F_{\text{calc}}^*(\mathbf{h}) = (F_{M_1} + F_{M_2})(F_{M_1}^* + F_{M_2}^*)$$

gdzie:

$$X = x_1 - x_2$$

$x_1, x_2$  – położenie środków cząsteczek

$k$  – czynnik skali który sprowadza obserwowane i obliczone czynniki struktury do wspólnej skali

$F_{M_1}$  i  $F_{M_2}$  są czynniki struktury dwóch cząsteczek w punkcie  $\mathbf{h}$  przestrzeni odwrotnej, a  $F^*$  są ich liczbami sprzężonymi.

Dla cząsteczki, która została przesunięta o wektor  $x$  z pierwotnego położenia jedynie faza czynnika struktury zmienia się i  $F_{M_1}$  staje się  $F_{M_1} e^{2\pi i \mathbf{h} \cdot x}$ .

W metodzie tzw. poszukiwania translacji jako wskaźnik poprawnego położenia cząsteczki oblicza się czynnik  $R$  lub współczynnik korelacji  $C$ . Metodą prób i błędów przesuwa się model fazowy w części asymetrycznej i oblicza amplitudy czynników struktury modelu w nowym położeniu by porównać je z obserwowanymi amplitudami:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} \left( |F_{\text{obs}}|^2 - \overline{|F_{\text{obs}}|^2} \right) \cdot \left( |F_{\text{calc}}|^2 - \overline{|F_{\text{calc}}|^2} \right)}{\left[ \sum_{hkl} \left( |F_{\text{obs}}|^2 - \overline{|F_{\text{obs}}|^2} \right)^2 \sum_{hkl} \left( |F_{\text{calc}}|^2 - \overline{|F_{\text{calc}}|^2} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

$k$  we wzorze to czynnik skali wyrównujący obliczone i obserwowane czynniki do tego samego poziomu.

$R$  przyjmują najniższą wartość gdy położenie modelu jest najbardziej zbliżone do prawidłowego,  $C$  przyjmuje w takiej sytuacji najwyższą wartość.

## **Modyfikacja gęstości elektronowej**

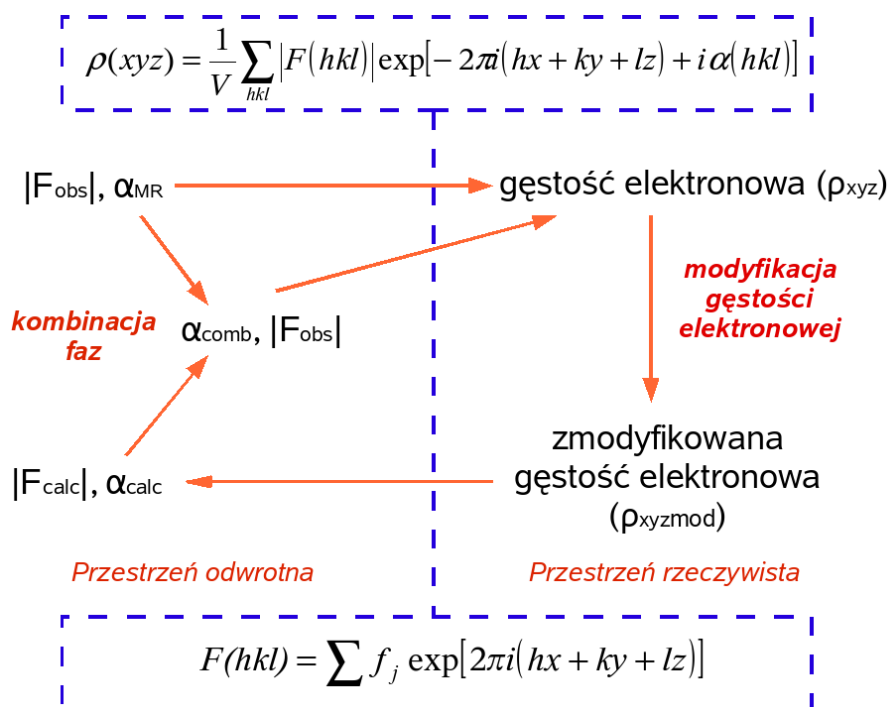
Pierwsza mapa gęstości elektronowej może być obliczona po uzyskaniu informacji fazowych w podstawieniu cząsteczkowym. Mapę tę tworzą obserwowane amplitudy czynników struktury oraz kąty fazowe będące jedynie przybliżeniem prawidłowych faz dla struktury białkowej. Często jakość takiej mapy jest niewystarczająca by jednoznacznie określić przebieg łańcucha polipeptydowego, a to zwiększa ryzyko wprowadzenia do modelu błędów, które będą trudne do usunięcia w trakcie udokładniania.

Procedura modyfikacji gęstości elektronowej (*density modification*) pozwala poprawić kąty fazowe, a co za tym idzie jakość mapy. Jedną z metod jest tzw. spłaszczenie obszaru rozpuszczalnika (*solvent flattening*). Z dobrze udokładnionych struktur wiadomo, że gęstość elektronowa w rejonie rozpuszczalnika pomiędzy cząsteczkami białka ma charakter płaski. Jest to związane z nieuporządkowanym, dynamicznym charakterem cząsteczek



rozpuszczalnika w tym rejonie. Najbardziej statyczne cząsteczki rozpuszczalnika znajdują się wewnątrz białka lub w postaci pojedynczej lub podwójnej warstwy na powierzchni cząsteczki białka.

Jeśli zidentyfikuje się obszar zajęty przez cząsteczki białka, wówczas szumy pochodzące z rejonu rozpuszczalnika mogą być usunięte poprzez sprowadzenie gęstości elektronowej w tym rejonie do niskiej stałej wartości. Obszar zajmowany przez białko może być wyznaczony na podstawie procentowej zawartości rozpuszczalnika przy założeniu, że jest ona o 5-10% niższa niż w rzeczywistości by nie utracić żadnych pików gęstości elektronowej pochodzących od białka. Metodę tą zaproponował Wang (1985). Spłaszczenie obszarów rozpuszczalnika daje zmodyfikowaną mapę, która służy do obliczenia zmodyfikowanych amplitud czynników struktury i kątów fazowych przy użyciu odwrotnej transformacji Fouriera. W następnym kroku obliczana jest nowa mapa gęstości elektronowej na podstawie obserwowanych amplitud czynników struktury oraz kątów fazowych pochodzących tylko z procedury spłaszczania obszaru rozpuszczalnika lub z połączenia tych faz z kątami fazowymi z podstawienia cząsteczkowego. Wybór zależy od jakości wyjściowych faz, zakresu rozdzielczości i zawartości rozpuszczalnika.



Rys. 11. Schemat modyfikacji gęstości elektronowej.

Podczas modyfikacji gęstości elektronowej można także wykorzystać obecność symetrii niekrystalograficznej. Gęstość elektronowa cząsteczek bądź podjednostek związanych symetrią niekrystalograficzną, jest w przybliżeniu równa, co nakłada pewne ograniczenia na białkowe czynniki struktury, a przez to i na kąty fazowe. Im więcej elementów związanych symetrią niekrystalograficzną znajduje się w części asymetrycznej tym lepszy efekt można uzyskać. Postępowanie jest podobne do opisanego wyżej: z uśrednionej mapy oblicza się kąty fazowe, które wraz z obserwowanymi amplitudami czynników struktury służą do otrzymania poprawionej mapy.

Dla lepszych wyników cykl modyfikacji gęstości elektronowej jest powtarzany wielokrotnie.

W niniejszej pracy w celu modyfikacji gęstości elektronowej skorzystano z programu DM z pakietu CCP4 (CCP4, 1994).

## **Udokładnianie modelu białkowego**

Wynikiem podstawienia cząsteczkowego jest przybliżony model struktury białkowej. Czynniki struktury obliczone na podstawie tego modelu są zwykle w słabej zgodności z obserwowanymi czynnikami struktury. Zgodność pomiędzy obliczonymi i obserwowanymi czynnikami struktury jest monitorowana poprzez wartość czynnika rozbieżności  $R$ . Dla modelu początkowego  $R$  przyjmuje zwykle wysoką wartość, teoretyczna wartość dla przypadkowej niecentrosymetrycznej struktury wynosi 59% (Wilson, 1950).

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

$k$  – czynnik skali potrzebny by umieścić  $F_{\text{calc}}$  w tej samej skali co  $F_{\text{obs}}$

Proces udokładniania polega na poprawianiu modelu atomowego tak by znaleźć bliższą zgodność pomiędzy obliczonymi i obserwowanymi czynnikami struktury. Dokonuje

się tego poprzez zmianę położenia oraz czynnika temperaturowego dla każdego atomu w strukturze.

Ze względu na zwykle dużą liczbę atomów w strukturze białkowej liczba koniecznych do udokładnienia parametrów jest bardzo wysoka w stosunku do liczby zmierzonych refleksów niezależnych. Z tego względu konieczne jest włączenie dodatkowych informacji do procesu udokładniania (Brünger, 1993). Po pierwsze są to stereochemiczne dane ustalone z wysoką dokładnością dla struktur związków małowcząsteczkowych, takich jak aminokwasy i małe polipeptydy, które przyjmuje się za obowiązujące także dla białek (Engh, 1991). Ponadto, ponieważ rozpuszczalnik wypełniający kanały pomiędzy cząsteczkami białka w kryształce jest nieuporządkowany przyjmuje się, iż gęstość elektronowa ma stałą wartość w tym obszarze. Dodatkowo, jeśli obecna jest symetria niekrystalograficzna, stanowić ona może istotne wsparcie podczas udokładniania narzucając równość na cząsteczki lub podjednostki związane symetrią niekrystalograficzną.

Wspomniane wyżej parametry stereochemiczne mogą być wykorzystane w procesie udokładniania na dwa sposoby:

- traktowane jako więzy sztywne (*constraints*) - wówczas jedynie kąty dwuścienne udokładnianego modelu mogą się zmieniać. Sposób ten efektywnie redukuje ilość parametrów do udokładniania.
- traktowane jako więzy miękkie (*restraints*) - długości wiązań, kąty walencyjne i kontakty van der Waalsa zmieniające się wokół standardowej wartości, w sposób kontrolowany przez odpowiednio dobrane wagi określające dopuszczalne odchylenie od wartości idealnych.

Techniki udokładniania modeli cząsteczkowych opierają się na metodach najmniejszych kwadratów i maksymalnej wiarygodności.

Istnieje wiele programów i procedur służących do udokładniania modelu białkowego. W niniejszej pracy posłużono się programem CNS 1.1 (Brunger, 1998), dysponującym wieloma technikami prowadzącymi do poprawy modelu białkowego. Poniżej opisano te wykorzystane w pracy.

Przed przystąpieniem do procesu udokładniania zbiór refleksów w formacie MTZ został przekształcony na plik tekstowy HKL czytelny dla programu CNS przy zastosowaniu programu MTZ2VARIABLES z pakietu CCP4.

Udokładnianie prowadzono dla całego zakresu rozdzielczości, ponieważ zastosowano poprawkę na obszar nieuporządkowanego rozpuszczalnika (*bulk solvent correction*). W przeciwnym razie należałoby wykluczyć z procesu udokładniania niskorozdzielcze dane

do rozdzielczości około 8 Å ponieważ niosą ze sobą dużo szumów pochodzących od obszarów zajętych przez rozpuszczalnik. Korekcja obszarów zajętych przez nieuporządkowany rozpuszczalnik polega na obliczeniu maski wokół cząsteczki białka na podstawie współrzędnych, region poza maską to obszar rozpuszczalnika.

### **Udokładnianie „brył sztywnych”**

Udokładnianie za pomocą „brył sztywnych” (*rigid-body refinement*) jest procesem, w którym udokładnia się położenie „sztywnych” grup atomów. Model białkowy jest traktowany jako grupa atomów lub zostaje podzielony na kilka takich grup. Dla każdej grupy udokładnia się sześć parametrów, trzy rotacyjne (określone przez kąty Eulera) i trzy translacyjne. Zmiana położenia jednej grupy oznacza przesunięcie dla wszystkich atomów w tej grupie.

Udokładnianie „brył sztywnych” jest zalecane jako pierwszy etap udokładniania modelu pochodzącego z podstawienia cząsteczkowego.

Podczas udokładniania modeli Pfk metodą „brył sztywnych” w programie CNS jako grupy atomów przyjmowano zwykle całe łańcuchy białkowe lub ich fragmenty w przypadku luki w modelu.

### **Udokładnianie przez symulowane wygrzewanie**

Procedura udokładniania modelu poprzez „symulowane wygrzewanie” (*simulated annealing* - „sa”) jest bardzo skuteczną techniką. Pozwala uniknąć osiągnięcia lokalnego minimum na rzecz globalnego minimum, co bywa trudne przy zastosowaniu tradycyjnych metod udokładniania metodą najmniejszych kwadratów. W metodzie „sa”, w sposób symulowany umieszcza się białko w wysokiej temperaturze, nadając atomom większą swobodę ruchów i pozwalając na zmianę konformacji modelu w szerokim zakresie.

Procedurę „sa” prowadzono w programie CNS, który wykorzystuje w tym celu dynamikę kątów torsyjnych. Dynamika kątów torsyjnych (*torsion angle dynamics*) redukuje liczbę udokładnianych parametrów i w ten sposób redukuje problem nadinterpretacji danych. Dla modeli początkowych stosowano temperaturę startową 5000 K. W dalszych etapach udokładniania temperaturę startową ograniczono do 1500 K. W każdym cyklu udokładniania temperaturę obniżano o 50 lub 100 K. Zarówno przed jak i po cyklach „sa” przeprowadzano procedurę minimalizacji energii.

### **Udokładnianie grupowych czynników temperatury**

Grupowe udokładnianie czynników temperaturowych (*B-group refinement*) jest wykorzystywane by ograniczyć liczbę obliczanych parametrów. Ma to szczególne znaczenie dla niskorozdzielczych struktur, gdy stosunek liczby parametrów do liczby refleksów niezależnych uniemożliwia obliczenie indywidualnych izotropowych czynników temperaturowych.

Podczas grupowego udokładniania czynników temperatury, dla każdej reszty aminokwasowej obliczane są dwie wartości czynników B, jedną dla atomów łańcucha głównego i drugą dla atomów łańcucha bocznego.

### **Udokładnianie w przestrzeni rzeczywistej**

W celu manualnej przebudowy modelu w przestrzeni rzeczywistej obliczano  $\sigma_A$ -ważone mapy  $2F_o-F_c$  i  $F_o-F_c$  z czynników struktury otrzymanych na podstawie aktualnego modelu białkowego. W przypadkach problematycznych korzystano z mapy sa-omit.

Do wizualizacji i przebudowy modeli Pfk posłużono się programem Xfit z pakietu XtalView (McRee, 1999) oraz Coot (Emsley, 2004).

### **Pozostałe programy użyte w pracy**

**LSQKAB** (Kabsch, 1976) z pakietu CCP4

Wykorzystano w celu wizualizacji różnic i podobieństw w budowie przestrzennej cząsteczek białkowych, a także do określenia translacji oraz macierzy rotacji pomiędzy poszczególnymi łańcuchami w części asymetrycznej.

Program LSQKAB z pakietu CCP4 służy do porównywania trójwymiarowych struktur zapisanych w postaci współrzędnych w formacie PDB. Jeden zbiór współrzędnych jest przesuwany tak by nakładał się na referencyjny zbiór współrzędnych. Środek ciężkości poruszającego się zbioru jest najpierw przesuwany na środek ciężkości nieruchomego zbioru i wówczas szukana jest macierz rotacji przy użyciu metody zasugerowanej przez Kabscha. Macierz rotacji jest zdefiniowana względem prostokątnego systemu współrzędnych.

- DSSP** Definition of Secondary Structure of Proteins (Kabsch,1983)  
Program został użyty w celu zdefiniowania elementów struktury drugorzędowej dla badanych enzymów na podstawie trójwymiarowych współrzędnych.
- Procheck** (Laskowski, 1993)  
Program posłużył do geometrycznej analizy struktury oraz kontroli poprawności stereochemicznej.
- ClustalW** (Thompson, 1994)  
W programie przeprowadzono porównanie dwóch lub większej liczby sekwencji w celu określenia stopnia identyczności i podobieństwa, oraz identyfikacji obszarów ewolucyjnie zachowanych.
- Pymol** (DeLano, 2002)  
Posłużył do wykonania ilustracji przedstawiających modele białkowe oraz mapy gęstości elektronowej z zastosowaniem różnych sposobów prezentacji łańcuchów polipeptydowych.

## Wyniki

## **12S Pfk z *Saccharomyces cerevisiae***

### **Preparatyka i oczyszczanie białka**

Enzym 12S Pfk został otrzymany w 2002 w pracowni kierowanej przez profesora Kopperschlägera na Uniwersytecie w Lipsku. Sposób przygotowania białka został opisany w publikacjach źródłowych cytowanych niżej oraz w rozprawie doktorskiej Ingrid Mechin. W niniejszej pracy nadmieniono jedynie przebieg preparatyki.

#### **Przygotowanie 21S Pfk**

Źródłem Pfk był rekombinowany szczep PS1 z *Saccharomyces cerevisiae* (*MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-519 pep4-3 gal2 cir<sup>+</sup>*) zawierający geny *PFK1* i *PFK2*. Enzym był oczyszczany w oparciu o metodę Hofmanna i Kopperschlägera (1982) z następującymi modyfikacjami:

- zamiast sonikacji, komórki drożdży zostały rozbite podczas 5 minutowego wytrząsania w Vibrogen Cell Mill, type Vi 4 (Bühler, Tübingen, Germany) w buforze zawierającym 50 mM fosforanu sodu, pH 7, 5 mM 2-merkaptioetanolu i 0,5 mM PMSF (Bufor A).
- pierwsze strącanie siarczanem amonu zastąpiono frakcjonowaniem przez wytrącanie z glikolem polietylenowym 6000 3,5% i 14% (w/v) PEG. Pierwszy osad został wyrzucony, drugi natomiast zawierał enzym i został rozpuszczony w Buforze A.
- w chromatografii powinowactwa, użyto Cibacron Blue F3G-A-Sephadex G 100, enzym został wymyty Buforem A z dodatkiem 5 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> zamiast siarczanu amonu.

#### **Przygotowanie 12S Pfk**

Ograniczoną proteolizę 21S Pfk przeprowadzono za pomocą  $\alpha$ -chymotrypsyny zgodnie z procedurą Bär'a (1988), z tą różnicą, że filtrację żelową zastąpiono przez chromatografię HPLC Resource Q column (powtórzoną dwukrotnie). Oczyszczona 12S Pfk wykazywała homogenność na żelu elektroforetycznym SDS-PAGE. Aktywność enzymu zmierzono przez zmieszanie 1,0 ml roztworu zawierającego 100 mM imidazolu/HCl pH 7,2, 3 mM Fru6-P, 0,6 mM ATP, 1 mM AMP, 5 mM siarczanu magnezu, 5 mM AS, 0,2 mM NADH i enzymów (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, izomeraza triozofosforanowa i aldolaza) z 20 ml roztworu białka. Stężenie NADH w 25 °C obserwowano przy fali o długości 340 nm: ubytek dwóch cząsteczek NADH odpowiadał utracie jednej cząsteczki Fru6-P.

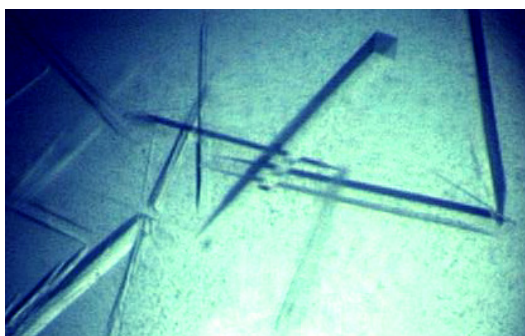


## Krystalizacja

Kryształy drożdżowego białka zostały otrzymane w 2002 roku, przez Ingrid Mechin, ówczesną doktorantkę Uniwersytetu w Lipsku. Krystalizację prowadzono metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli. Białko krystalizowało nad roztworem rezerwuarowym zawierającym: 6% PEG 4000, 0,2 M octan sodu i 0,1 M bufor MES o pH 6,5. Kropla zawierała 3  $\mu$ l roztworu białka o stężeniu 8 mg/ml z dodatkiem fruktozo-6-fosforanu i fruktozo-2,6-bisfosforanu oraz 3  $\mu$ l roztworu rezerwuarowego. Proces krystalizacji trwał od dwóch do trzech tygodni, a kryształy rosły w postaci zrośniętych igieł jak i pojedynczych, nadających się do pomiarów dyfrakcyjnych (Fot. 2).

**Tabela 1.** Warunki krystalizacji 12S Pfk z *S. cerevisiae*.

Metoda	dyfuzja par w układzie wiszącej kropli
Temperatura	4 °C
Stężenie białka	8 mg/ml
Bufor	0,1 M MES, pH 6,5
Czynnik strącający	0,2 M octan sodu, 6% PEG 4000
Dodatki	Fru6-P, Fru2,6-P <sub>2</sub>



**Fotografia 1.** Kryształy Pfk z *S. cerevisiae*.

## Pomiary dyfrakcyjne i obróbka danych

Pomiary dyfrakcyjne natywnego kryształu drożdżowego Pfk zostały przeprowadzone przez Ingrid Mechin i profesora Wojciecha Rypniewskiego w 2002 roku. Dane zarejestrowano na linii pomiarowej BW7B znajdującej się w ośrodku synchrotronowym DESY w Hamburgu (DORIS storage ring, EMBL / DESY, Hamburg), przy użyciu detektora MAR IP 300 mm i wiązki o długości fali 1,1044 Å. Ingrid Mechin indeksowała i integrowała obrazy dyfrakcyjne w programie DENZO (Otwinowski, 1997), natomiast skalowała w programie SCALEPACK (Otwinowski, 1997), otrzymując zbiór danych dyfrakcyjnych o zadowalającej statystyce (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parametry pomiaru dyfrakcyjnego oraz statystyka natywnego zbioru danych dyfrakcyjnych dla białka 12S Pfk z *S. cerevisiae*.

Wiązka (źródło promieniowania)	BW7B (EMBL/DESY, Hamburg)
Długość fali [Å]	1,1044
Temperatura pomiaru [K]	100
Grupa przestrzenna	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parametry komórki elementarnej [Å, °]	a=180,1 b=186,2 c=236,5 α=β=γ=90,00
Mozaikowość [°]	0,45
Zakres rozdzielczości [Å]	35 - 2.90 (2,95 - 2,90)
R <sub>sym</sub> [%]	7,3 (42,4)
<I/σ(I)>	15 (2)
Kompletność [%]	98,5 (98,0)
Liczba zmierzonych refleksów	689 963
Liczba refleksów niezależnych?	172 763
Krotność obserwacji	4,0

W nawiasach umieszczono dane dla ostatniego przedziału rozdzielczości.

<sup>§</sup>  $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , gdzie  $I_i(hkl)$  i  $\langle I(hkl) \rangle$  są odpowiednio obserwowaną indywidualną i średnią intensywnością refleksu o wskaźnikach  $hkl$ ,  $\sum_i$  jest sumą pomiarów  $i$  refleksów o wskaźnikach  $hkl$ ,  $\sum_{hk}$  jest sumą dla wszystkich refleksów.

## **Podstawienie cząsteczkowe**

Struktura 12S Pfk z *S. cerevisiae* (tu oznaczana skrótem – yeast-12S-Pfk) została rozwiązana przez Ingrid Mechin metodą podstawienia cząsteczkowego w dwóch etapach. W pierwszym etapie podstawienia cząsteczkowego jako modelu użyto biologicznego tetrameru *E. coli* w stanie R (Shirakihara, 1988; kod PDB: 1PFK). Obliczeń dokonano w programie AMoRe (Navaza, 1994; 2001) dla zakresu rozdzielczości od 15 do 4 Å. Posiłkując się analizą symetrii niekrystalograficznej (w programie RFCORR z pakietu CCP4) oraz upakowania w kryształach, znaleziono dwa prawidłowe rozwiązania, które razem odpowiadały tetramerowi  $\alpha'_2\beta'_2$  Pfk z formy 12S. Te dwa rozwiązania razem zostały użyte jako model podczas drugiego podstawienia cząsteczkowego otrzymując dwa prawidłowe rozwiązania odpowiadające dwóm drożdżowym tetramerom, lub inaczej czterem tetramerom bakteryjnym. Uzyskane rozwiązanie zostało porównane z modelem Pfk 21S uzyskanym metodą mikroskopii elektronowej (Ruiz, 2001) potwierdzając poprawność rozwiązania.

Ponieważ podstawienie cząsteczkowe przeprowadzono dla refleksów w przedziale rozdzielczości 15,0 – 4,0 Å, brakowało informacji fazowych dla pozostałego zakresu rozdzielczości. Fazy zostały rozszerzone przy użyciu programu DM (Cowtan, 1994) dla eksperymentalnych amplitud czynników struktury w przedziale rozdzielczości 35,0 - 2,9 Å.

## **Udokładnianie struktury**

Pierwszą fazę udokładniania wykonała Ingrid Mechin. W programie TURBO-FRODO (Roussel, 1991) dokonała przebudowy modelu pochodzącego z podstawienia cząsteczkowego. W pierwszej kolejności dokonała ręcznego wpasowania fragmentów struktury drugorzędowej łańcuchów białka z *E. coli* w mapę gęstości elektronowej uśrednioną w programie DM. Analiza mapy pozwoliła na przypisanie jej do łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$ . Reszty aminokwasowe były uważnie „mutowane” i wpasowywane w mapę, pewne partie modelu zostały usunięte, inne dobudowane. Model udokładniano używając programu CNS (Brunger, 1998), wykorzystując opcję NCS z silnymi więzami oraz poprawkę na obszar nieuporządkowanego rozpuszczalnika (*bulk solvent corrections*). Czynniki temperaturowe udokładniano grupowo tzn. dla każdej reszty obliczano jeden czynnik B dla atomów łańcucha

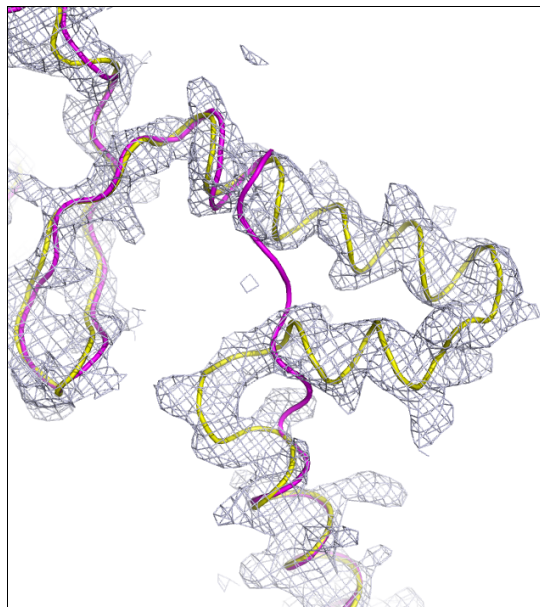
głównego oraz jeden czynnik B dla atomów łańcucha bocznego. Model końcowy zbudowany przez Ingrid Mechin zawierał 4858 reszt aminokwasowych oraz 16 cząsteczek substratu Fru6-P, jego statystykę umieszczono w Tabeli 3.

**Tabela 3.** Statystyka modelu sporządzonego przez Ingrid Mechin.

Liczba reszt aminokwasowych	4858
Liczba cząsteczek ligandów	16 cząsteczek Fru6-P
R / R <sub>free</sub>	0,319 / 0,364
FOM	0,682

Moja praca nad modelem fosfofruktokinazy drożdżowej rozpoczęła się od wyżej opisanego modelu. Początkowo proces udokładniania prowadzony był przeze mnie przy pomocy dwóch programów, Refmac5 (Murshudov, 1997) oraz CNS 1.1. Lepsze wyniki oraz opcje bardzo przydatne podczas udokładniania stosunkowo niskorozdzielczych danych, zdecydowały o stosowaniu w dalszych obliczeniach wyłącznie programiu CNS. Ze względu na duże rozmiary cząsteczki Pfk proces udokładniania należało prowadzić bardzo uważnie. Wraz z dobudowywaniem kolejnych reszt aminokwasowych zmniejszał się stosunek liczby refleksów do ilości udokładnianych parametrów. Finalny model Pfk zawiera 46605 atomów, gdyby dla każdego atomu udokładniać cztery parametry, tj. współrzędne x, y, z oraz indywidualne izotropowe czynniki temperaturowe, wówczas liczba koniecznych do obliczenia parametrów wyniosłaby 186420. Przy 172763 niezależnych refleksach taka ilość udokładnianych parametrów jest niedopuszczalna, gdy stosunek obserwacji do parametrów staje się mniejszy od 1 niemożliwy jest prawidłowy przebieg udokładniania. Dlatego wskazane było ograniczenie liczby optymalizowanych parametrów oraz niejednoczesne ich udokładnianie. Proces udokładniania był za każdym razem prowadzony w trzech etapach. Po pierwsze korzystano z procedury tzw. symulowanego wygrzewania z korekcją dla początkowych czynników B oraz rozpuszczalnika, po czym prowadzono grupowe udokładnianie czynników temperaturowych, a następnie minimalizację energii i optymalizację współrzędnych atomowych. Początkowo narzucano silne więzy NCS, w kolejnych etapach coraz słabsze tak by zachować akceptowalne różnice pomiędzy czynnikiem R i R<sub>free</sub>. Proces obliczeniowy był przeprowadzany na przemian z manualną przebudową modelu w oparciu o ważone mapy gęstości elektronowej 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> oraz F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>. Początkowo stosowano w tym celu program TURBO-FRODO, następnie Xfit z pakietu XtalView (McRee, 1999), a na końcowym etapie Coot (Emsley, 2004).

Wyjściowy model, tj. model przygotowany przez Ingrid Mechin został przearanżowany oraz rozbudowany, przykład wprowadzonych zmian może obrazować rysunek 12.



**Rys. 12.** Nałożenie modelu końcowego Ingrid Mechin (kolor różowy), na opracowany przeze mnie model yeast-12S-Pfk (kolor żółty) w ważonej mapie gęstości elektronowej  $2F_o-F_c$ .

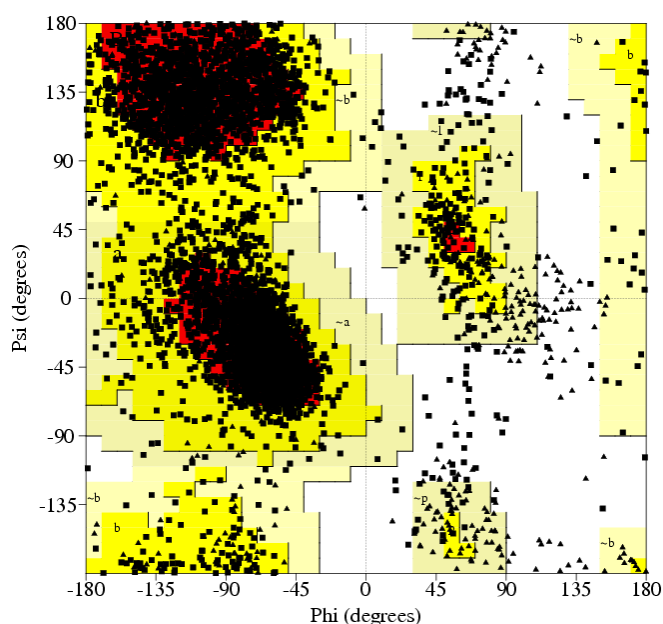
Statystyka modelu końcowego została umieszczona w Tabeli 4. Ze względu na niską rozdzielczość nie wmodelowano żadnej cząsteczki rozpuszczalnika.

**Tabela 4.** Statystyka procesu udokładniania modelu yeast-12S-Pfk.

Użyty program	CNS 1.1
Zakres rozdzielczości	35,0 - 2,9
Liczba refleksów niezależnych	172 763
Liczba reszt aminokwasowych	6068
Liczba cząsteczek ligandów	8 cząsteczek Fru6-P 8 cząsteczek Fru2,6-P <sub>2</sub>
Liczba atomów białka	46310
Liczba atomów ligandów	288
R / R <sub>free</sub>	0,24 / 0,31
FOM	0,73

## Analiza jakości modelu

Udokładniony model yeast-12S-Pfk posiada dobrą geometrię, co potwierdziła analiza w programie PROCHECK (Laskowski, 1993). Wykres Ramachandrana (Ramachandran, 1963) pokazuje, że 79,0% reszt aminokwasowych znajduje się w konformacji uprzywilejowanej, podczas gdy dla tej rozdzielczości typowa wartość to 68,7% jak podaje program PROCHECK.



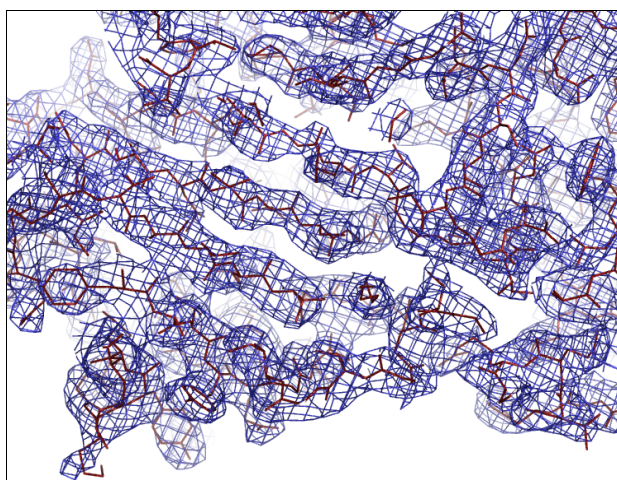
Reszty aminokwasowe na wykresie Ramachandrana	yeast-12S-Pfk	
	liczba	%
- w konformacjach uprzywilejowanych	4181	79,0
- w konformacjach dozwolonych	917	17,3
- w konformacjach względnie dozwolonych	125	2,4
- w konformacjach niedozwolonych	69	1,3
Liczba reszt aminokwasowych z wyłączeniem glicyny i proliny	5292	100,0
Liczba wszystkich reszt aminokwasowych w modelu	6068	

**Rys. 13.** Wykres Ramachandrana przedstawia wartości kątów dwuściennych  $\psi$  i  $\phi$  łańcucha głównego. Reszty aminokwasowe z wyjątkiem glicyny i proliny oznaczono za pomocą kwadratu, reszty glicynowe za pomocą trójkąta, a proliny nie zostały umieszczone na wykresie. Reszty aminokwasowe zlokalizowane w niedozwolonym regionie zaznaczono kolorem czerwonym.

Wartości średniego kwadratowego odchylenia (rmsd, *root-mean-square deviation*) od idealnych długości wiązań oraz kątów, potwierdzają dobrą geometrię modelu i wynoszą odpowiednio 0,008 Å i 1,404°.

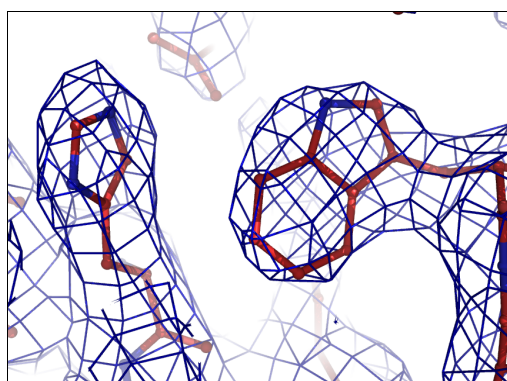
## Mapy gęstości elektronowej

Ważona mapa  $2F_o-F_c$  dla modelu yeast-12S-Pfk jest dobrej jakości, biorąc pod uwagę niską rozdzielczość 2,9 Å. Dla większości aminokwasowych łańcuchów głównych, gęstość elektronowa jest dobrze widoczna przy  $1\sigma$ , rozkłada się w sposób ciągły wytyczający kształt łańcucha białkowego. Jakość mapy pozwoliła na wmodelowanie spodziewanej długości łańcuchów polipeptydowych, nie jest jednak tak samo wyraźna dla poszczególnych fragmentów w analogicznych łańcuchach.



**Rys. 14.** Przykład ważonej mapy gęstości elektronowej  $2F_o-F_c$ , kontur  $1\sigma$ .

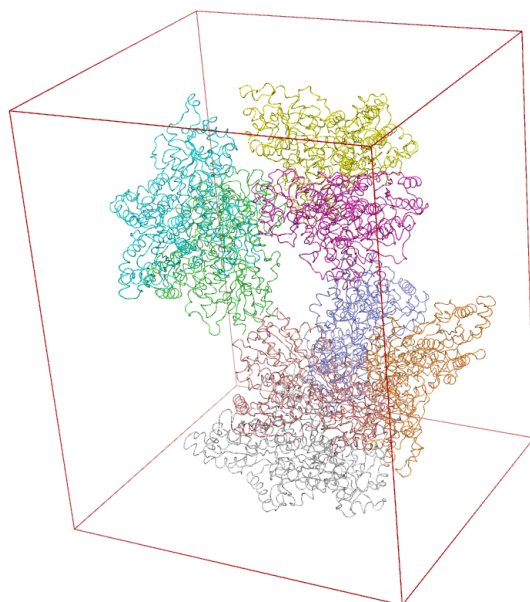
Gęstość elektronowa dla większości aminokwasowych łańcuchów bocznych zawierających pierścienie, tj.: tryptofanu, tyrozyny, fenyloalaniny i histydyny, jest dobrze zdefiniowana potwierdzając prawidłowe wmodelowanie sekwencji (Rys.15). Przy czym istnieje także duża ilość nieuporządkowanych łańcuchów bocznych, nieposiadających mapy gęstości elektronowej bądź jedynie mapę szcztątkową.



**Rys. 15.** Mapa gęstości elektronowej dla pierścieniowych łańcuchów bocznych.

## **Asymetryczna część komórki elementarnej**

Komórka elementarna kryształu yeast-12S-Pfk złożona jest z 4 asymetrycznych części wynikających z obecności trzech dwukrotnych osi śrubowych (grupa przestrzenna  $P2_12_12_1$ ). W niezależnej części komórki elementarnej znajduje się 8 łańcuchów białkowych, 4 łańcuchy  $\alpha''$  i 4 łańcuchy  $\beta'$ , co odpowiada 2 tetramerom formy 12S (produkt proteolizy natywnej Pfk o współczynniku sedymentacji 21S). Podjednostki  $\alpha''$  zostały oznaczone w strukturze jako łańcuchy A, C, E, G, podjednostki  $\beta'$  jako łańcuchy B, D, F, oraz H. Dwa tetramery 12S są ułożone w części asymetrycznej w sposób przypominający natywne heterooktamer 21S i oddziałują ze sobą poprzez kontakt między łańcuchami A i E oraz C i G.



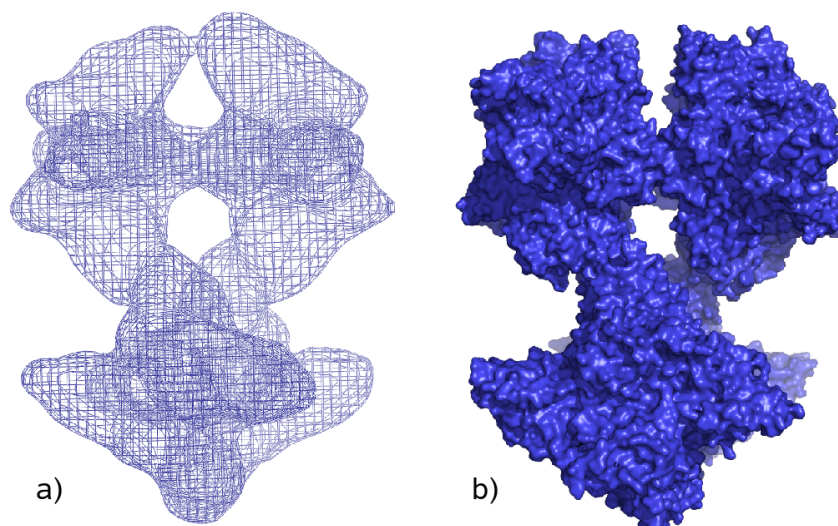
**Rys. 16.** Zawartość asymetrycznej części komórki elementarnej struktury yeast-12S-Pfk (dwa tetramery 12S Pfk). Krawędzie przedstawiają komórkę elementarną.

## **Struktura czwartorzędowa Pfk z *Saccharomyces cerevisiae***

Forma 12S drożdżowej fosfofruktokinazy występuje w roztworze w postaci tetramerycznej. Struktura krystaliczna yeast-12S-Pfk w części asymetrycznej zawiera dwa



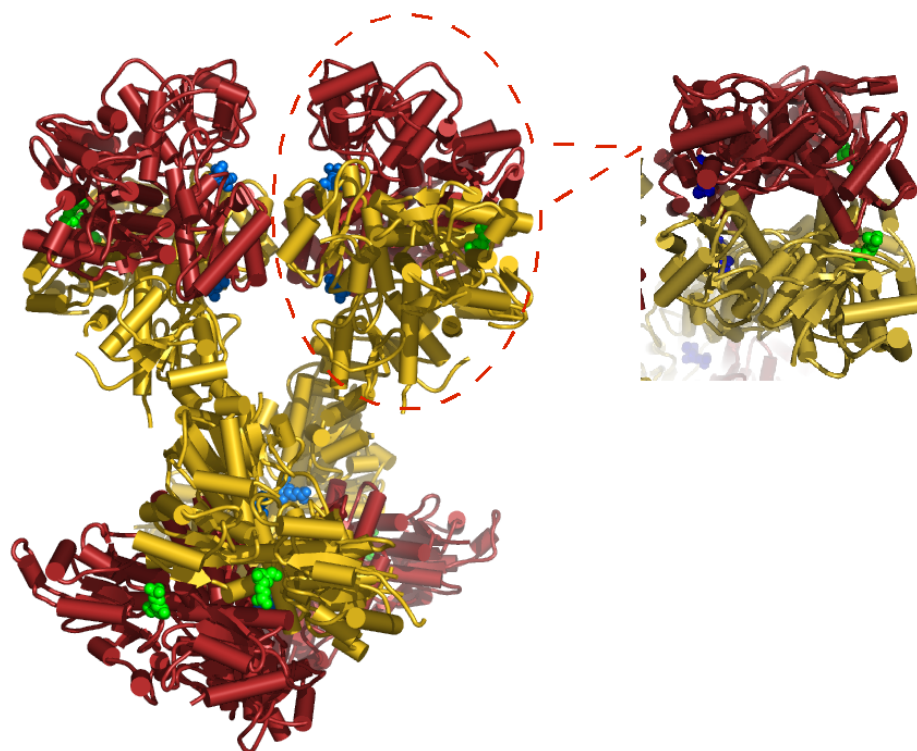
tetramery 12S, które oddziałują w sposób przypominający natywny heterooktamer 21S. Można to zauważyć porównując model krystalograficzny z obrazem mikroskopii elektronowej (Ruiz, 2003; Ruiz, 2007) (Rys.17).



**Rys. 17.** a) model Pfk 21S otrzymany techniką mikroskopii elektronowej, przedstawiony w postaci siatki; b) struktura krystalograficzna (dwa tetramery Pfk 12S) zaprezentowana jako powierzchnia van der Waalsa.

Tetramer górny i dolny są skrócone w stosunku do siebie pod kątem około  $75^\circ$  (co zaobserwowano już w badaniach cryo-EM) (Rys.17). Oba tetramery oddziałują ze sobą poprzez podjednostki  $\alpha''$ , które tworzą rdzeń cząsteczki, podjednostki  $\beta'$  są natomiast zlokalizowane na zewnątrz cząsteczki, a ich oddziaływania nie mają wpływu na tworzenie struktury oktamerycznej (Rys.18).

Podjednostki  $\alpha''$  i  $\beta'$  oddziałują ze sobą w charakterystyczny sposób tworząc dimery. Dimer  $\alpha''/\beta'$  ma kształt globularny z cylindrycznym kanałem biegnącym pomiędzy podjednostkami. Podjednostki w dimerze są ułożone tak, iż N-terminalna część jednej z podjednostek oddziałuje z N-terminalną częścią drugiej podjednostki, a część C-terminalna tej pierwszej podjednostki z C-terminalną częścią drugiej podjednostki. Cząsteczka Pfk zbudowana jest z czterech takich dimerów  $\alpha''/\beta'$ , stworzonych przez łańcuchy AB, CD, EF oraz GH. Dimery AB i CD tworzą górny tetramer, dimery EF oraz GH - tetramer dolny.



**Rys. 18.** Heterooktamer drożdżowy z zaznaczonymi elementami struktury drugorzędowej oraz dimer AB z innej perspektywy. Podjednostki  $\alpha'$  zaznaczono na kolor żółty, podjednostki  $\beta'$  na kolor bordowy. Kolor zielony – substrat w miejscu katalitycznym, kolor niebieski aktywator w miejscu efektorowym.

Porównanie drożdżowych dimerów wskazuje na większe różnice pomiędzy dimerami pochodzącymi z dwóch tetramerów, niż pomiędzy dimerami tworzącymi ten sam tetramer (Tabela 5). Różnice są jednak na tyle małe by uznawać dimery i tetramery za ekwiwalentne.

**Tabela 5.** Różnice pomiędzy dimerami w yeast-12S-Pfk wyrażone poprzez wartości rmsd.

	Rmsd XYZ [Å]	Maksymalne odchylenie XYZ	Liczba porównywanych atomów C $\alpha$
<b>dimer AB /dimer CD</b>	0,541	1,279	1236
<b>dimer EF / dimer GH</b>	0,492	1,156	1242
<b>dimer AB / dimer EF</b>	0,709	1,677	1280
<b>dimer AB/ dimer GH</b>	0,704	1,663	1278

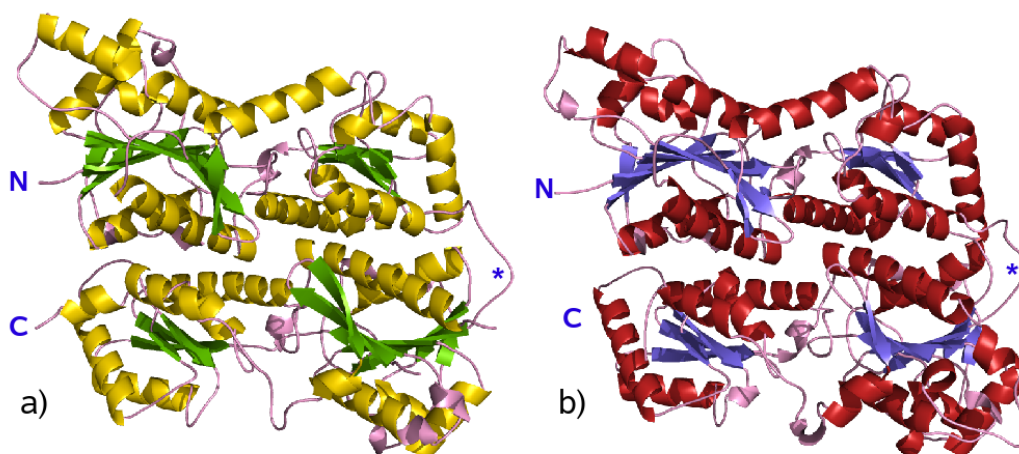
Wzdłuż dłuższej osi oktameru przez całą długość cząsteczki biegnie kanał o średnicy około 18 Å. Przypuszczalnie może on być wynikiem oktameryzacji i ułatwiać dostęp cząsteczkom ligandu do kieszeni efektorowych.

## Struktura drugorzędowa

Podjednostka enzymu eukariotycznego powstała na skutek duplikacji i fuzji genu bakteryjnego, w konsekwencji w jej strukturze widoczny jest dwukrotnie powtórzony motyw pofałdowania odpowiadający strukturą podjednostce bakteryjnej. Drożdżowa podjednostka składa się zatem z dwóch domen, N- i C-terminalnej, nazywanych także połówkami, z których każda zawiera bakteryjny motyw strukturalny. Taka aranżacja dotyczy obu typów podjednostek,  $\alpha''$  i  $\beta'$ .

Każda z domen drożdżowej podjednostki dzieli się na dwie subdomeny, mniejszą i większą. Mniejsza subdomena składa się z arkusza  $\beta$  złożonego z 4 równoległych łańcuchów  $\beta$  otoczonych 5 helisami  $\alpha$ . Większa subdomena składa się z arkusza  $\beta$ , złożonego z 7 łańcuchów  $\beta$ , 5 wewnętrznych jest równoległych, dwa zewnętrzne są antyrównoległe. Arkusz  $\beta$  w większej subdomenie jest także otoczony przez helisy  $\alpha$ . W strukturze obecnych jest także kilka pojedynczych skrętów helisy  $3_{10}$ .

N- i C-terminalne domeny drożdżowej podjednostki połączone są ze sobą poprzez długą pętlę złożoną z 14 reszt aminokwasowych. Pętla ta łączy helisę  $\alpha$  subdomeny mniejszej w N-terminalnej połowce z łańcuchem  $\beta$  subdomeny większej w C-terminalnej połowce (Rys.19).



**Rys. 19.** Podjednostki enzymu drożdżowego z zaznaczonymi elementami struktury drugorzędowej, a)  $\alpha''$ ; b)  $\beta'$ . Literami oznaczono N- i C-koniec, gwiazdką pętlę łączące połówki podjednostki.

Porównanie drożdżowych podjednostek wykazało, iż podobieństwo sekwencyjne oraz konformacyjne jest większe pomiędzy ekwiwalentnymi domenami podjednostki  $\alpha''$  i  $\beta'$ , niż pomiędzy N- i C-terminalnymi domenami w obrębie tej samej podjednostki (Tabela 6).

**Tabela 6.** Stopień identyczności oraz podobieństwa sekwencyjnego podjednostek  $\alpha''$  i  $\beta'$ , a także wartości rmsd na przykładzie łańcuchów A i B.

	Identyczność[%]	Podobieństwo[%]	Rmsd XYZ[Å]	Max XYZ	Liczba at.C $\alpha$
$\alpha''$ / $\beta'$	47,5	63,4	1,026	2,615	666
$\alpha''$ N-ter / $\beta'$ N-ter	49,0	65,7	0,924	2,452	330
$\alpha''$ C-ter / $\beta'$ C-ter	45,3	60,2	1,065	2,614	335
$\alpha''$ N-ter / $\alpha''$ C-ter	17,4	29,9	1,659	4,356	307
$\beta'$ N-ter / $\beta'$ C-ter	17,3	30,9	1,705	4,461	308

## Łańcuch $\alpha''$ i $\beta'$ - efekt proteolizy

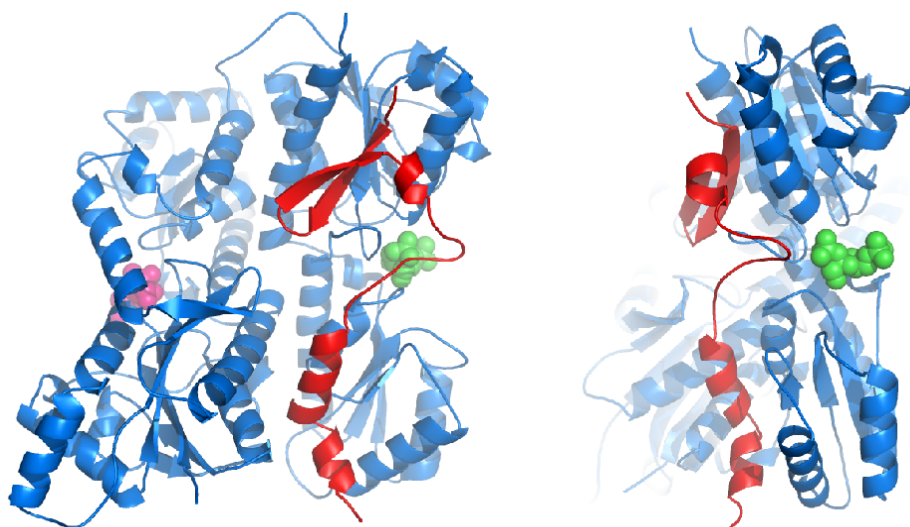
W mapę gęstości elektronowej należąca do łańcuchów  $\alpha''$  wmodelowano reszty aminokwasowe od reszty 205 do 893 oraz 920 do 980 zgodnie z sekwencją (Rys.20) (w łańcuchu C wmodelowano ponadto resztę 204, w łańcuchu E reszty 203-204, natomiast w łańcuchu G jakoś mapy pozwoliła na wmodelowanie sekwencji do reszty 977).

MQSQDSCYGV	AFRSIITNDE	ALFKKTIHFY	HTLGFATVKD	FNKFKHGENS	LLSSGTSQDS	60
LREVLWLESFK	LSEVDASGFR	IPQQEATNKA	QSQGALLKIR	LVMSAPIDET	FDTNETATIT	120
YFSTDLNKIV	EKFPKQAEKL	SDTLVFLKDP	MGNNITFSGL	ANATDSAPTS	KDAFLEATSE	180
DEIISRASSD	ASDLLRQTLG	SSQK	KKKIAV	MTSGGDSPGM	NAAVRAVRT	240
VYEGYEGLLR	GGKYLKMAW	EDVRGWLSEG	GTLIGTARSM	EFRKREGRRQ	AAGNLISQGI	300
DALVVCGGDG	SLTGADLFRH	EWPSLVDELV	AEGRFTEKEEV	APYKNLSIVG	LVGSIDNDMS	360
GTDSTIGAYS	ALERICEMVD	YIDATAKSHS	RAFVVEVMGR	HCGWLALMAG	IATGADYIFI	420
PERAVPHGKW	QDELKEVCQR	HRSKGRRNNT	IIVAEGALDD	QLNPVTANDV	KDALIELGLD	480
TKVTILGHVQ	RGGTAVAHDR	WLATLQGVDA	VKAVLEFTPE	TPSPLIGILE	NKIIRMPLVE	540
SVKLTKSVAT	AIENKDFDKA	ISLRDTEFIE	LYENFLSTTV	KDDGSELLPV	SDRLNIGIVH	600
VGAPSAALNA	ATRAATLYCL	SHGHKPYAIM	NGFSGLIQTG	EVKELSWIDV	ENWHNLGGSE	660
IGTNRSVASE	DLGTIAYYFQ	KNKLDGLIIL	GGFEGFRSLK	QLRDGRTQHP	IFNIPMCLIP	720
ATVSNNVPGT	EYSLGVDTC	NALVNYTDDI	KQSASATRRR	VFVCEVQGGH	SGYIASFTGL	780
ITGAVSVYTP	EKKIDLASIR	EDITLLKENF	RHDKGENRNG	KLLVRNEQAS	SVYSTQLLAD	840
IISEASKGKF	GVRTAIPGHV	QQGGVPSSKD	RVTASRFVAVK	CIKFIEQWNK	KNEASPNTDA	900
KVLRFKFDTH	GEKVPTVEHE	DDSAVICVN	GSHVSFKPIA	NLWENETNVE	LRKGFVHWA	960
EYKIGDILS	GRLKLRAEVA	ALAAENK				987

**Rys. 20.** Sekwencja aminokwasowa natywnej podjednostki  $\alpha$ . Na niebiesko zaznaczono reszty aminokwasowe wmodelowane w gęstość elektronową yeast-12S-Pfk. Wiązanie pomiędzy resztami zaznaczonymi na czerwono ulega proteolitycznemu cięciu pod wpływem chymotrypsyny.

Z badań nad proteolitycznym działaniem  $\alpha$ -chymotrypsyny na podjednostkę  $\alpha$  wynika, iż enzym nie wiąże peptydowe pomiędzy Leu199 i Gly200 na N-końcu, podczas gdy miejsce cięcia łańcucha na C-końcu nie jest znane.

Mapa gęstości elektronowej wykazała przerwę w łańcuchu  $\alpha$  między resztami 893 i 920. Można przypuszczać, iż przynajmniej jedno z wiązań peptydowych pomiędzy tymi resztami zostało przecięte proteolitycznie, jednak nie nastąpiło oddysocjowanie części odciętej. Część reszt aminokwasowych w brakującym odcinku (pomiędzy resztami 893 i 920) może być także niewidoczna z powodu nieuporządkowania. Reszty aminokwasowe o numerach od 920 do 980 tworzą wolny C-koniec, zaznaczony na rysunku 21 kolorem czerwonym, z tego fragmentu łańcucha pochodzi Arg952 tworząca wiązania wodorowe z grupą fosforanową w pozycji 2 aktywatora Fru2,6-P<sub>2</sub>.



**Rys. 21.** Łańcuch  $\alpha$ , wolny C-koniec w kolorze czerwonym, Fru6-P kolor różowy, Fru2,6-P<sub>2</sub> w kolorze zielonym. Dwa rzuty.

W podjednostkach  $\beta'$  udało się wmodelować reszty aminokwasowe od 195 do 957, przy czym N-terminalne fragmenty łańcucha, do reszty 193, zostały odcięte przez działanie  $\alpha$ -chymotrypsyny (Rys.22).

MTVTTPFVNG	TSYCTVTAYS	VQSYKAAIDF	YTKFLSLENR	SSPDENSTLL	SNDSISLKIL	60
LRPDEKINKN	VEAHLKELNS	ITKTQDWRSH	ATQSLVFNTS	DILAVKDTLN	AMNAPLQGYF	120
TELFPMQLYT	LDPLGNVVG	TSTKNAVSTK	PTPPPAPPEAS	AESGLSSKVH	SYTDLAYRMK	180
TTDTYPSLPK	<b>PLNR</b> PQKAIA	VMTSGGDAPG	MNSNVRAIVR	SAIFKGCRAF	VVMEGYEGLV	240
RGGPEYIKEF	HWEDVRGWSA	EGGTNIGTAR	CMEFKKREGR	LLGAQHLEIA	GVDALIVCGG	300
DGSLTGADLF	RSEWPSLIEE	LLKTNRISNE	QYERMKHLNI	CGTVGSIDND	MSTTDATIGA	360
YSALDRICKA	IDYVEATANS	HSRAFVVEVM	GRNCGWLALL	AGIATSADYI	FIPEKPATSS	420
EWQDQMCDIV	SKHRSRGKRT	TIVVVAEGAI	AADLTPISPS	DVHKVLVDRL	GLDTRITTLG	480
HVQRGGTAVA	YDRILATLQG	LEAVNAVLES	TPDTPSPLIA	VNENKIVRKP	LMESVKLTKA	540
VAEAIQAKDF	KRAMSLRDTE	FIEHLNMFMA	INSADHNEPK	LPKDKRLKIA	IVNVGAPAGG	600
INSAVYSMAT	YCMSQGRPHY	AIYNGWSGLA	RHESVRSLNW	KDMLGWQSRG	GSEIGTNRVT	660
PEEADLGMIA	YYFQKYFDG	LIIVGGFEAF	ESLHQLERAR	ESYPAFRIPM	VLIPATLSNN	720
VPGTEYSLGS	DTALNALMEY	CDVVKQSASS	TRGRAFVDC	QGGNSGYLAT	YASLAVGAQV	780
SYVPEEGISL	EQLSEDI EYL	AQSFKAEGR	GRFGKLILKS	TNASKALSAT	KLAEVITAEA	840
DGRFDAKPAY	PGHVQQGLP	SPIDRTRATR	MAIKAVGFIK	DNQAAIAEAR	AAEENFNADD	900
KTISDTAAVV	GVKGSHVVYN	SIRQLYDYET	EVSMRMPKVI	HWQATRLIAD	HLVGRKRVD	959

Rys. 22. Sekwencja aminokwasowa natywnej podjednostki  $\beta$ . Na niebiesko zaznaczono reszty aminokwasowe wmodelowane w gęstość elektronową yeast-12S-Pfk. Wiązanie pomiędzy resztami zaznaczonymi na czerwono ulega proteolitycznemu cięciu pod wpływem chymotrypsyny.

## Podjednostka drożdżowa a bakteryjna

Bakteryjny motyw strukturalny został zachowany w białku drożdżowym w trakcie ewolucji. Podjednostka enzymu eukariotycznego w wyniku duplikacji genów jest dwa razy większa niż podjednostka bakteryjna, zawierając w sobie dwukrotnie powtórzony motyw bakteryjny.

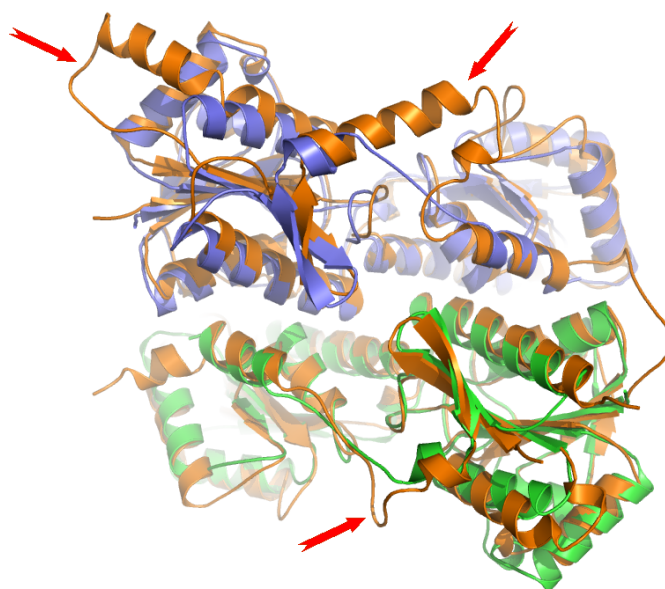
Sekwencja białka drożdżowego, w porównaniu z sekwencjami bakteryjnymi, których struktury zostały rozwiązane, wykazuje na większą zgodność z *B. stearothermophilus* niż *E. coli*, co przedstawia Tabela 7.

Tabela 7. Stopień identyczności oraz podobieństwa pomiędzy sekwencją Pfk z *S. cerevisiae*, a sekwencjami bakteryjnymi.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>		<i>B. stearothermophilus</i>	
	Identyczność[%]	Podobieństwo[%]	Identyczność[%]	Podobieństwo[%]
$\alpha$ N-terminalna połowa	12,7	22,8	24,0	33,7
$\alpha$ C-terminalna połowa	12,2	20,1	22,7	40,4
$\beta$ N-terminalna połowa	11,9	18,8	22,9	34,2
$\beta$ C-terminalna połowa	15,9	23,8	21,2	39,1

Z nałożenia dwóch łańcuchów bakteryjnych na podjednostkę drożdżową wynika, że najbardziej zauważalną różnicą pomiędzy pofałdowaniem łańcucha drożdżowego i bakteryjnego jest wielkość pętli bądź fragmentów helikalnych tworzonych przez łańcuch białkowy (Rys.23). Większe pętłe występują w drożdżowym łańcuchu  $\alpha'$  angażując reszty aminokwasowe: 322-345, 426-429, 458-464, 518-522, 544-567, 581-592, 707-712, 794-797, 812-818, 829-834, 847-850, 889-893 - pętla niekompletna (przerwa w łańcuchu) - 920-922, 944-954, natomiast w łańcuchu  $\beta'$  reszty: 242-245, 314-337, 418-421, 450-456, 511-515, 537-560, 574-585, 700-706, 804-812, 824-827, 841-844, 882-905, 928-937.

Należy pamiętać, że natywne łańcuchy drożdżowe  $\alpha$  i  $\beta$  posiadają dodatkowo około 200 reszt aminokwasowych na N-końcu.



**Rys. 23.** Nałożenie dwóch podjednostek bakteryjnych (kolor niebieski i zielony) (Schirmer, 1990; kod PDB: 6PFK) na podjednostkę drożdżową (kolor pomarańczowy). Strzałkami zaznaczono przykładowe różnice w pofałdowaniu łańcuchów.

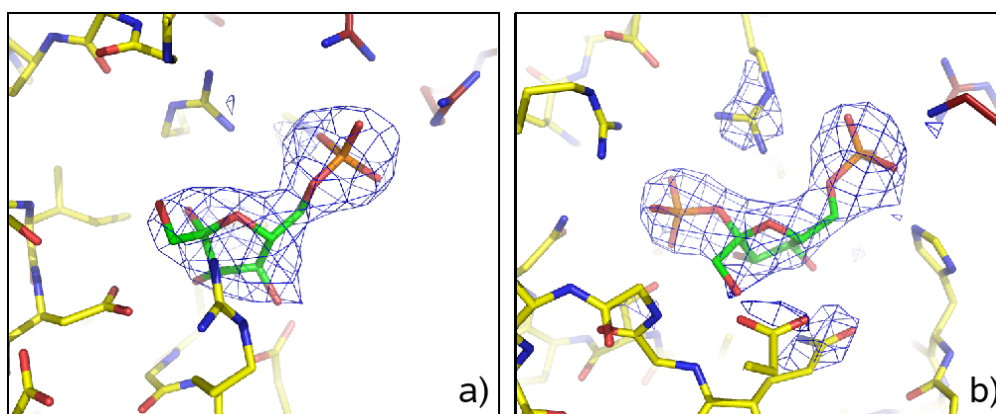
Bakteryjny tetramer pod względem aranżacji, rozmiaru i kształtu odpowiada dimerowi drożdżowemu. Nałożenie na siebie obu struktur powoduje, że 4 bakteryjne miejsca aktywne nakładają się na miejsca wiążące cukier w dimerze drożdżowym. Przy czym miejsca aktywne zlokalizowane pomiędzy jedną z par bakteryjnych łańcuchów wyznaczają położenie dwóch kieszeni katalitycznych dimeru drożdżowego, a pozostałe dwa centra aktywne pomiędzy drugą parą bakteryjnych monomerów nakładają się na efektorowe miejsca wiązania w dimerze drożdżowym. Efektorowe miejsca wiązania cukru, Fru2,6-P<sub>2</sub>, ewoluowały z miejsc katalitycznych bakteryjnego przodka.

## Ligandy związane w strukturze yeast-12S-Pfk

W strukturze yeast-12S-Pfk znaleziono 16 miejsc wiązania związków cukrowych. Na każdą podjednostkę przypadają dwa miejsca wiązania tego typu, miejsca aktywne w N-terminalnej domenie oraz cukrowe miejsce efektorowe w C-terminalnej domenie.

Ingrid Mechin w swej pracy stwierdziła, iż związało się 16 cząsteczek substratu fruktozo-6-fosforanu, który związał się zarówno w miejscach katalitycznych jak i efektorowych enzymu. Z moich badań wynika jednak, iż osiem cząsteczek fruktozo-6-fosforanu związało się w centrach aktywnych ośmiu łańcuchów białkowych, natomiast pozostałe osiem cząsteczek to fruktozo-2,6-bisfosforan związany w miejscach efektorowych. Przepuszczalnie rozbieżność ta wynika z kompletności modelu, który posiadała Ingrid Mechin. W trakcie rozbudowy modelu, gdy zwiększa się jego kompletność i dopasowanie do danych eksperymentalnych, w sposób widoczny poprawia się jakość mapy gęstości elektronowej, pozwalając na wykrycie nowych szczegółów modelu.

Na rysunku 24 pokazano mapę omit-composit, w miejscach wiązania związków cukrowych. Rysunek 24-a) przedstawia mapę w miejscu aktywnym, czyli w N-terminalnej domenie, odpowiadającą kształtem substratowi Fru6-P. Rysunek 24-b) pokazuje mapę pochodzącą z miejsca efektorowego, zlokalizowanego w C-terminalnej domenie. Kształt mapy omit-composit wyraźnie wskazuje na obecność dwóch grup fosforowych charakterystycznych dla aktywatora, Fru2,6-P<sub>2</sub>.

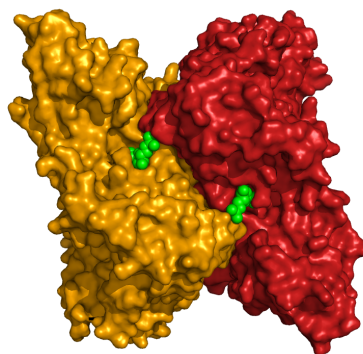


**Rys. 24.** Mapa omit-composit, kontur  $1,5 \sigma$ , na przykładzie podjednostki  $\alpha$  (łańcuch E). a) Fru6-P w domenie N-terminalnej; b) Fru2,6-P<sub>2</sub> w domenie C-terminalnej.



## Centrum aktywne

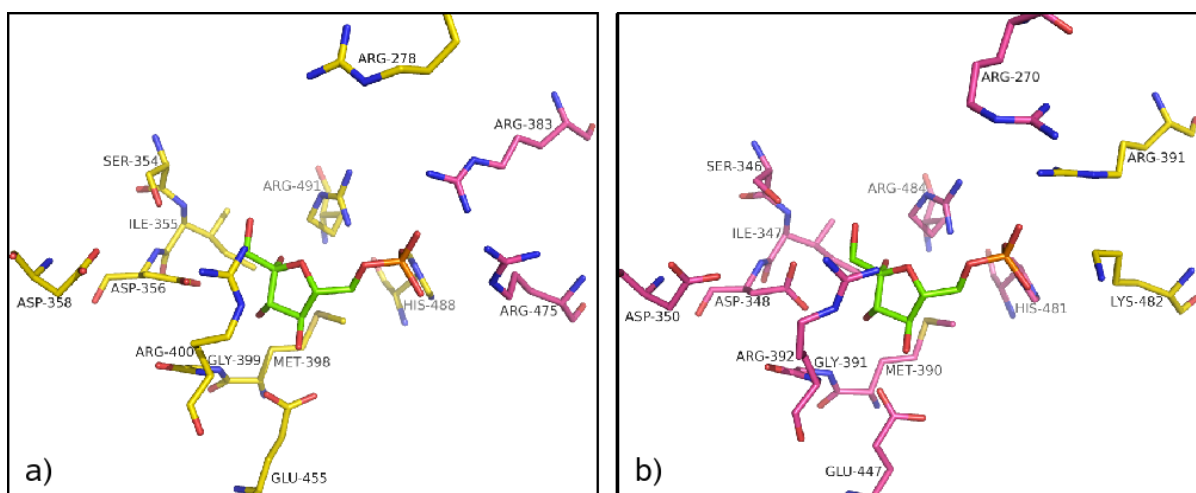
Miejsce katalityczne drożdżowej Pfk znajduje się w zagłębieniu pomiędzy subdomenami N-terminalnej domeny, w obu typach podjednostek. Ponieważ podjednostki tworzące dimer oddziałują ze sobą w taki sposób, że N-terminalna domena jednej podjednostki styka się z N-terminalną domeną podjednostki sąsiedniej, dlatego na powierzchni kontaktu podjednostek, w bliskim sąsiedztwie znajdują się dwa miejsca katalityczne, jedno należące do podjednostki  $\alpha$ , drugie do podjednostki  $\beta$  (Rys.25). W dalszej konsekwencji powoduje to, iż miejsca katalityczne zlokalizowane są w zewnętrznych partiach oktamerycznej cząsteczki (Rys.18).



**Rys. 25.** Dimer enzymu drożdżowego (przedstawiony jako powierzchnia van der Waalsa), kolorem zielonym zaznaczono Fru6-P w miejscach aktywnych.

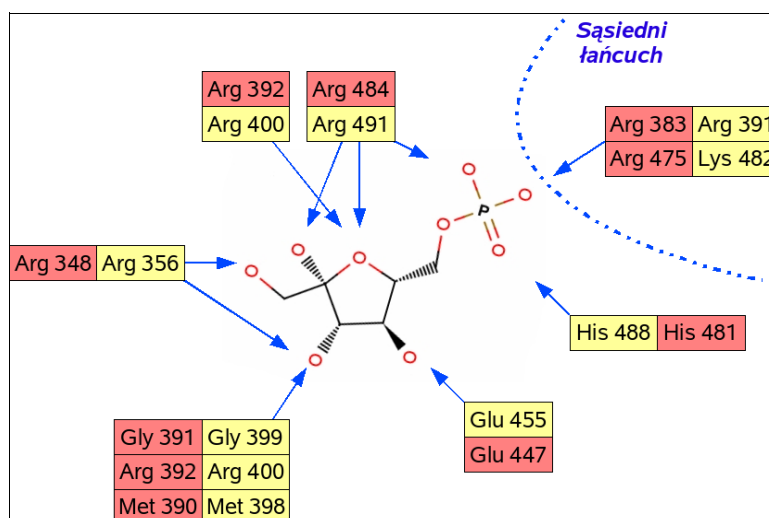
Jak wspomniano wcześniej, w strukturze yeast-12-Pfk znaleziono 8 cząsteczek substratu fruktozo-6-fosforanu. Cząsteczkę Fru6-P znaleziono w centrum aktywnym każdego z łańcuchów.

Kieszon wiążąca Fru6-P ma kształt ściśle dopasowany do substratu, duża liczba arginin oraz innych reszt bogatych w azot stabilizuje Fru6-P. Kieszon jest usytuowana w taki sposób, że ligand oddziałuje także z dwiema resztami należącymi do sąsiedniego łańcucha (Rys.26).



**Rys. 26.** Miejsca aktywne ze związanym Fru6-P, a) w podjednostce  $\alpha$ , łańcuch E, b) w podjednostce  $\beta$ , łańcuch F. Podjednostka  $\alpha$  - kolor żółty, podjednostka  $\beta$  - kolor różowy, Fru6-P - kolor zielony.

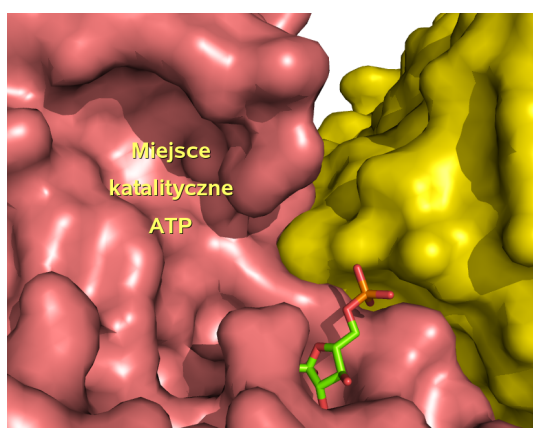
Na rysunku powyżej przedstawiono miejsca wiązania Fru6-P w podjednostkach  $\alpha$  i  $\beta$  na przykładzie dimeru EF. Nie w każdym z 8 łańcuchów białkowych mapa gęstości elektronowej przedstawionych reszt jest dobrze widoczna. Jakość mapy, przy tej rozdzielczości, częstokroć uniemożliwia dokładne określenie położenia atomów, a w konsekwencji jednoznaczne zdefiniowanie wiązań wodorowych. Dlatego poniżej zamieszczono jedynie prosty schemat prezentujący reszty odpowiedzialne za stabilizację poszczególnych fragmentów związku cukrowego (Rys.27).



**Rys. 27.** Reszty aminokwasowe uwikłane w wiązanie Fru6-P w łańcuchu  $\alpha$  i  $\beta$ .

Najważniejsze reszty odpowiedzialne za wiązanie cukru w centrum aktywnym zostały zachowane w obu łańcuchach, z wyjątkiem Arg475 pochodzącej z łańcucha  $\beta$ , którą zastępuje Lys482 w łańcuchu  $\alpha$ .

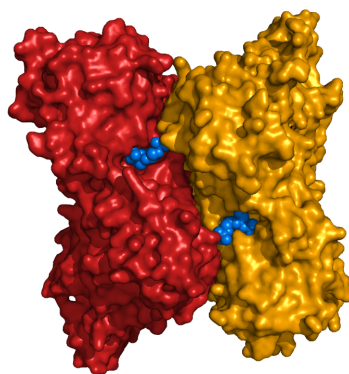
Ponieważ ATP nie znajdował się w roztworze krystalizacyjnym, dlatego druga część miejsca aktywnego jest pusta, nie można więc obserwować sposobu wiązania się drugiego substratu w centrum aktywnym. Można natomiast ocenić lokalizację i kształt kieszeni katalitycznej ATP. Związany tu nukleotyd oddziaływałby tylko z resztami jednej podjednostki (Rys.28).



**Rys. 28.** Miejsce aktywne przedstawione jako powierzchnia van der Waalsa, z zaznaczonym miejsce wiązania ATP, podjednostka  $\beta$  - kolor różowy, podjednostka  $\alpha$  - kolor żółty.

### **Fruktozo-2,6-bisfosforan w miejscu efektorowym**

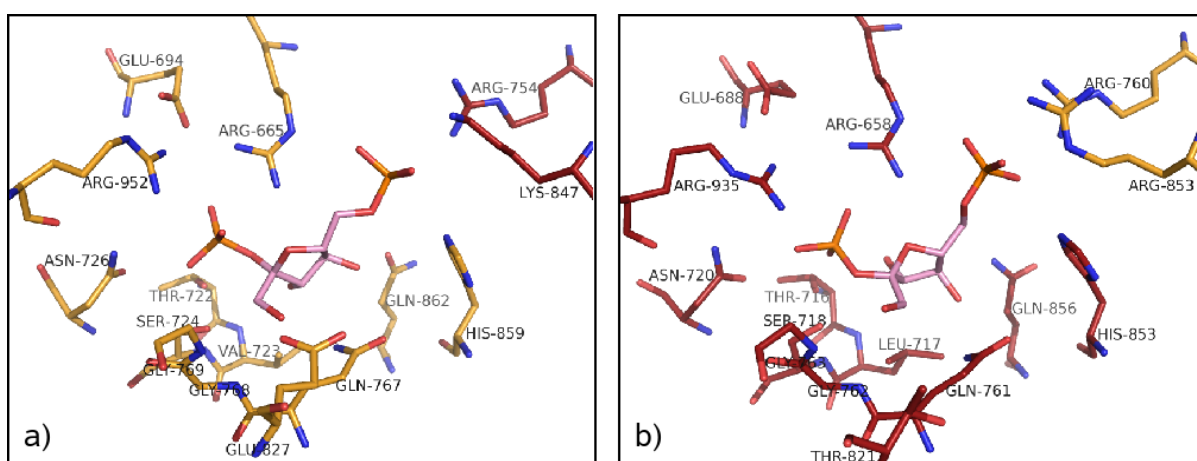
Miejsce efektorowe wiążące najsilniejszy aktywator eukariotycznej fosfofruktokinazy, fruktozo-2,6-bisfosforan, znajduje się w kieszeni pomiędzy subdomenami C-terminalnej domeny w obu typach podjednostek. W oktamerycznym enzymie znajduje się 8 takich miejsc efektorowych. Każde z nich, w strukturze yeast-12-Pfk, związało cząsteczkę aktywatora. Ponieważ C-terminalne domeny podjednostek tworzących dimer stykają się ze sobą, cukrowe miejsca efektorowe znajdują się blisko siebie, a w kontekście cząsteczki oktamerycznej, zlokalizowane są od strony wewnętrznego kanału biegnącego wzdłuż dłuższej osi oktameru (Rys.29).



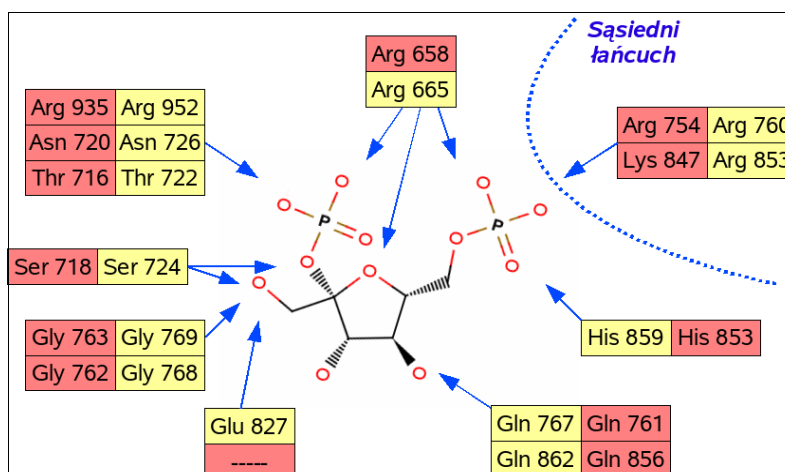
Rys. 29. Dimer enzymu drożdżowego (przedstawiony jako powierzchnia van der Waalsa), kolor niebieski – Fru2,6-P<sub>2</sub> w miejscach efektorowych.

Reszty aminokwasowe mogące stabilizować poszczególne części aktywatora zaznaczono na rysunkach poniżej. Podobnie jak to było w miejscu aktywnym, grupa fosforanowa w pozycji 6 tworzy oddziaływania z dwiema resztami aminokwasowymi pochodzącymi z sąsiedniej podjednostki.

Sekwencja aminokwasowa kieszeni wiążącej aktywator jest silnie zachowana pomiędzy łańcuchami  $\alpha$  i  $\beta$ . Wyjątek stanowi Glu827 w łańcuchu  $\alpha$ , w zamian której występuje Thr821 w łańcuchu  $\beta$ . Różnica ta jest o tyle istotna, iż reszta Glu może tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczką ligandu, treonina natomiast nie ma możliwości do tworzenia podobnych oddziaływań w tym miejscu. Ponadto Lys847 pochodząca z łańcucha  $\beta$  jest zastąpiona przez Arg853 w łańcuchu  $\alpha$ .



Rys. 30. Miejsce efektorowe ze związanym Fru2,6-P<sub>2</sub>. a) w podjednostce  $\alpha$ , łańcuch E, b) w podjednostce  $\beta$ , łańcuch F. Podjednostka  $\alpha$  - kolor pomarańczowy, podjednostka  $\beta$  - kolor bordowy, Fru2,6-P<sub>2</sub> - kolor różowy.



Rys. 31. Reszty aminokwasowe uczestniczące w wiązaniu Fru2,6-P<sub>2</sub> w łańcuchu α i β.

## Porównanie miejsc wiązania związków cukrowych

Powyżej opisano dwa typy kieszeni wiążących związki cukrowe w podjednostce Pfk z *S. cerevisiae*, centrum aktywne wiążące Fru6-P jako substrat lub Fru1,6-P<sub>2</sub> jako produkt reakcji, oraz kieszeń efektorową zdolną do wiązania aktywatora Fru2,6-P<sub>2</sub>.

Oba typy miejsc wiązania wykazują podobieństwa wynikające ze wspólnych ewolucyjnych korzeni oraz różnice pozwalające na wiązanie odpowiednich ligandów.

Dwie reszty argininowe biorące udział w wiązaniu cukru w centrum aktywnym łańcucha α (Arg400, Arg491) są zastąpione przez glicynę i glutaminę w miejscu efektorowym tego samego łańcucha (Gly769 i Gln862). Podobnie metionina (Met398) jest zastąpiona przez glutaminę (Gln767), a asparaginian (Asp356) przez serynę (Ser724) w kieszeni efektorowej. Pojawienie się w miejscu efektorowym takich reszt jak Gly769, Gln862, Asn726, Ser724 i Glu694 czyni kieszeń bardziej przestronną i zdolną do związania drugiej grupy fosforanowej Fru2,6-P<sub>2</sub>. Te same różnice i spostrzeżenia dotyczą łańcucha β.

**Tabela 8.** Reszty aminokwasowe tworzące centrum aktywne i miejsce efektorowe Pfk z *S. cerevisiae* oraz centrum aktywne Pfk z *E. coli* i *B. stearotherophilus*.

	<i>E.coli</i> / <i>B.stearot.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	Centrum aktywne	Centrum aktywne $\alpha$	Centrum aktywne $\beta$	Miejsce efektorowe $\alpha$	Miejsce efektorowe $\beta$
wiązanie Fru6-P	Arg 72	Arg 278	Arg 270	Arg 665	Arg 658
	Gly 104	Gly 310	Gly 302	Glu 694	Glu 688
	Thr 125	Ser 354	Ser 346	Thr 722	Thr 716
	Ile 126	Ile 355	Ile 347	Val 723	Leu 717
	Asp 127	Asp 356	Asp 348	Ser 724	Ser 718
	Asp 129	Asp 358	Asp 350	Asn 726	Asn 720
	Arg 162 B	Arg 383 $\beta$	Arg 391 $\alpha$	Arg 754 $\beta$	Arg 760 $\alpha$
	Met 169	Met 398	Met 390	Gln 767	Gln 761
	Gly 170	Gly 399	Gly 391	Gly 768	Gly 762
	Arg 171	Arg 400	Arg 392	Gly 769	Gly 763
	Glu 222	Glu 455	Glu 447	Glu 827	Thr 821
	Arg 243 B	Arg 475 $\beta$	Lys 482 $\alpha$	Lys 847 $\beta$	Arg 853 $\alpha$
	His 249	His 488	His 481	His 859	His 853
	Arg 252	Arg 491	Arg 484	Gln 862	Gln 856
	-	-	-	Arg 952	Arg 935
wiązanie nukleotydu	Ser 9	Ser 213	Ser 204		
	Gly 10	Gly 214	Gly 205		
	Gly 11	Gly 215	Gly 206		
	Phe 73	-	-		
	Pro 74	-	-		
	Arg 77	Arg 283	Lys 275		
	Gly 102	Gly 308	Gly 300		
	Asp 103	Asp 309	Asp 301		
	Ser 105	Ser 311	Ser 303		
	Gly 108	Leu 317	Leu 309		

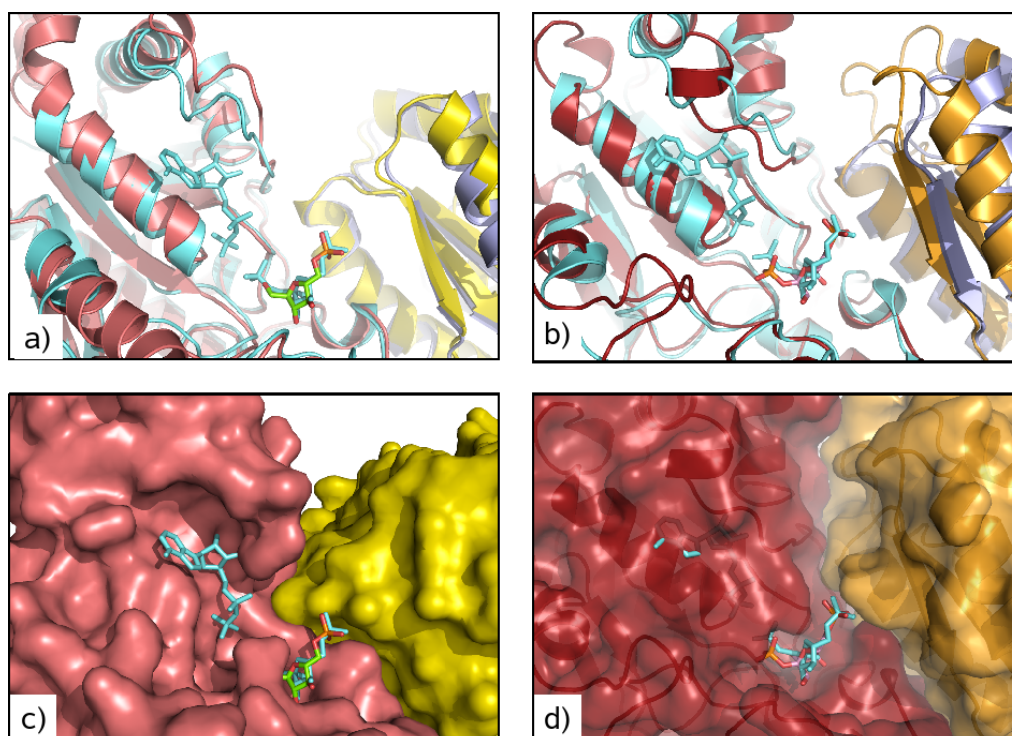
Na podstawie badań nad strukturą bakteryjną, można wnioskować, że Arg278 obecna w centrum aktywnym drożdżowego łańcucha  $\alpha$ , jest odpowiedzialna za oddziaływanie z grupą fosforanową, przenoszoną w wyniku reakcji z nukleotydu na substrat cukrowy. Natomiast ekwiwalentna reszta w C-terminalnej domenie tj. w miejscu efektorowym, Arg665, może stabilizować atom tlenu zawarty w pierścieniu aktywatora. To samo dotyczy podjednostki  $\beta$ .

Centrum aktywne bakteryjnego enzymu wykazuje większe sekwencyjne podobieństwo do drożdżowego miejsca aktywnego niż efektorowego. Jest to zrozumiałe ze względu na pełnienie tej samej funkcji i zdolność do wiązania tego samego ligandu (Tabela 8). Ponadto podobieństwo sekwencji centrum aktywnego enzymu bakterii i drożdży

świadczy o podobnym mechanizmie przebiegu reakcji katalitycznej w oby organizmach.

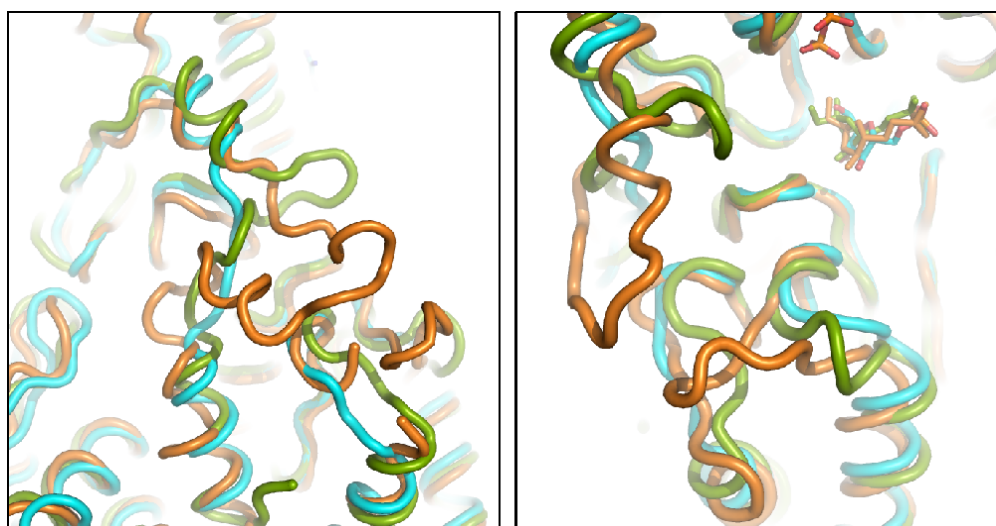
Nałożenie bakteryjnego miejsca aktywnego, do którego związało się ADP i Fru6-P (Evans, 1981; kod PDB: 4PFK), na drożdżowe centrum aktywne wykazuje, że drożdżowy łańcuch główny jest ułożony w taki sam sposób jak łańcuch bakteryjny. Reprezentacja podjednostki drożdżowej w postaci powierzchni van der Waalsa obrazuje idealne dopasowanie nałożonego nukleotydu do eukariotycznej kieszeni (Rys.32).

Podobne porównanie z drożdżowym miejscem efektorowym ujawnia, że na miejsce, w którym wiąże się nukleotyd w bakteryjnym centrum aktywnym nachodzi łańcuch główny enzymu drożdżowego. Wygenerowana powierzchnia pokazuje, że wmodelowany nukleotyd jest całkowicie schowany w białku. Wnęka zdolna do wiązania nukleotydu, którą widzimy w miejscu aktywnym, nie istnieje w miejscu efektorowym; w wyniku ewolucji kieszeń wiążąca nukleotyd uległa zanikowi (Rys.32).



**Rys. 32.** Nałożenie łańcuchów bakteryjnych (Evans, 1981; kod PDB: 4PFK) na podjednostki drożdżowe. a), c) drożdżowe miejsce aktywne – kolor żółty i różowy, Fru6-P – kolor zielony, podjednostki bakteryjne wraz z ADP i Fru6-P – kolor błękitny i niebieski, c) podjednostki drożdżowe w postaci powierzchni; b), d) drożdżowe miejsce efektorowe – kolor pomarańczowy i bordowy, Fru2,6-P<sub>2</sub> – kolor różowy, podjednostki bakteryjne wraz z ADP i Fru6-P – kolor błękitny i niebieski, d) podjednostki drożdżowe w postaci powierzchni van der Waalsa.

Kolejna różnica pomiędzy drożdżowym miejscem aktywnym, drożdżowym miejscem efektorowym oraz bakteryjnym centrum aktywnym dotyczy obecności, wielkości i kształtu pętli zlokalizowanej w pobliżu. Na rysunku 33 widać, że łańcuch bakteryjny tworzy bardzo małą pętlę zbudowaną z reszt 301-307 (niebieski kolor). W tym samym obszarze w przypadku drożdżowego centrum aktywnego występuje pętla sporej wielkości, stworzona z reszt 543-559 (łańcuch  $\alpha$ ), częściowo tworząca strukturę helikalną (kolor pomarańczowy). Pętla ta oddziałuje z mniejszą pętlą znajdującą się w sąsiedztwie i zbudowaną z reszt 457-466 (łańcuch  $\alpha$ ). Te dwie pętle zlokalizowane są na zewnątrz cząsteczki, stąd można przypuszczać, iż możliwa jest zmiana ich konformacji. W miejscu wiązania aktywatora (kolor zielony) istnieje jeszcze inny kształt pętli. Pętla jest nieduża, zbudowana z reszt 903-913 (łańcuch  $\alpha$ ) i skierowana w stronę kieszeni wiążącej Fru2,6-P<sub>2</sub>, z tej pętli pochodzi reszta Arg952 biorąca udział w wiązaniu grupy fosforowej w pozycji 2 aktywatora, a nieobecna w centrum aktywnym.

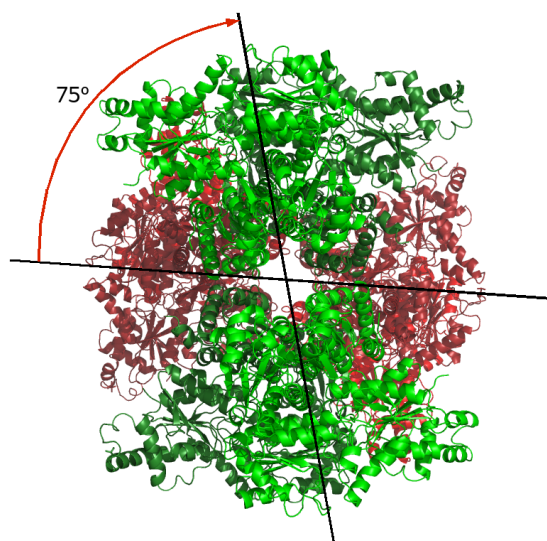


**Rys. 33.** Porównanie przebiegu łańcuchów polipeptydowych w pobliżu centrum aktywnego drożdżowej podjednostki  $\alpha$  (kolor pomarańczowy), w pobliżu miejsca wiązania aktywatora Fru2,6-P<sub>2</sub> drożdżowej podjednostki  $\alpha$  (kolor zielony) oraz podjednostki bakteryjnej (Evans, 1981; kod PDB: 4PFK) (kolor niebieski).



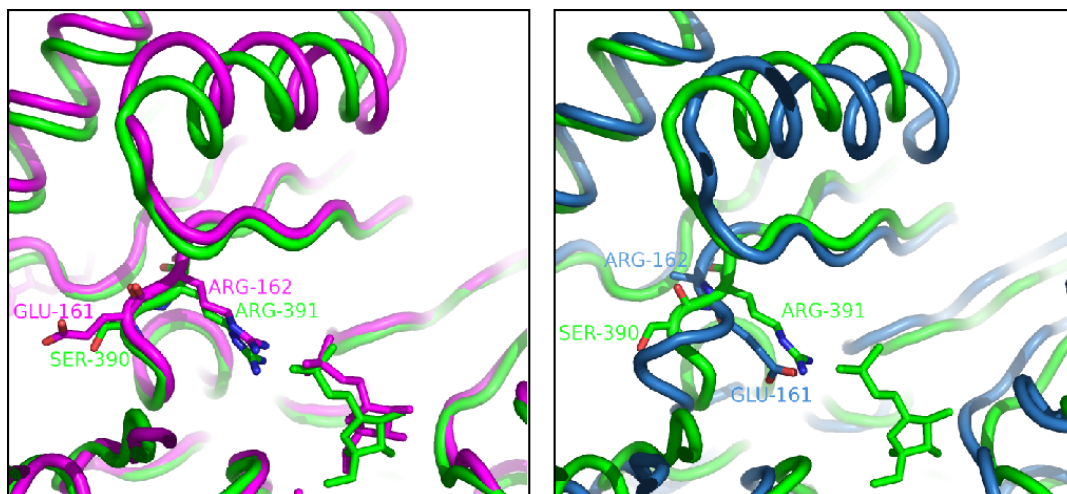
## Enzym w konformacji R

Związanie w strukturze białka Fru6-P i Fru2,6-P<sub>2</sub>, mogą sugerować, iż enzym znajduje się w aktywnej formie R. W strukturze enzymu znaleziono kilka przesłanek świadczących o konformacji R. Wzajemne skręcenie górnego i dolnego tetrameru o kąt około 75° wokół dłuższej osi cząsteczki oktamerycznej (Rys.34) koresponduje z wynikami pochodzącymi z mikroskopii elektronowej gdzie w obecności Fru6-P rotację pomiędzy górnym i dolnym tetramerem określono na 75°, podczas gdy w obecności ATP - 46° (Ruiz, 2007).



**Rys. 34.** Kąt skręcenia pomiędzy górnym i dolnym tetramerem w oktamerze enzymu drożdżowego, dłuższa oś cząsteczki jest prostopadła do płaszczyzny rysunku.

Szczegółowe porównanie dimeru drożdżowego z tetramerami bakteryjnymi w formie R i T wykazało cechy wspólne struktury drożdży z formą R bakterii (Rys.35). Reszty Arg391 i Ser390 w centrum aktywnym drożdżowego łańcucha  $\alpha$  (Arg383 i Ser382 w łańcuchu  $\beta$ ) są ułożone w ten sam sposób co reszty Arg162 i Glu161 w łańcuchu bakteryjnym w konformacji R. W konformacji T enzymu bakteryjnego reszty te są skierowane w przeciwnych kierunkach.



**Rys. 35.** Nałożenie enzymu drożdżowego na enzym bakteryjny w formie R i T, w okolicy centrum aktywnego. Enzym drożdżowy - kolor zielony, tetramer bakteryjny forma R - kolor fioletowy (Evans, 1981; kod PDB: 4PFK), tetramer bakteryjny forma T - kolor niebieski (Schirmer, 1990; kod PDB: 6PFK).

Ułożenie łańcucha białkowego w analogicznym miejscu w kieszeni efektorowej enzymu drożdżowego również bardziej przypomina ułożenie łańcucha bakteryjnego w formie R. Przy czym obecne tu reszty aminokwasowe to Arg760 i Arg759 w łańcuchu  $\alpha$  i Arg754 i Gly753 w  $\beta$ .

## **Fosfofruktokinaza z mięśnia szkieletowego królika**

### **Preparatyka białka**

Ekspresję rekombinowanego Pfk z mięśnia szkieletowego królika w komórkach *E. coli* oraz oczyszczanie przeprowadził profesor Simon Chang z Uniwersytetu Stanowego w Luizjanie, od wielu lat zaangażowany w prace badawczą związaną z tym białkiem. Tu przedstawiam główne etapy preparatyki:

- 1) Transformacja komórek ekspresyjnych wektorem zawierającym gen *pfk* (komórki: szczep *E. coli* pozbawiony *pfk*, DE1020de3; plazmid: pET5a/RMPFK-C18).
- 2) Ekspresja białka przeprowadzona w temperaturze 30 °C, dwukrotna indukcja IPTG do stężenia końcowego 1 mM IPTG.
- 3) Liza komórek przeprowadzona za pomocą sonikatora lub prasy Frencha (Bufor I: 50 mM Tris-PO<sub>4</sub>, pH 8,2, 0,1 mM EDTA, 10 mM siarczan amonu, 20 mM β-merkaptoetanol).
- 4) oczyszczanie na kolumnie agarozowej (Cibacron blue 3GA-agarose), która absorbuje białka wiążące nukleotydy (wmyty 10m M ATP, 10m M Fru6-P).
- 5) Wytrącanie w 60% siarczanu amonu, dializa w Buforze I.
- 6) Chromatografia jonowymienna (Whatman DE-52).
- 7) Pomiar aktywności zgodnie z (Li, 1993).
- 8) Zabezpieczenie oczyszczonego białka przez wytrącenie w 60% siarczanu amonu, w którym mięśniowa Pfk ssaka jest bardzo stabilna.

Otrzymany od profesora Changa roztwór oczyszczonego białka w siarczanie amonu poddałam procesowi dializy według procedury:

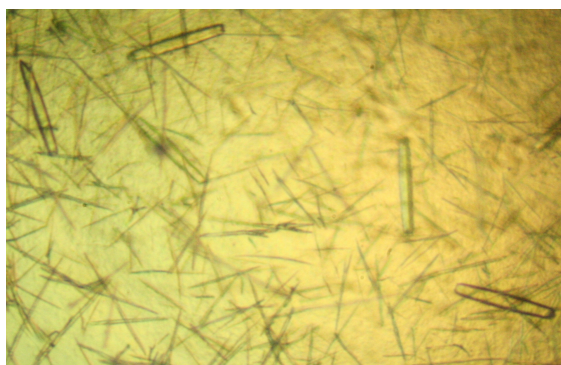
- roztwór białka w siarczanie amonu wymieszano, pobrano 100 µl roztworu, odwirowano w 4°C
- supernatant usunięto, osad rozpuszczono w 100 µl Buforu II (20 mM Tris-HCl, pH 8,2, 10 mM siarczanu amonu, 0,1m M EDTA, 1 mM DTT – świeżo dodany)
- powyższą mieszaninę przeniesiono do woreczka dializacyjnego (Sigma, D-9277)
- wykorzystując mieszadło magnetyczne, utrzymując zlewkę w lodzie, prowadzono dializę trzykrotnie wymieniając Bufor II w ciągu 10 godzin
- roztwór białka zagęszczono, stężenie białka oszacowano stosując kolorymetryczną metodę Bradford (Bradford, 1976).

## Krystalizacja

Kryształy fosfofruktokinazy z mięśnia szkieletowego królika, odpowiednie do pomiarów dyfrakcyjnych, otrzymałam w obecności ligandów: Fru6-P, Fru2,6-P<sub>2</sub> oraz ADP. Krystalizację prowadzono metodą wiszącej kropli. Roztwór w rezerwuarze zawierał: 16% PEG 400, 0,1 M MgSO<sub>4</sub> oraz 0,1 M bufor octanowy o pH 5,3. W wiszącej kropli oprócz 2 µl roztworu rezerwuarowego znajdowało się 2 µl roztworu białka o stężeniu 8 mg/ml z dodatkiem Fru6-P, Fru2,6-P<sub>2</sub> i ADP. Podłużne monokryształy o heksagonalnym przekroju poprzecznym (forma I) oraz cienkie, długie igły rosnące pojedynczo lub w skupiskach (forma II), pojawiały się po około 7 dniach. Kryształy formy I zostały wykorzystane do pomiarów dyfrakcyjnych (Fot. 2).

**Tabela 9.** Warunki krystalizacji Pfk z mięśnia szkieletowego królika.

Metoda	dyfuzja par w układzie wiszącej kropli
Temperatura	19 °C
Stężenie białka	8 mg/ml
Bufor	0,1 M bufor octanowy, pH 5,3
Czynnik strącający	16% PEG 400
Sól	0,1 M MgSO <sub>4</sub>
Dodatki	Fru6-P, Fru2,6-P <sub>2</sub> , ADP



**Fotografia 2.** Kryształy Pfk z mięśnia szkieletowego królika.

Do pomiarów dyfrakcyjnych wybrano dwa kryształy formy I. Dla każdego kryształu przygotowano osobny roztwór krioprotekcyjny. Pierwszy kryształ (nazywany tu RmPfk-lig) nasączono w roztworze zawierającym składniki rezerwuaru z 30% stężeniem PEG 400, oraz ligandy obecne przy krystalizacji: Fru6-P, Fru2,6-P<sub>2</sub> i ADP, tak by nie dopuścić do ich wypłukania z kryształu. Roztwór krioprotekcyjny dla drugiego kryształu (nazywanego tu RmPfk-ATP) również zawierał składniki rezerwuaru z 30% stężeniem PEG 400, a zamiast ligandów obecnych w roztworze krystalizacyjnym dodano ATP. Takie przygotowanie kryształu miało na celu związanie cząsteczek ATP z cząsteczkami białka.

**Tabela 10.** Skład roztworów krioprotekcyjnych dla kryształów Pfk z mięśnia szkieletowego królika.

<b>kryształ RmPfk-lig</b>	<b>kryształ RmPfk-ATP</b>
0,1 M bufor octanowy, pH 5,3	0,1 M bufor octanowy, pH 5,3
0,1 M MgSO <sub>4</sub>	0,1 M MgSO <sub>4</sub>
30% PEG 400	30% PEG 400
5-10 mM Fru6-P, Fru2,6-P <sub>2</sub> , ADP	5-10 mM ATP

## **Pomiary dyfrakcyjne i procesowanie**

Natywne dane dla kryształów RmPfk-lig i RmPfk-ATP zarejestrowano na linii pomiarowej BW7B w ośrodku synchrotronowym DESY w Hamburgu przy długości fali 0,8423 Å i oscylacji 0,5°. Obrazy dyfrakcyjne indeksowano, a następnie integrowano w programie DENZO natomiast skalowano w programie SCALEPACK z pakietu HKL 2000 (Otwinowski, 1997). Zeskalowano 183 obrazów dla kryształu RmPfk-lig, oraz 135 obrazów dla kryształu RmPfk-ATP. Statystyki pomiarów dyfrakcyjnych oraz procesowania danych dla obu kryształów zawiera Tabela 11.

**Tabela 11.** Parametry pomiaru dyfrakcyjnego oraz statystyka natywnego zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształów RmPfk-lig i RmPfk-ATP.

	<b>RmPfk-lig</b>	<b>RmPfk-ATP</b>
Wiązka	BW7B (EMBL/DESY, Hamburg)	BW7B (EMBL/DESY, Hamburg)
Typ detektora	Płyta odwzorowująca, Mar345	Płyta odwzorowująca, Mar345
Długość fali [Å]	0,8423	0,8423
Temperatura pomiaru [K]	100	100
Grupa przestrzenna	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22
Komórka elementarna [Å]	a,b=163,3 c=356,9	a,b=163,7 c=356,6
Mozaikowość (°)	0,21	0,14
Zakres rozdzielczości [Å]	30,0 - 3,2 (3,26 - 3,20)	50,0 - 3,2 (3,26 - 3,20)
R <sub>sym</sub> <sup>§</sup>	0,128 (0,778)	0,140 (0,879)
<I/σ(I)>	16,7 (2,6)	17,8 (2,7)
Kompletność [%]	100 (100)	99,9 (99,9)
Liczba refleksów niezależnych	47108	47369
Krotność obserwacji	8,3 (8,3)	11,2 (11,2)

W nawiasach umieszczono dane dla ostatniego przedziału rozdzielczości.

<sup>§</sup>  $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ , gdzie  $I_i(hkl)$  i  $\langle I(hkl) \rangle$  są odpowiednio obserwowaną indywidualną i średnią intensywnością refleksu o wskaźnikach  $hkl$ ,  $\sum_i$  jest sumą pomiarów  $i$  refleksów o wskaźnikach  $hkl$ ,  $\sum_{hk}$  jest sumą dla wszystkich refleksów.

Wartości  $R_{sym}$  dla danych RmPfk są wysokie, szczególnie w ostatnim przedziale rozdzielczości. Oznacza to pewne różnice w intensywnościach pomiędzy refleksami symetrycznymi. Im większą liczbę refleksów symetrycznych obarczonych pewnymi błędami będziemy uśredniać, czyli im większa będzie krotność obserwacji tym wyższej wartości  $R_{sym}$  możemy się spodziewać. Jednym ze sposobów wpłynięcia na wysokość  $R_{sym}$  byłoby ograniczenie krotności, ale jest to działaniem niepoprawnym i niezalecanym, nazwanym przez twórców HKL2000 jako sztuczne obniżanie wartości  $R_{sym}$ . Można przypuszczać, że zachowanie wysokiej krotności pozwala otrzymać bardziej prawdziwe wartości intensywności dla poszczególnych refleksów, ponieważ uśredniane są z większej puli pomiarów. Na korzyść zbiorów danych dla kryształów RmPfk przemawia zadowalający stosunek  $I/\sigma(I)$ , który dla ostatniego przedziału rozdzielczości wynosi blisko 3.

Zbiory intensywności refleksów zostały przekształcone na zbiory amplitud czynników struktury w programie TRUNCATE (French, 1978), a refleksy posortowane w programie CAD (CCP4, 1994). Z każdego zbioru danych wydzielono zbiory refleksów testowych w ilości 5% całego zbioru przy użyciu programu UNIQUE i FREE (CCP4, 1994).

## Podstawienie cząsteczkowe

Strukturę RmPfk-lig rozwiązano metodą podstawienia cząsteczkowego przy użyciu programu PHASER (McCoy, 2005). Jako model wykorzystano współrzędne łańcucha  $\alpha$ " pochodzące ze struktury yeast-12S-Pfk. Łańcuch drożdżowy wykazuje 41% podobieństwa w stosunku do podjednostki Pfk z mięśnia szkieletowego królika. W procesie podstawiania cząsteczkowego poszukiwano dwóch rozwiązań (dwóch łańcuchów białkowych) o łącznej masie cząsteczkowej około 160 kDa, z czego wynika około 70% zawartość rozpuszczalnika.

**Tabela 12.** Wyniki podstawienia cząsteczkowego.

Nr rozwiązania	TFZ*	Kąty rotacyjne Eulera [°]	Wektor translacji [współrzędne ułamkowe]
1	17.2	30.3 38.3 262.2	-0.71818 0.17291 0.04207
2	31.7	307.4 39.4 255.4	-0.44186 0.89790 0.03130

\* TFZ – wynik Z funkcji translacyjnej, powinien mieć wartość większą od 5 i być dobrze odseparowany od pozostałych rozwiązań.

Strukturę RmPfk-ATP rozwiązano także metodą podstawienia cząsteczkowego, a jako model użyto podjednostkę częściowo udokładnionej struktury RmPfk-lig.

## Udokładnianie struktur Pfk z mięśnia szkieletowego królika

### RmPfk-lig

Zanim przystąpiono do procesu udokładniania dokonano modyfikacji gęstości elektronowej w programie DM (CCP4, 1994) stosując uśrednianie NCS oraz spłaszczenie obszaru rozpuszczalnika. Przed dokonaniem mutacji łańcuchów białkowych zgodnie z sekwencją Pfk z mięśnia szkieletowego królika, przeprowadzono serię obliczeniową w programie CNS 1.1 (Brunger, 1998). Protokół udokładniania za pomocą „brył sztywnych” nie dał widocznego spadku wskaźników R. Natomiast widoczną poprawę uzyskano kolejno

dzięki procedurom: symulowanego wygrzewania (spadek  $R/R_{\text{free}}$  z 0,52/0,52 do 0,40/0,45), grupowego udokładniania czynników temperaturowych ( $R/R_{\text{free}}$  0,37/0,42) oraz minimalizacji ( $R/R_{\text{free}}$  0,35/0,40). W osobnym cyklu obliczano ważone mapy gęstości elektronowej  $2F_o-F_c$  i  $F_o-F_c$ . Podczas udokładniania zastosowano więzy NCS pomiędzy dwoma łańcuchami w asymetrycznej części komórki elementarnej.

Po serii obliczeniowej dokonano mutacji sekwencji oraz przebudowy modelu w programie Coot (Emsley, 2004) zgodnie z mapami  $2F_o-F_c$  oraz  $F_o-F_c$  i powtórzono proces udokładniania z wykorzystaniem tych samych procedur co wyżej zachowując więzy NCS. Serię obliczeniową przeprowadzano naprzemiennie z ręczną przebudową modelu.

Liczba refleksów w zbiorze danych była wystarczająca (liczba refleksów 47108 / liczba parametrów 45860 = 1.03), by udokładniać indywidualne czynniki temperaturowe dla każdego atomu. Do dalszego udokładniania wykorzystano standardowy protokół łączący procedurę symulowanego wygrzewania z optymalizacją współrzędnych atomowych oraz indywidualnych czynników temperaturowych. W dalszym ciągu stosowano więzy NCS pomiędzy łańcuchami znajdującymi się w asymetrycznej części komórki elementarnej ale wagę na więzy trzykrotnie zmniejszono.

W wyniku tak prowadzonego udokładniania otrzymano wartości czynników rozbieżności  $R/R_{\text{free}}$  0,269 / 0,312.

### **RmPfk-ATP**

Początkowo udokładnianie modelu RmPfk-ATP prowadzono etapowo wykorzystując osobno procedury: symulowanego wygrzewania, grupowego udokładniania czynników temperaturowych oraz minimalizacji. Ważone mapy gęstości elektronowej  $2F_o-F_c$  i  $F_o-F_c$  obliczano w osobnym cyklu. Następnie stosowano standardowy protokół łączący procedurę symulowanego wyżarzania z optymalizacją współrzędnych atomowych oraz indywidualnych czynników temperaturowych. Podczas udokładniania stosowano więzy NCS pomiędzy dwoma łańcuchami w asymetrycznej części komórki elementarnej, początkowo użyte więzy zakładały bardzo wysokie podobieństwo pomiędzy łańcuchami, na końcu stosowano wagi trzykrotnie niższe. Pomiedzy cyklami obliczeniowymi dokonywano ręcznej przebudowy modelu w programie Coot.

Statystykę obu modeli zamieszczono w Tabeli 13.



**Tabela 13.** Statystyka procesu udokładniania modeli RmPfk-lig, RmPfk-ATP.

	<b>RmPfk-lig</b>	<b>RmPfk-ATP</b>
Użyty program	CNS 1.1	CNS 1.1
Zakres rozdzielczości	30,0 – 3,2	50,0 – 3,2
Liczba refleksów	47108	47369
Liczba refleksów w zbiorze testowym	2353 (5,0 %)	2362 (5,0 %)
Liczba reszt aminokwasowych	1507	1506
Liczba cząsteczek ligandów	12	12
Liczba atomów białka	11408	11404
Liczba atomów ligandów	192	208
R / R <sub>free</sub>	0,279 / 0,314	0,277 / 0,303
FOM	0,771	0,787
rmsd dla długości wiązań [Å]	0,005	0,009
rmsd dla kątów walencyjnych [°]	1,05	1,33

## **Analiza jakości modeli białkowych**

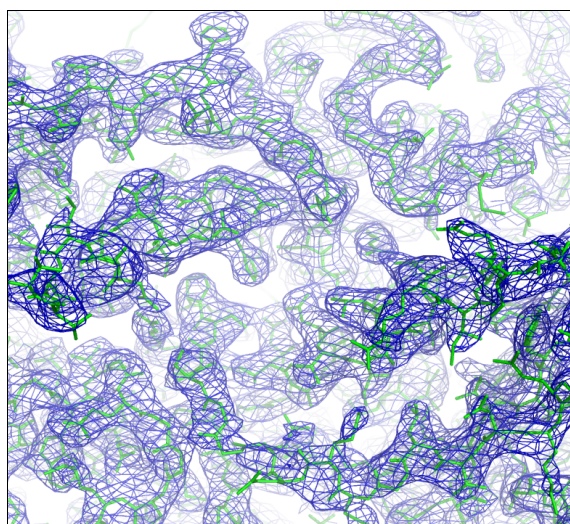
Jak wynika z analizy w programie PROCHECK (Laskowski, 1993) udokładnione modele RmPfk posiadają lepszą geometrię niż można by oczekiwać dla rozdzielczości 3,2 Å. Tabela 14 przedstawia przynależność reszt aminokwasowych do poszczególnych obszarów na wykresie Ramachandrana (Ramachandran, 1963).

**Tabela 14.** Statystyka wykresów Ramachandrana dla modeli RmPfk-lig i RmPfk-ATP.

<b>Reszty aminokwasowe na wykresie Ramachandrana</b>	<b>RmPfk-lig</b>		<b>RmPfk-ATP</b>	
	<b>liczba</b>	<b>%</b>	<b>liczba</b>	<b>%</b>
- w konformacjach uprzywilejowanych	1076	83,9	1049	81,8
- w konformacjach dozwolonych	186	14,5	211	16,5
- w konformacjach względnie dozwolonych	12	0,9	14	1,1
- w konformacjach niedozwolonych	8	0,6	8	0,6
Liczba reszt aminokwasowych z wyłączeniem glicyny i proliny	1282	100,0	1282	100,0

## Mapy gęstości elektronowej

Mapa gęstości elektronowej  $2F_o-F_c$ , dla modeli RmPfk, charakteryzuje się jakością jakiej można oczekiwać dla danych o rozdzielczości 3,2 Å (Rys.36). Mapa ma kształt ciągły, cylindrycznie otaczający łańcuch białkowy. Mapa gęstości elektronowej dla łańcucha głównego jest dobrze widoczna, pozwalając na wmodelowanie reszt od 8 do 755 dla każdej podjednostki w obu strukturach. Część łańcuchów bocznych jest nieuporządkowana, dla niektórych mapa jest szczątkowa, bądź też zupełnie niewidoczna. Najlepiej zdefiniowane na mapie gęstości elektronowej są pierścieniowe łańcuchy boczne, potwierdzając prawidłowe wmodelowanie sekwencji białkowej.

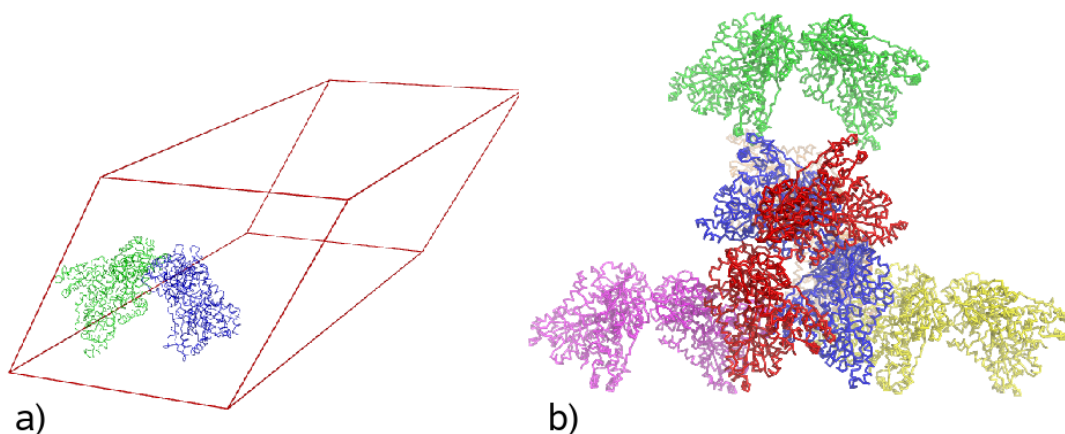


**Rys. 36.** Przykład ważonej mapy  $2F_o-F_c$  dla RmPfk-ATP, kontur mapy  $1\sigma$ .

## Asymetryczna część komórki elementarnej

Badane kryształy Pfk z mięśnia szkieletowego królika należą do grupy przestrzennej  $P6_122$ , wymiary ich komórek elementarnych różnią się nieznacznie w dziesiątych częściach Ångströma. Komórka elementarna takiego kryształu składa się z 12 asymetrycznych części. W części asymetrycznej ulokowały się dwa łańcuchy białkowe oznaczone literami A i B.

Ligandy obecne podczas krystalizacji białka (Fru6-P, Fru2,6-P<sub>2</sub> i ADP) stwarzały możliwość otrzymania aktywnej formy enzymu. Jednak w strukturze krystalicznej nie doszukano się oligomeru odpowiadającego biologicznie aktywnej cząsteczce. Najmniejszym aktywnym oligomerem enzymu królika jest tetramer. Oddziaływań, które zaobserwowano pomiędzy podjednostkami w dimerze struktury drożdżowej, nie znaleziono ani pomiędzy podjednostkami w części asymetrycznej ani w kontaktach z łańcuchami symetrycznymi w strukturze RmPfk. Specyficzne oddziaływania pomiędzy podjednostkami dimeru struktury yeast-12S-Pfk, mają ogromne znaczenie ze względu na lokalizację miejsc wiązania ligandów cukrowych na powierzchni kontaktu pomiędzy podjednostkami.

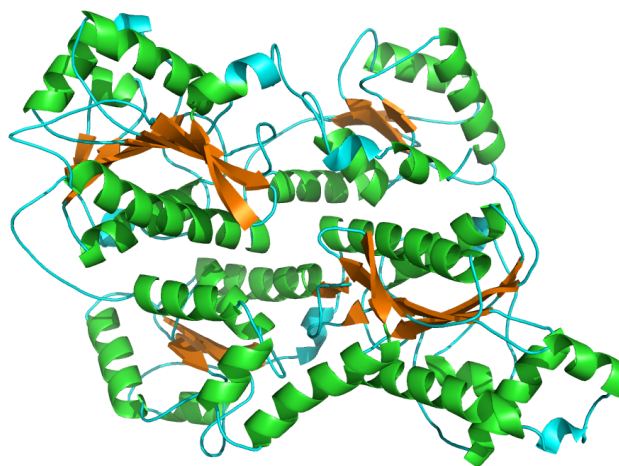


**Rys. 37.** a) zawartość asymetrycznej części komórki elementarnej, łańcuchy A i B; krawędzie przedstawiają komórkę elementarną; b) łańcuchy A i B (kolor niebieski) oraz symetryczne podjednostki oddziałujące z nimi.

## **Struktura fosfofruktokinazy z mięśnia szkieletowego królika**

Podjednostki fosfofruktokinazy mięśniowej z *Oryctolagus cuniculus* agregują w kryształach w sposób, który nie odpowiada biologicznie aktywnej strukturze czwartorzędowej. Przyczyną tego jest przypuszczalnie pH, w którym otrzymano kryształy, ponieważ w pH poniżej 7 tetrameryczna cząsteczka Pfk ma tendencję do dysocjacji na dimery i monomery.

Struktura drugorzędowa i trzeciorzędowa podjednostki Pfk z organizmu królika jest analogiczna do podjednostki enzymu drożdżowego. Również dzieli się ona na dwie domeny N- i C-terminalną, a każda z domen na dwie subdomeny, mniejszą i większą, o konstrukcji arkusza  $\beta$  otoczonego przez helisy  $\alpha$ .



**Rys. 38.** Podjednostka Pfk z mięśnia szkieletowego królika, łańcuchy  $\beta$  – kolor pomarańczowy, helisy  $\alpha$  – kolor zielony, helisy  $3_{10}$  oraz pętle – kolor błękitny.

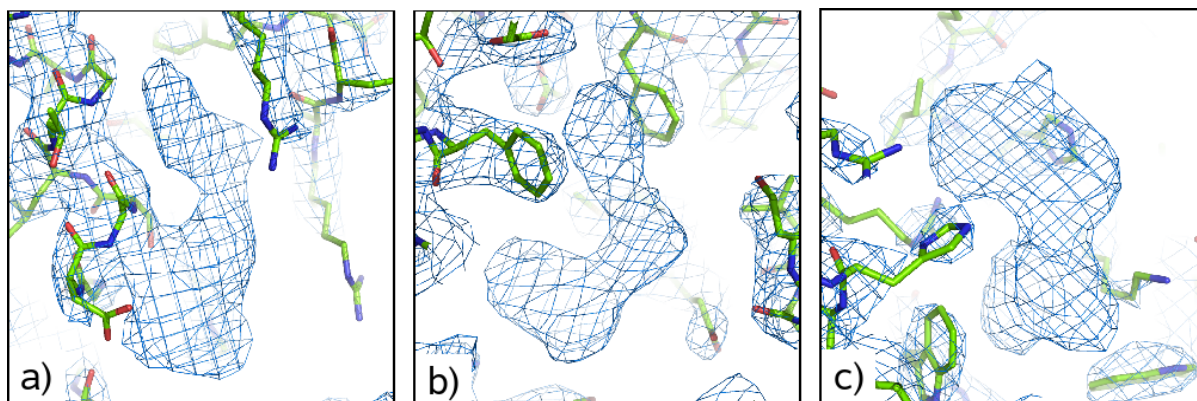
## **Identyfikacja związanych ligandów**

Omawiane tu dwa modele RmPfk są rezultatem krystalizacji białka w obecności Fru6-P, Fru2,6-P<sub>2</sub> i ADP. Różnica w ich przygotowaniu polegała na użyciu różnych roztworów krioprotekcyjnych, pierwszy zawierał Fru6-P, Fru2,6-P<sub>2</sub> i ADP, drugi - tylko ATP.

Analiza mapy gęstości elektronowej ujawniła niewielkie różnice pomiędzy strukturami, stąd opis związanych ligandów zawarty w dalszym tekście przedstawiać będzie model RmPfk-lig, natomiast model RmPfk-ATP zostanie omówiony w przypadku zauważonych różnic.

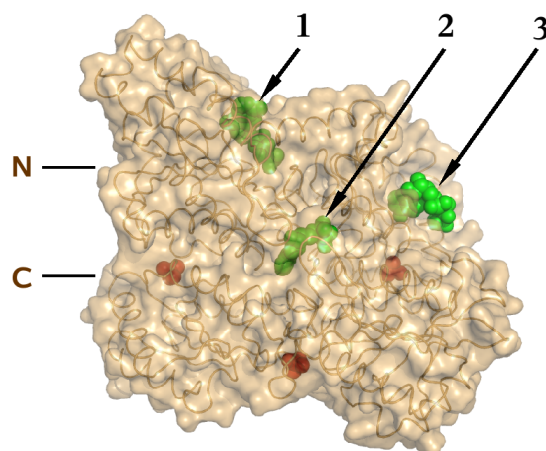
## Ligandy nukleotydowe

Na mapie omit-composit, znaleziono w każdym z łańcuchów po trzy bardzo wyraźne piki, których wielkość i kształt sugerowały obecność nukleotydu. Na rysunku 39, przedstawiono przykładową mapę omit-composit dotyczącą tych rejonów, pochodzącą z łańcucha A.



**Rys. 39.** Przykład mapy omit-composit, kontur  $1\sigma$ , zlokalizowanej w: a) miejscu aktywnym, b) centrum podjednostki, c) w subdomenie mniejszej N-terminalnej połowy.

Gęstość elektronowa odpowiadająca związkom nukleotydowym znajdowała się w następujących lokalizacjach. Pierwsza, pomiędzy subdomenami N-terminalnej domeny, w lokalizacji odpowiadającej miejscu aktywnemu. Druga, w centrum podjednostki, pomiędzy N- i C-terminalną domeną. Trzecia natomiast, w subdomenie mniejszej, N-terminalnej połowy, w bliskim sąsiedztwie pętli łączącej ją z połową C-terminalną (Rys.39; Rys. 40).

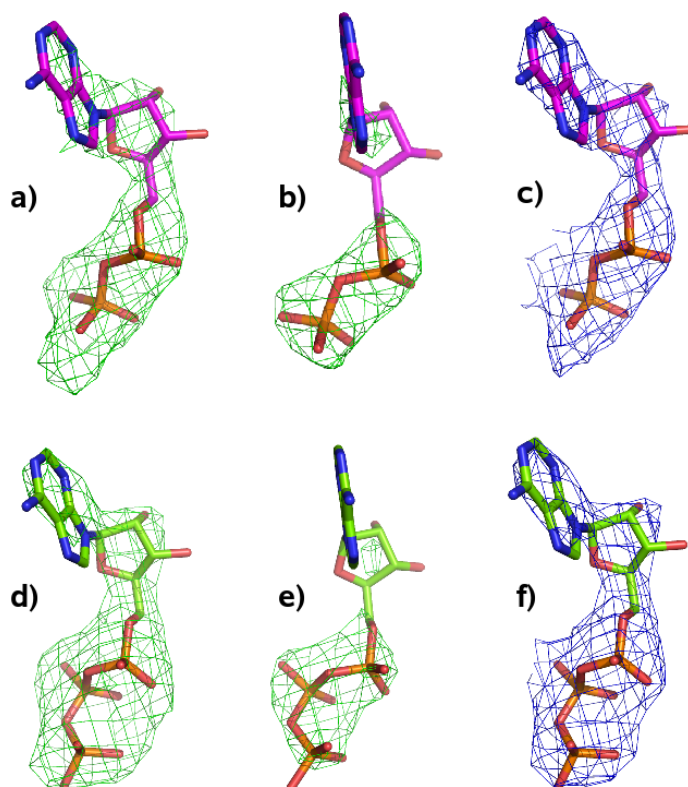


**Rys. 40.** Podjednostka enzymu z mięśnia królika z zaznaczonymi miejscami wiązania nukleotydu 1, 2 i 3.

## Centrum aktywne

Centrum aktywne podjednostki eukariotycznej zlokalizowane jest w domenie N-terminalnej, we wnęce pomiędzy subdomenami. Jak wspomniano powyżej, w miejscach aktywnych w strukturach RmPfk-lig i RmPfk-ATP znaleziono mapę gęstości elektronowej należącą do nukleotydu.

Wmodelowanie ligandu w miejsce aktywne ułatwiła znajomość modelu bakteryjnego z ADP (Evans, 1981; kod PDB: 4PFK). W strukturę RmPfk-lig wmodelowano ADP, natomiast w strukturę RmPfk-ATP ATP. Ze względu na to, iż mapa gęstości elektronowej przy rozdzielczości 3,2 Å nie ukazuje detali, ocena rodzaju związanego nukleotydu wymagała ostrożnej analizy. W każdą kieszeń katalityczną wmodelowano ADP i przeprowadzono proces udokładniania z obliczeniem map gęstości elektronowej. To samo uczyniono dla ATP wpasowanego w centrum aktywne. Otrzymane w ten sposób mapy stanowiły kryterium wyboru ligandu. Dodatkowo położenie i rozmiar najsilniejszych pików na różnicowej mapie omit pozwoliło określić obecność dwóch lub trzech grup fosforanowych (Rys.41).



**Rys. 41.** a), b), c) ADP w centrum aktywnym RmPfk-lig; d), e), f) ATP w centrum aktywnym RmPfk-ATP; a), d) mapa różnicowa omit, kontur 3  $\sigma$ ; b), e) mapa różnicowa omit, kontur 6  $\sigma$ ; c) d) ważona mapa  $2F_o-F_c$ , kontur 1,5  $\sigma$ .

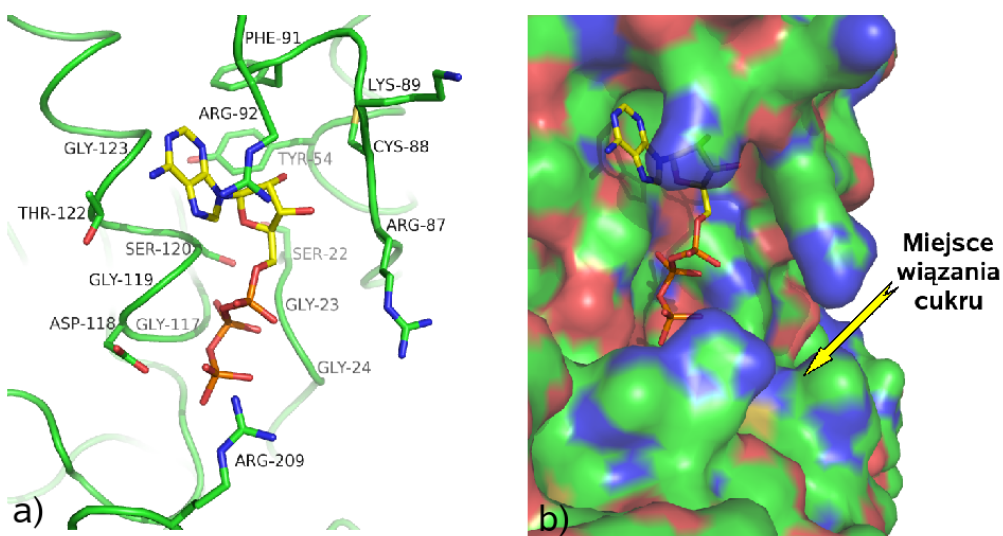
Kieszień wiążącą substrat nukleotydowy w enzymie z mięśnia królika, tworzą reszty aminokwasowe zamieszczone w Tabeli 15. Mapa gęstości elektronowej dla tych reszt jest dobrej jakości za wyjątkiem łańcuchów bocznych Arg92, Arg87, Arg209, Lys89, przy czym ostatnia reszta oddziałuje z nukleotydem tylko poprzez łańcuch główny.

Porównanie kieszeni katalitycznej dwóch organizmów eukariotycznych i prokariotycznego wykazało zachowanie większości kluczowych reszt aminokwasowych pomiędzy tymi organizmami (Tabela 15). Obecność różnych reszt aminokwasowych w pozycji Lys89 nie ma wpływu na wiązanie ligandu, ponieważ bierze w nim udział jedynie łańcuch główny reszty. Bakteryjna Gln107 tworząca wiązanie wodorowe z resztą adeniny jest zastąpiona w enzymie eukariotycznym przez treoninę, która nie tworzy oddziaływań z ligandem.

**Tabela 15.** Reszty aminokwasowe wiążące substrat nukleotydowy w enzymie z *O. cuniculus* oraz analogiczne reszty w enzymach z *B. stearothermophilus* i *S. cerevisiae*.

<i>B.stearothermophilus</i>	Lys 77	Phe 76	Pro 74	Cys 73	Arg 72	Tyr 41	Ser 9	Gly 10	Gly 11	Arg 171	Gly 102	Asp 103	Gly 104	Ser 105	Gln 107	Gly 108
<i>O. cuniculus</i>	Arg 92*	Phe 91	Lys 89*	Cys 88	Arg 87*	Tyr 54	Ser 22	Gly 23	Gly 24	Arg 209*	Gly 117	Asp 118	Gly 119	Ser 120	Thr 122	Gly 123
<i>S. cerevisiae</i>	Arg 283	Phe 282	Met 280	Ser 279	Arg 278	Tyr 245	Ser 213	Gly 214	Gly 215	Arg 400	Gly 308	Asp 309	Gly 310	Ser 311	Thr 313	Gly 314

\* - reszty aminokwasowe modeli RmPfk-lig, RmPfk-ATP nieposiadające mapy gęstości elektronowej dla łańcucha bocznego.

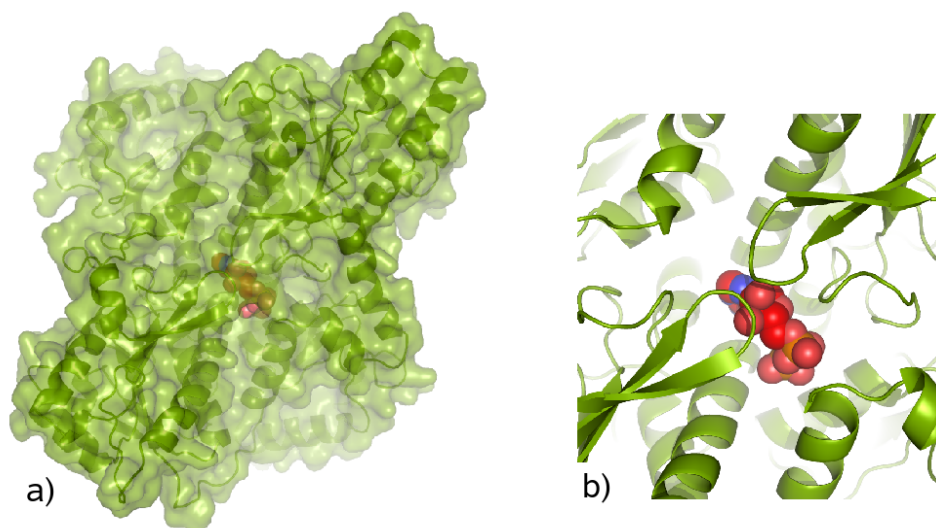


**Rys. 42.** Miejsca aktywne na przykładzie RmPfk-ATP, a) reszty aminokwasowe tworzące kieszeń wiążącą nukleotyd; b) prezentacja w formie powierzchni van der Waalsa, strzałką zaznaczono miejsce wiązania Fru6-P.

Druga część centrum aktywnego, odpowiedzialna za wiązanie substratu cukrowego, jest pusta w obu strukturach z *O. cuniculus* mimo, iż Fru6-P był obecny w kropli krystalizacyjnej oraz w roztworze krioprotekcyjnym pierwszego kryształu. Przyczyną, dla której Fru6-P nie związał się z białkiem jest prawdopodobnie położenie kieszeni wiążącej cukier na powierzchni kontaktu pomiędzy podjednostkami. Jak to opisano na przykładzie enzymu z drożdży, Fru6-P wiążąc się w centrum aktywnym tworzy wiązania wodorowe z sąsiednią podjednostką. Wiązania te nie mogą się tworzyć w strukturach z mięśnia szkieletowego królika z powodu braku prawidłowych oddziaływań pomiędzy podjednostkami.

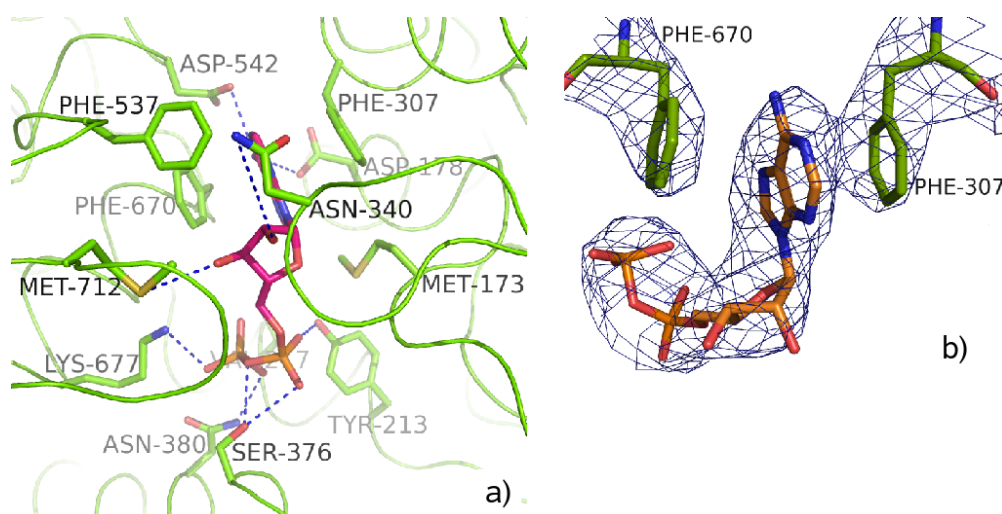
### Miejsce wiązania nukleotydu pomiędzy domenami

W centralnej części podjednostki z RmPfk, pomiędzy N- i C-terminalną domeną, zidentyfikowano mapę gęstości elektronowej należącą do ADP. Nukleotyd związał się w pobliżu charakterystycznych spinek  $\beta$ , z których jedna pochodzi z subdomeny większej N-terminalnej domeny, druga z subdomeny większej domeny C-terminalnej (Rys.43).



**Rys. 43.** a) podjednostka RmPfk w reprezentacji powierzchni van der Waalsa, w kolorze czerwonym cząsteczka ADP w postaci sfer van der Waalsa; b) zbliżenie miejsca wiązania ADP, cząsteczka białka prezentowana przez elementy struktury drugorzędowej, cząsteczka ADP w postaci sfer van der Waalsa.





**Rys. 44.** a) miejsce wiązania ADP w centrum podjednostki; b) ważona mapa gęstości elektronowej  $2F_o - F_c$ , kontur  $1 \sigma$ , dla cząsteczki ADP oraz dla reszt fenyloalaninowych biorących udział w oddziaływaniach warstwowych.

W miejscu, w którym związała się cząsteczka ADP dotychczas nie obserwowano ligandu, nie znaleziono go w strukturach enzymów prokariotycznych ani w strukturze eukariotycznych drożdży. W sekwencji enzymu ssaka należy doszukiwać się przyczyn, dla których cząsteczka ADP uległa tu związaniu.

Reszty aminokwasowe tworzące omawianą kieszeń wiążącą ADP, są dobrze zdefiniowane na mapie gęstości elektronowej (Rys.44-b). Pierścień adeniny ADP bierze udział w oddziaływaniach warstwowych z dwoma pierścieniami fenyloalaniny (Phe670, Phe307). Grupy fosforanowe ligandu tworzą wiązania wodorowe z Ser376, Asn380, Lys677, Tyr213 oraz łańcuchem głównym Asp172. Natomiast reszta rybozy oddziałuje z Met712, Asn340 (Tabela 16).

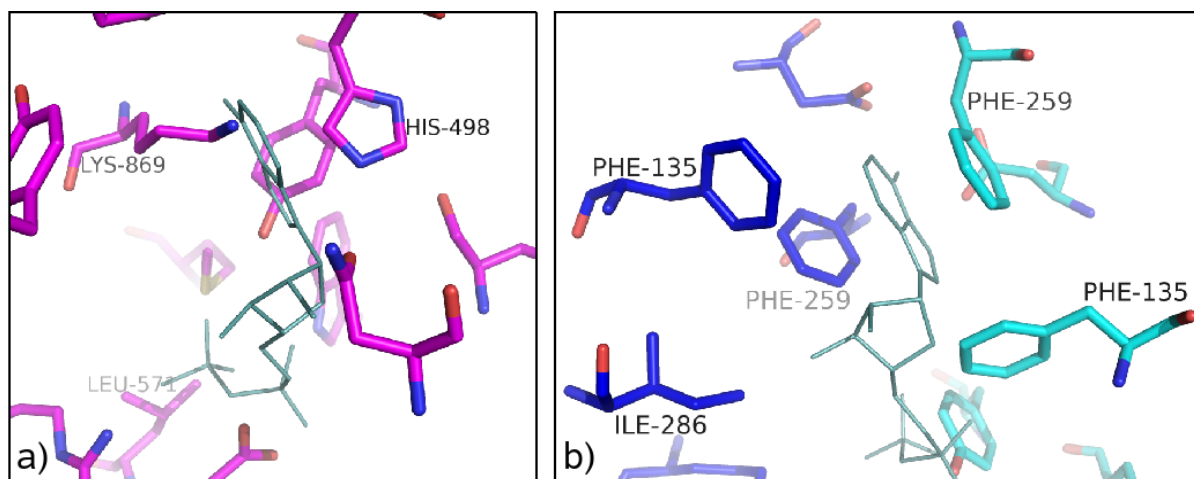
Pomimo tego, iż enzym z *O. cuniculus* jest filogenetycznie bliższy enzymowi z *S. cerevisiae*, wyraźnie większe podobieństwo sekwencyjne w obrębie miejsca wiązania ADP łączy go z enzymem z *B. stearothermophilus* (Tabela 16). Można przypuszczać, że nukleotyd nie byłby w stanie związać się w podjednostce drożdżowej gdyż zamiast reszt fenyloalaninowych stabilizujących pierścień adeniny występuje tu reszta lizyny i histydyny (Lys869, His498). Ponadto w miejscu Asn380, w rejonie wiązania grup fosforanowych, znajduje się Leu571 nietworząca wiązań wodorowych. Ponieważ w roztworze krystalizacyjnym enzymu drożdżowego nie było nukleotydu dlatego nie można jednoznacznie

stwierdzić czy mógłby się on wiązać w tym miejscu, czy też nie.

W enzymie bakteryjnym obecne są dwa pierścienie fenyloalaniny potencjalnie mogące oddziaływać z ADP, ale oprócz nich znajdują się tam jeszcze Phe135A, Phe135C i Ile286A. Tak duża liczba reszt hydrofobowych, przypuszczalnie dyskwalifikuje to miejsce jako wiążące ligand nukleotydowy.

**Tabela 16.** Reszty aminokwasowe wiążące ADP w centrum podjednostki z *O. cuniculus* oraz analogiczne reszty w strukturach z *S. cerevisiae* i *B. stearothermophilus*.

	pierścień adeniny				grupy fosforanowe				pierścień rybozy	
<i>O. cuniculus</i>	<b>Phe</b> 670	<b>Phe</b> 307	<b>Asp</b> 542	<b>Asp</b> 178	<b>Tyr</b> 213	<b>Ser</b> 376	<b>Asn</b> 380	<b>Lys</b> 677	<b>Met</b> 712	<b>Asn</b> 340
<i>S. cerevisiae</i>	<b>Lys</b> 869	<b>His</b> 498	<b>Asp</b> 737	<b>Tyr</b> 369	<b>Trp</b> 404	<b>Glu</b> 567	<b>Leu</b> 571	<b>Arg</b> 876	<b>Val</b> 929	<b>Asn</b> 531
<i>B. stearothermophilus</i>	<b>Phe</b> 259A	<b>Phe</b> 259C	<b>Asp</b> 140A	<b>Asp</b> 140C	<b>Asp</b> 175C	<b>Asp</b> 307C	<b>Met</b> 310C	<b>Arg</b> 266A	<b>Ile</b> 286A	<b>Asn</b> 289C

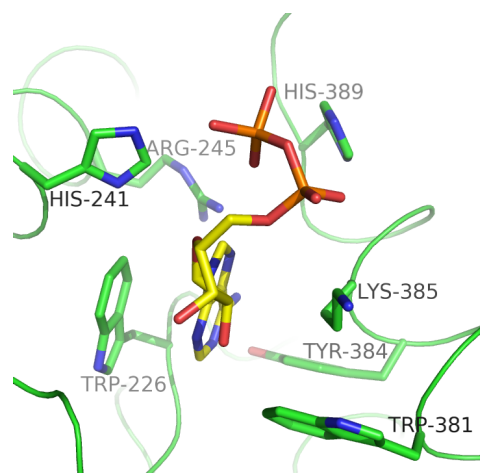


**Rys. 45.** Cząsteczka ADP (kolor szary) wmodelowana w strukturę: a) yeast-12S-Pfk, b) *B. stearothermophilus* (Evans, 1981; kod PDB: 4PFK); cząsteczkę ADP wmodelowano poprzez nałożenie struktury RmPfk na porównywane struktury.

## Miejsce wiązania nukleotydu w subdomenie mniejszej N-terminalnej połowy

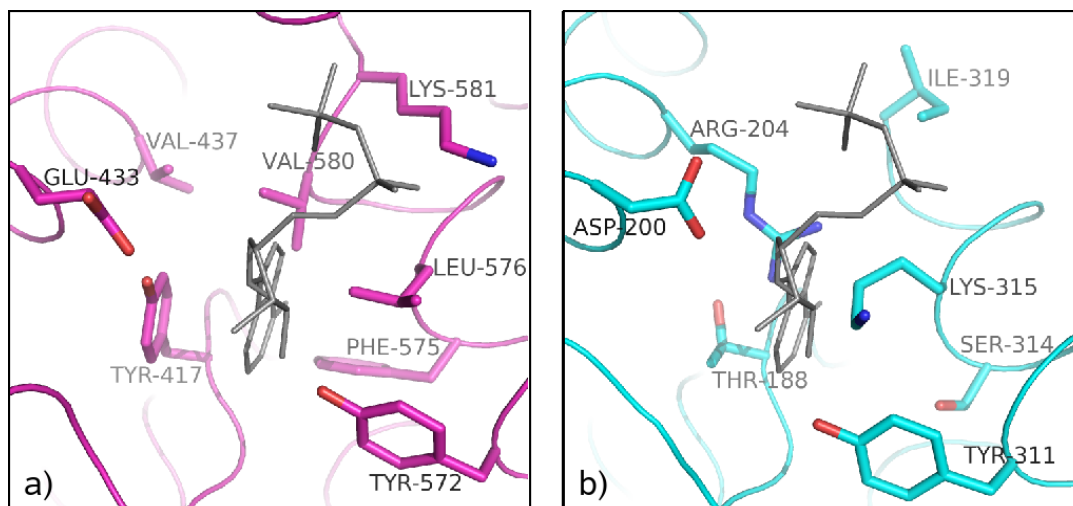
W kieszeni subdomeny mniejszej N-terminalnej połowy podjednostki RmPfk, zlokalizowano gęstość elektronową wielkości nukleotydu. W strukturze RmPfk-lig gęstość tę przypisano do ADP, a w RmPfk-ATP do ATP. Wynika z tego, iż w momencie nasączenia kryształu RmPfk-ATP roztworem krioprotekcyjnym cząsteczka ADP pochodząca z roztworu krystalizacyjnego została zastąpiona cząsteczką ATP w opisywanej kieszeni.

Ten rejon białka nie był dotychczas znany jako miejsce wiązania ligandów. Nałożenie na siebie modeli bakteryjnego, drożdżowego i ssaczego ujawnia różnice w sekwencji aminokwasów. Cząsteczka nukleotydu została związana w podjednostce RmPfk przez następujące reszty aminokwasowe: reszta adeniny nukleotydu oddziałuje warstwowo z pierścieniem Trp226, a wiązania wodorowe tworzy z Tyr384 i Arg245; reszty fosforanowe stabilizowane są przez His389, His241 i Lys385, natomiast pierścień rybozy oddziałuje z łańcuchem głównym Pro234 (Rys.46).



**Rys. 46.** Miejsce wiązania nukleotydu na przykładzie łańcucha B modelu RmPfk-lig.

W modelu yeast-12S-Pfk reszta Tyr417 mogłaby potencjalnie tworzyć oddziaływania warstwowe z resztą adeniny, jednak wnękę budują hydrofobowe reszty takie jak Val580, Leu576, Val437 i Phe575, co najprawdopodobniej uniemożliwiłoby związanie nukleotydu. W podjednostce bakteryjnej w miejscu Trp226 znajduje się Thr188, a zamiast His389 występuje Ile319.



Rys. 47. Cząsteczka ADP ze struktury RmPfk-lig (kolor szary) wmodelowana poprzez analogię w strukturę: a) yeast-12S-Pfk – kolor fioletowy, b) *B. stearothermophilus* – kolor niebieski.

## Ligandy nienukleotydowe

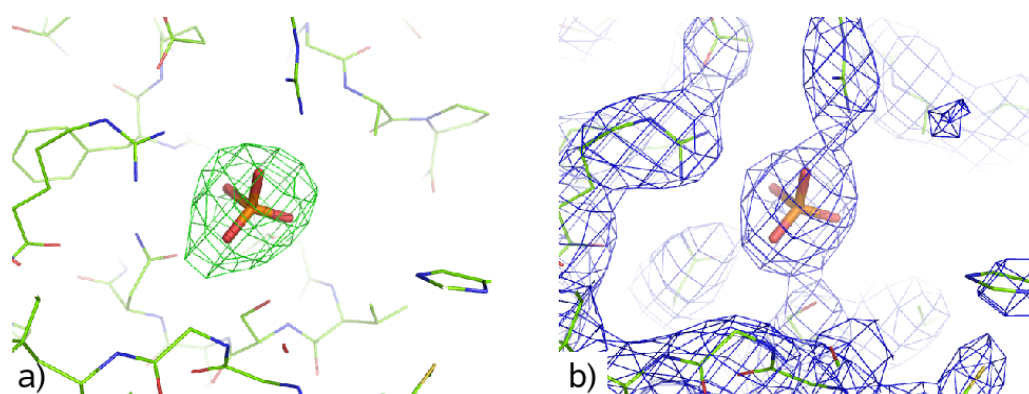
Na mapie różnicowej gęstości elektronowej, w każdej z podjednostek, znaleziono trzy elipsoidalne dodatnie piki. Pierwszy jest zlokalizowany w miejscu wiązania aktywatora Fru2,6-P<sub>2</sub>, tj. w zagłębieniu pomiędzy subdomenami C-terminalnej domeny. Pozostałe dwa są ulokowane pomiędzy domenami po przeciwnych końcach cząsteczki.

## Miejsce wiązania aktywatora

Różnicowa mapa gęstości elektronowej w miejscu wiązania Fru2,6-P<sub>2</sub>, ma kształt kulisty (Rys.48-a). Kształt gęstości pozwolił wnioskować, iż pochodzi ona od niewielkiego, tetraedrycznego jonu. Skład roztworów w których przebywały kryształy, sugeruje, że jonem tym może być jon siarczanowy, pochodzący od MgSO<sub>4</sub> lub jon fosforanowy powstały w wyniku dysocjacji ATP/ADP, która następuje po rozpuszczeniu związku w wodzie w warunkach laboratoryjnych.

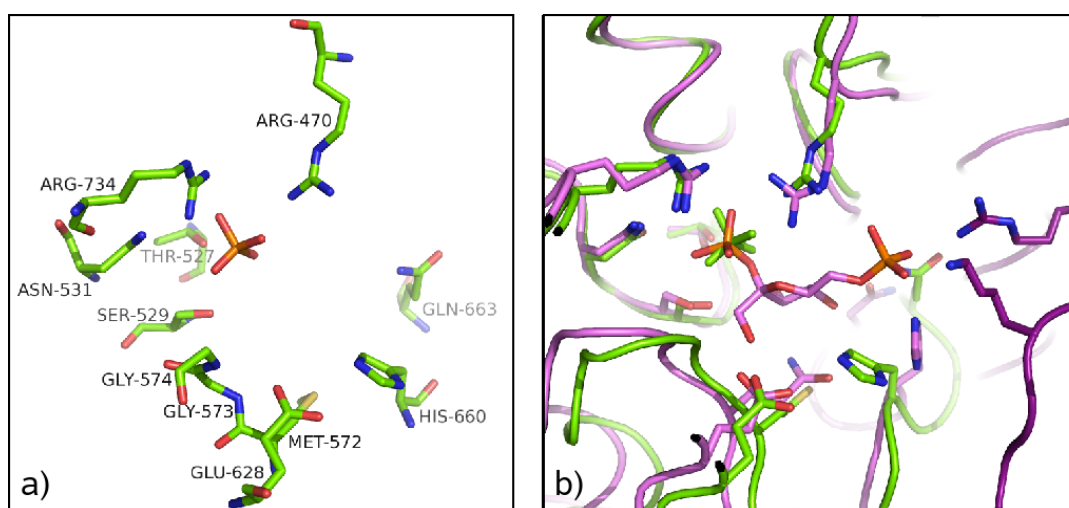
Ze względu na niską rozdzielczość niemożliwe jest rozstrzygnięcie czy związany jon jest jonem fosforanowym czy siarczanowym, ponieważ różnica pomiędzy atomami P i S wynosi jeden elektron. Zdecydowano o wmodelowaniu jonu fosforanowego, ze względu na

to, iż jest on bliższy związkowi wiązany przez białko (Rys.48-b).



**Rys. 48.** Mapa gęstości elektronowej w miejscu efektorowym, a) różnicowa mapa omit, kontur  $3\sigma$ , b) ważona mapa  $2F_o-F_c$ , kontur  $1\sigma$ . Jon fosforanowy (kolor czerwony) wmodelowany na podstawie gęstości elektronowej.

Porównanie sekwencji Pfk z *S. cerevisiae* i *O. cuniculus* wykazało, że reszty aminokwasowe tworzące kieszeń efektorową są silnie zachowane pomiędzy enzymami (Tabela 17). Z nałożenia na siebie struktur RmPfk i yeast-12S-Pfk, wynika, że położenie jonu fosforanowego w omawianym modelu odpowiada dokładnie miejscu wiązania grupy fosforanowej w pozycji 2 związku Fru2,6-P<sub>2</sub> w enzymie drożdżowym (Rys.49-b).



**Rys. 49.** a) jon fosforanowy w miejscu efektorowym i reszty aminokwasowe tworzące kieszeń, b) porównanie miejsca efektorowego Pfk z *S. cerevisiae* ze związanym Fru2,6-P<sub>2</sub> (podjednostka  $\alpha$  – kolor jasnofioletowy, podjednostka  $\beta$  – kolor ciemnofioletowy) z miejscem efektorowym RmPfk (kolor zielony), jon fosforanowy w kolorze zielonym.

**Tabela 17.** Porównanie sekwencji miejsca efektorowego Pfk z *O. cuniculus* i podjednostki  $\alpha$  Pfk z *S. cerevisiae*.

<b>RmPfk-lig</b>	<b>His</b> 660	<b>Gln</b> 663	<b>Met</b> 572	<b>Gly</b> 573	<b>Gly</b> 574	<b>Glu</b> 628	<b>Ser</b> 529	<b>Asn</b> 531	<b>Arg</b> 470	<b>Thr</b> 527	<b>Arg</b> 734	----	----
<b>Yeast-12S-Pfk</b>	<b>His</b> 859	<b>Gln</b> 862	<b>Gln</b> 767	<b>Gly</b> 768	<b>Gly</b> 769	<b>Glu</b> 827	<b>Ser</b> 724	<b>Asn</b> 726	<b>Arg</b> 665	<b>Thr</b> 722	<b>Arg</b> 952	<b>Arg</b> 754 $\beta$	<b>Lys</b> 847 $\beta$

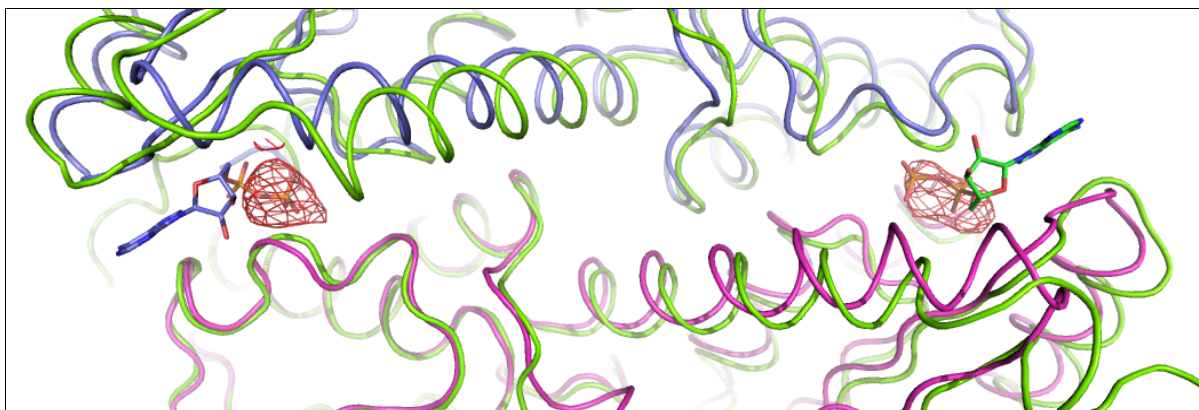
Mimo obecności Fru2,6-P<sub>2</sub> w roztworze krystalizacyjnym, nie został on związany w miejscu efektorowym. Prawdopodobną przyczynę tego faktu stanowi brak prawidłowych oddziaływań ze strony sąsiedniego łańcucha. Z badań nad strukturą yeast-12S-Pfk wiemy bowiem, że cukier związany w miejscu efektorowym tworzy wiązania wodorowe z dwiema resztami należącymi do sąsiedniej podjednostki. Można stąd wnioskować, że oddziaływania te są niezbędne dla wiązania Fru2,6-P<sub>2</sub> w miejscu efektorowym białka.

### Pozostałe dwa miejsca wiązania związku nienukleotydowego

Różnicową mapę gęstości elektronowej znaleziono pomiędzy domenami w dwóch przeciwległych końcach podjednostki, tj. w pobliżu pętli łączącej dwie domeny oraz w sąsiedztwie N- i C-końca.

Porównanie podjednostki RmPfk z modelem bakteryjnym ujawnia, że dwa dodatnie piki różnicowej gęstości elektronowej znajdują się w miejscach odpowiadających prokariotycznym miejscom efektorowym, zdolnym do wiązania obu efektorów ADP i PEP. W strukturze bakteryjnej dwie kieszenie efektorowe znajdują się pomiędzy dwiema podjednostkami i są związane ze sobą poprzez niekrystalograficzną oś symetrii. W podjednostce enzymu ssaka miejsca te należą do tej samej podjednostki i są homologiczne ponieważ ewoluowały z tego samego motywu bakteryjnego.

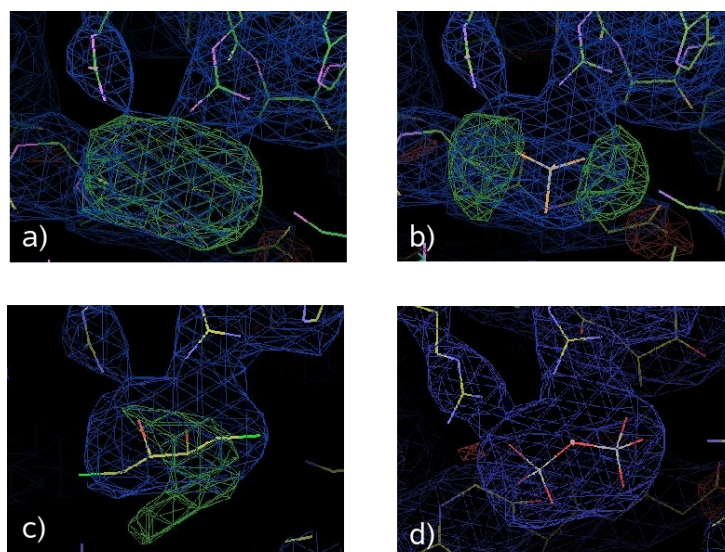
Z nałożenia na siebie modeli eukariotycznego i prokariotycznego wynika, że łańcuchy biegną w podobny sposób tworząc kieszenie podobnej wielkości, a ponadto budują je takie same bądź zbliżone charakterem reszty aminokwasowe.



**Rys. 50.** Struktura RmPfk (kolor zielony) oraz dwa dodatnie piki różnicowej mapy gęstości elektronowej w dwóch przeciwległych końcach podjednostki, pomiędzy N- i C-terminalną domeną. Dwa łańcuchy struktury *B. stearothermophilus* (kolor niebieski i fioletowy) z ADP w miejscach efektorowych nałożone na podjednostkę enzymu z królika.

Wydłużony kształt różnicowej mapy gęstości elektronowej nie daje jednoznacznej odpowiedzi na temat związanych w tych miejscach związków. Wiemy, że w kierunku gęstości elektronowej zwrócone są łańcuchy boczne Arg423 i Arg419 (w kieszeni przy pętli łączącej domeny) i Arg38, Arg34 (w kieszeni w pobliżu N- i C-końca). Obecność aminokwasowych łańcuchów bocznych z grupami  $-NH_2$  sugeruje, że związany ligand ma charakter akceptora wiązań wodorowych.

Na przykładzie kieszeni zlokalizowanej w pobliżu pętli łączącej domeny na rysunku 50 przedstawiono różnicową mapę gęstości elektronowej gdy nie wmodelowano w tym miejscu ligandu, a także mapy gęstości elektronowej otrzymane po udokładnieniu modelu w obecności potencjalnych ligandów. Mapy gęstości elektronowej będące rezultatem wmodelowania jonu fosforanowego (Rys.51-b) oraz DTT (1,4-ditiotreitolu - obecnego w buforze dializacyjnym) (Rys.51-c) wskazują na obecność w tym miejscu większej cząsteczki. Najlepiej w mapę gęstości elektronowej pasuje pirofosforan (Rys.51-d), ale jest mało prawdopodobne, by był on obecny w strukturze białka (gdyby nawet PPI pochodził z rozpadu nukleotydu to jest on związkiem bardzo nietrwałym, łatwo rozpadającym się na dwie grupy fosforanowe). Na temat związanych w tych miejscach cząsteczek można jedynie spekulować w oparciu o opisane wyżej spostrzeżenia, słaba rozdzielczość uniemożliwia jednoznaczną interpretację mapy. Za umieszczeniem w tych miejscach jonu fosforanowego w strukturach RmPfk przemawiał fakt, iż został on wcześniej zidentyfikowany w miejscu efektorowym.



**Rys. 51.** Mapy gęstości elektronowej w kieszeni w pobliżu pętli łączącej domeny w zależności od obecności oraz rodzaju ligandu, ważona mapa  $2F_o-F_c$  o konturze  $1 \sigma$  – kolor niebieski, dodatnia mapa  $F_o-F_c$  kontur  $3 \sigma$  - kolor zielony; a) bez wmodelowanego ligandu; b) wmodelowany jon  $PO_4^{3-}$ ; c) wmodelowana cząsteczka DTT; d) wmodelowana cząsteczka PPI.



## Dyskusja

Fosfofruktokinaza jako enzym katalizujący nieodwracalną reakcję szlaku glikolitycznego stanowi główny punkt regulacji przebiegu metabolizmu glukozy, a przez to bardzo interesujący obiekt badawczy.

Dotychczasowy stan wiedzy dotyczący struktury ATP-zależnej Pfk opierał się na strukturach rentgenograficznych enzymów bakteryjnych, strukturze Pfk z *Trypanosoma brucei* (która wykazuje bliższe podobieństwo z PPI-zależnymi enzymami i nie ujawnia cech związanych z ewolucją na drodze duplikacji genu) oraz obrazach mikroskopii elektronowej ukazujących czwartorzędową strukturę Pfk drożdży i ssaków. Opisanie tu modele stanowią pierwsze eukariotyczne struktury, których podjednostki są efektem ewolucji poprzez duplikację i fuzję genów, a Pfk z mięśnia szkieletowego królika stanowi pierwszą strukturę Pfk zwierząt wyższych.

Struktury Pfk z *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Oryctolagus cuniculus* ze względu na wielkość podjednostek (ponad 700 reszt aminokwasowych w łańcuchu białkowym) należą do grona największych rozwiązanych struktur, które w bazie PDB stanowią zaledwie 2,5% wszystkich struktur. Do tego w strukturze krystalicznej forma 12S enzymu drożdżowego agreguje w sposób podobny do natywnego heterooktameru 21S, z dwoma tetramerami 12S w części asymetrycznej. W związku z tym jest to jeden z największych modeli atomowych struktur białkowych pod względem rozmiaru cząsteczki biologicznej, a jednocześnie zawartość asymetrycznej części komórki elementarnej. Duże rozmiary białek z pewnością zwiększają trudności w uzyskaniu wysokorozdzielczych danych, dla których konieczne byłoby otrzymanie dobrej jakości kryształów o większych rozmiarach.

## **Ewolucja a struktura trójwymiarowa fosfofruktokinazy eukariotycznej**

Przemiany ewolucyjne przebiegające poprzez duplikację, fuzję i różnicowanie genów w toku których powstały znane obecnie Pfk organizmów eukariotycznych przekładają się na ich strukturę trójwymiarową, na sposób pofałdowania łańcuchów polipeptydowych, na sposób oligomeryzacji podjednostek oraz funkcje kieszeni wiążących ligandy.

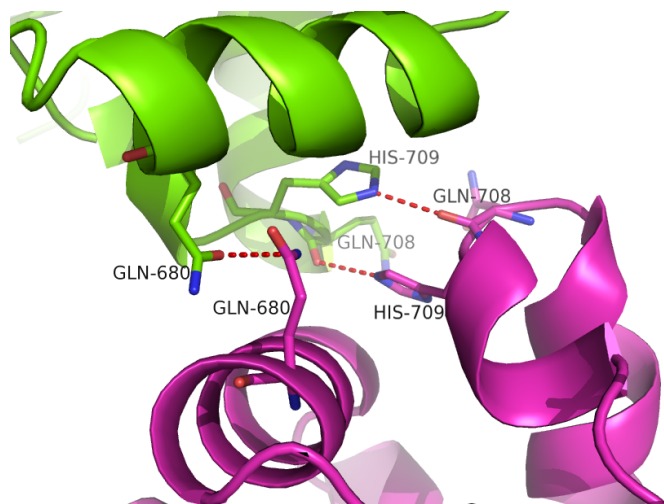
Podjednostki Pfk zarówno z *S. cerevisiae* jak i *O. cuniculus* są więcej niż podwójnej wielkości w stosunku do podjednostki enzymu bakteryjnego. W podjednostkach należących do opisanych tu białek eukariotycznych znaleźć można dwukrotnie powtórzony motyw

strukturalny bakteryjnej podjednostki, inaczej mówiąc dimer bakteryjnego białka. Ponadto wytworzyły się fragmenty łańcuchów charakterystyczne dla enzymu danego eukariotycznego organizmu.

## **Sposób oligomeryzacji podjednostek eukariotycznych**

### **Pfk z *S. cerevisiae***

Pfk z *S. cerevisiae* mimo, iż reprezentuje enzym pochodzący z prostego jednokomórkowego eukariota charakteryzuje się bardziej złożoną architekturą niż Pfk ssaków. Na skutek dodatkowej duplikacji genu, powstały dwa typy podjednostek drożdżowych:  $\alpha$  i  $\beta$ . Dominującym sposobem oligomeryzacji enzymu z *S. cerevisiae* jest forma heterooktameryczna, oktamer był obserwowany w badaniach prowadzonych metodą mikroskopii elektronowej na natywnej formie 21S enzymu (Ruiz, 2003). Ten sam sposób agregacji występuje także w opisaney tu strukturze krystalograficznej yeast-12S-Pfk. Mimo, iż w wyniku przeprowadzonej proteolizy powstał enzym tetrameryczny to w strukturze krystalicznej tetramery 12S oddziałują ze sobą w sposób przypominający natywne oktamer. Za oktameryzację odpowiedzialne są kontakty pomiędzy podjednostkami  $\alpha$ . W kryształach w obu parach podjednostek  $\alpha$  oddziaływania tworzą tylko trzy reszty aminokwasowe każdego łańcucha  $\alpha$  (Rys.52). Nie można jednak wykluczyć, iż w natywnym heterooktamerze sąsiednie łańcuchy  $\alpha$  będą tworzyły większą liczbę wiązań wodorowych. Z badań proteolitycznych wynika (Kopperschläger, 1993), że za tworzenie formy oktamerycznej odpowiada C-terminalny fragment łańcucha  $\alpha$  trawiony przez chymotrypsynę. W strukturze yeast-12S-Pfk widzimy, iż łańcuch został przecięty na C-końcu ale odcięta część łańcucha (reszty 920-980) nie oddysocjowała (patrz str. 60-61). Ten fragment łańcucha, jak wynika ze struktury, nie bierze udziału w oddziaływaniach podjednostek w oktamerze, ale nie można wykluczyć, iż takie oddziaływania tworzy nieobecny w strukturze fragment łańcucha obejmujący reszty 894-919.



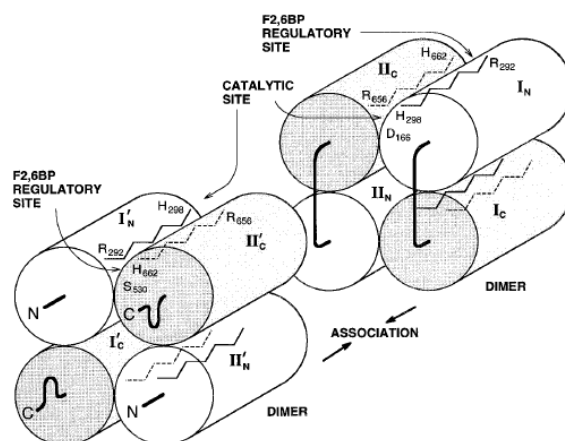
**Rys. 52.** Oddziaływania pomiędzy tetramerami 12S Pfk z *S. cerevisiae* odpowiedzialne za oktameryzację, na przykładzie oddziaływań pomiędzy podjednostką A (kolor zielony) i E (kolor fioletowy). Identyczne oddziaływania występują pomiędzy drugą parą podjednostek  $\alpha$  (C i G).

Przestrzenna aranżacja prokariotycznego homotetrameru o kształcie globularnym została zachowana w strukturze Pfk z *S. cerevisiae* z tą różnicą, iż ze względu na większe rozmiary podjednostki enzymu drożdżowego tetramer bakteryjny odpowiada eukariotycznemu dimerowi. Drożdżowy oktameryzacja składa się z czterech takich dimerów podobnych do bakteryjnego tetrameru.

### **Pfk z *O. cuniculus***

Za pomocą metod mikroskopii elektronowej najczęściej obserwowano występowanie dimerów oraz tetramerów tworzonych przez Pfk z mięśnia szkieletowego królika, a także zauważono tendencje enzymu do tworzenia większych aglomeratów (Parmeggiani, 1966; Telford, 1975; Foe, 1980). Wiadomo, że Pfk ssaka z postaci aktywnego tetrameru może dysocjować do nieaktywnych dimerów i monomerów w wyniku rozcieńczenia. Natomiast, w wysokim stężeniu, może agregować w większe oligomeryczne konformacje wykazujące taką samą aktywność co tetramery (Uyeda, 1979). Wpływ takich czynników jak pH, siła jonowa i temperatura zmienia równowagę pomiędzy tymi formami. Środowisko kwaśne, jak również wysoka siła jonowa i temperatura sprzyjają dysocjacji białka, natomiast środowisko zasadowe, niska siła jonowa i temperatura faworyzuje tworzenie większych aglomeratów (Luther, 1986).

Struktura krystalograficzna RmPfk nie dostarcza informacji na temat wyglądu ssaczego tetrameru. Ułożenie podjednostek RmPfk w sieci krystalicznej nie przypomina sposobu agregacji, jaki obserwowano w strukturze drożdżowej czy bakteryjnej. W strukturze RmPfk obserwujemy najprawdopodobniej formę monomeryczną, wynikającą przypuszczalnie z niskiego pH zastosowanego w procesie krystalizacji. Mimo, iż podjednostki nie wchodzi w skład tetrameru, ich struktura jest stabilna, na co wskazuje wysokie podobieństwo do podjednostek enzymu drożdżowego wchodzącego w skład oktameru.

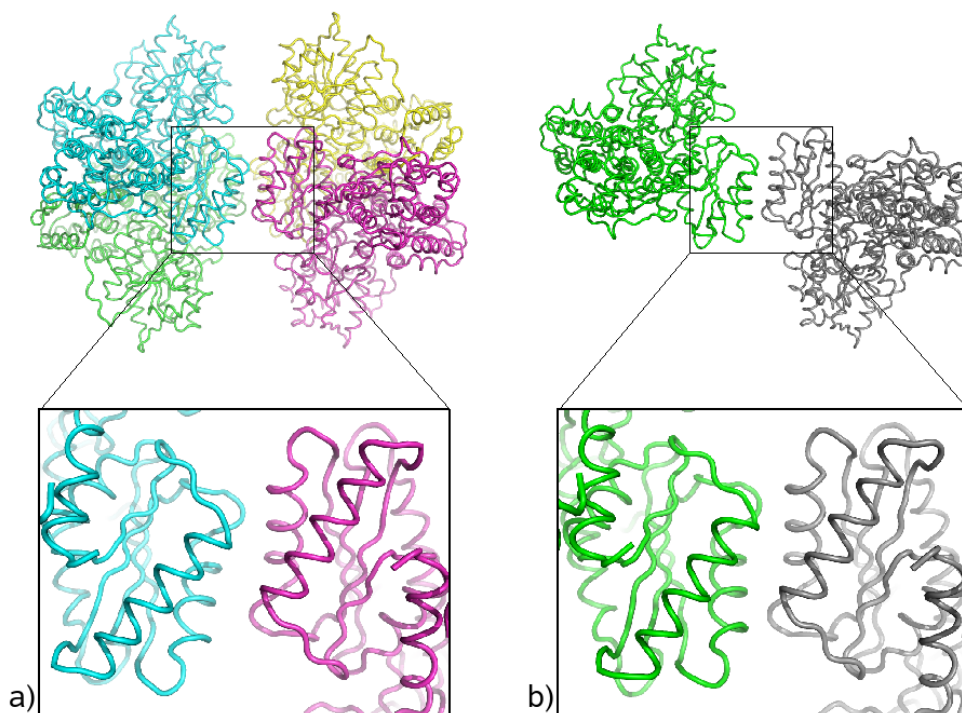


**Rys. 53.** Źródło rysunku: Chang, 2002. Model tetrameru Pfk z mięśnia królika, z zaznaczonym domniemanym miejscem katalitycznym i efektorowym dla Fru2,6-P<sub>2</sub>. Łańcucha  $\beta$  reszty R292-H298 (linia ciągła) w N-terminalnej połowie podjednostki I i jej łańcuch partnerski reszty R656-H662 (linia przerywana) w C-terminalnej połowie w podjednostce II – oddziaływania antyrównoległe.

W literaturze podejmowano próby zaprojektowania tetrameru tworzego przez enzym ssaka, jedną z nich prezentuje rysunek 53 (Chang, 2002). Znajomość struktury yeast-12S-Pfk, pozwala jednak na wyciągnięcie odmiennych wniosków w stosunku do tych przedstawionych na rysunku. Ponieważ enzym ssaka ma bardzo podobną budowę podjednostki w stosunku do podjednostki enzymu z *S. cerevisiae*, można przypuszczać, iż formę dimeryczną oraz tetrameryczną będzie tworzył również w podobny sposób. Jeśli tak było, wówczas zasadnicza różnica w stosunku do modelu zaproponowanego przez profesora Chang i współpracowników (Rys.53) polegałaby na kontaktach podjednostek tworzących dimery. Ze struktury yeast-12S-Pfk wynika, że N-terminalna połowa eukariotycznej podjednostki oddziałuje z N-terminalną połową sąsiedniej podjednostki w dimerze w taki sposób, że terminalne fragmenty sąsiednich podjednostek znajdują się po przeciwległych stronach dimeru. Dalszą konsekwencją takiego stanu rzeczy jest ułożenie miejsc katalitycznych sąsiednich podjednostek pomiędzy ich N-terminalnymi

połówkami. Czyli oba miejsca katalityczne znajdują się z tej samej strony dimeru, a oba miejsca efektorowe, wiążące Fru2,6-P<sub>2</sub>, znajdują się na przeciwległej stronie dimeru. Tymczasem we wcześniej proponowanym modelu (Rys.53) N-terminalna połówka oddziałuje z C-terminalną należącą do sąsiedniej podjednostki, a pomiędzy tymi połówkami znajduje się jedno miejsce katalityczne i jedno efektorowe.

Gdyby dimer Pfk z mięśnia szkieletowego królika wyglądał podobnie do dimeru w strukturze yeast-12S-Pfk, można by przypuszczać, że również tetramer RmPfk byłby podobny do tetramery z *S. cerevisiae*. Jeśli z podjednostek RmPfk wymodelować tetramer poprzez nałożenie czterech ich kopii na cztery podjednostki enzymu drożdżowego tworzące tetramer, wówczas można obserwować, które fragmenty łańcuchów oddziaływałyby ze sobą gdyby taki tetramer powstał. Na rysunku 54-a) przedstawiono taki wymodelowany tetramer z podjednostek RmPfk. Na zbliżeniu widać, że za kontakty pomiędzy dimerami tworzącymi tetramer odpowiadałyby fragmenty helikalne złożone z reszt aminokwasowych od 601 do 605 oraz 632-645. Co ciekawe, oddziaływania tych fragmentów łańcucha są obecne w strukturze krystalograficznej RmPfk pomiędzy podjednostkami związanymi symetrią, a ich wzajemne ułożenie jest bardzo podobne do tego w wymodelowanym tetramerze (Rys.54).



**Rys. 54.** a) tetramer wymodelowany z podjednostek Pfk z mięśnia szkieletowego królika oraz zbliżenie na miejsce kontaktu pomiędzy podjednostkami z sąsiednich dimerów; b) dwie podjednostki związane symetrią w strukturze krystalicznej RmPfk oraz zbliżenie na miejsce kontaktu pomiędzy nimi.

## **Funkcje miejsc wiążących ligandy**

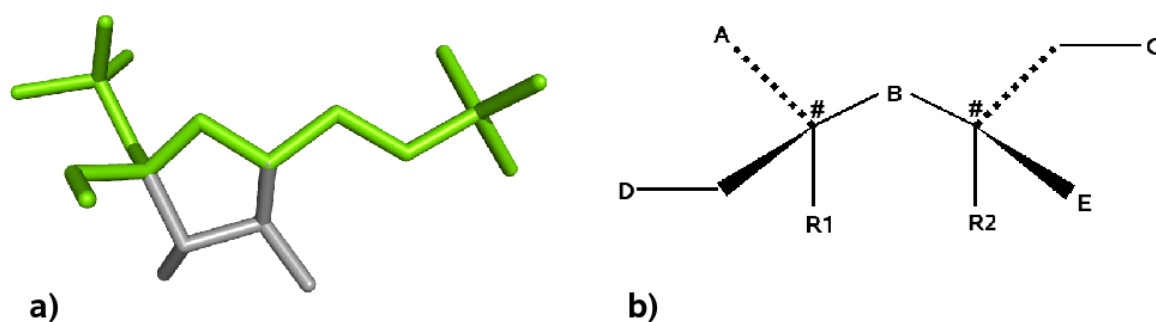
### **Pfk z *S. cerevisiae***

W strukturze yeast-12S-Pfk znaleziono 8 cząsteczek Fru6-P i 8 cząsteczek Fru2,6-P<sub>2</sub>, w każdej podjednostce związała się jedna cząsteczka Fru6-P i jedna Fru2,6-P<sub>2</sub>. Kieszon wiążąca Fru6-P zlokalizowana jest w zagłębieniu pomiędzy subdomenami N-terminalnej domeny, a związany ligand tworzy jednocześnie oddziaływania z resztami aminokwasowymi N-terminalnej domeny sąsiedniej podjednostki w dimerze. Kieszon wiążąca Fru6-P stanowi połowę centrum aktywnego, którego pozostała część tworzy wnękę zdolną do wiązania drugiego substratu - ATP, który nie był obecny w procesie krystalizacji. Miejsce zdolne do wiązania substratu nukleotydowego leży w głębi N-terminalnej domeny nie tworząc oddziaływań z sąsiednią podjednostką. Porównanie struktury enzymu drożdżowego ze strukturą enzymu bakteryjnego wykazuje identyczność większości reszt aminokwasowych tworzących centrum aktywne co sugeruje, iż mechanizm przebiegu katalizowanej reakcji jest taki sam w obu organizmach.

Związanie cząsteczek Fru2,6-P<sub>2</sub> w strukturze yeast-12S-Pfk potwierdziło miejsce wiązania najsilniejszego aktywatora enzymu eukariotycznego, które było wcześniej wnioskowane na podstawie wyników mutagenety (Chang, 2002). Fru2,6-P<sub>2</sub> wiąże się pomiędzy subdomenami C-terminalnej domeny w obu typach podjednostek, tworząc jednocześnie oddziaływania z resztami aminokwasowymi sąsiedniej podjednostki w dimerze. Kieszon wiążąca aktywator ewoluowała z miejsca wiązania Fru6-P w centrum aktywnym enzymu bakteryjnego, a nałożenie prokariotycznego tetrameru na dimer yeast-12S-Pfk powoduje pokrycie się pary bakteryjnych centrów aktywnych z miejscami wiązania eukariotycznego aktywatora. Z tego samego nałożenia wynika, że kieszon wiążąca ATP w centrum katalitycznym podjednostki enzymu bakteryjnego uległa zanikowi podczas formowania się miejsca efektorowego Fru2,6-P<sub>2</sub> w enzymie eukariotycznym. To wyklucza wcześniejsze przypuszczenia niektórych badaczy mówiące o tym, iż z kieszeni tej ewoluowało miejsce wiązania ATP jako inhibitora (Li, 1999) lub też ADP/AMP jako aktywatora (Kemp, 2002).

Struktura yeast-12S-Pfk pozwoliła na określenie sposobu wiązania Fru2,6-P<sub>2</sub> w kieszeni aktywatora. Posiadanie szczegółowego modelu kieszeni wiążącej Fru2,6-P<sub>2</sub> stanowić może matrycę umożliwiającą projektowanie związków innych niż natywny ligand lecz posiadających z nim cechy wspólne, a wywołujących efekt silniejszej aktywacji lub inhibicji. Dzięki analizie oddziaływań w miejscu efektorowym określono tą część cząsteczki

aktywatora, która może tworzyć największą liczbę wiązań wodorowych z łańcuchami białka, a tym samym mieć największy wpływ na funkcjonowanie enzymu (Rys.55-a). Modyfikacje szczególnie w tej części liganda z uwzględnieniem charakteru tworzonych oddziaływań i uwarunkowań sterycznych mogą dać początek nowej grupie efektorów eukariotycznego enzymu (Tabela 18, Rys.55-b). Najważniejsza dla nowego aktywatora jest obecność grupy „C” odpowiadającej grupie fosforanowej 6 w naturalnym aktywatorze Fru2,6-P<sub>2</sub>. Grupa „C” wiąże sąsiednią podjednostkę i stabilizuje czwartorzędową strukturę w formie aktywnej. Natomiast brak podstawnika w miejscu „C” (obecność atomu wodoru) mogłyby prowadzić do otrzymania inhibitora. Taki związek blokowałby miejsce efektorowe stabilizując enzym w jego nieaktywnej konformacji. Poszukiwanie sposobów aktywacji Pfk może mieć zastosowanie w aspektach medycznych związanych np. z zaburzeniami metabolizmu takimi jak choroba Taruięgo dotycząca bezpośrednio fosfofruktokinazy i polegająca na jej niewydolności. Natomiast aktywacja metabolizmu drożdży może mieć zastosowanie np. w przemyśle browarniczym, gorzelnicznym lub w przypadku przemysłowej syntezy chemicznej. Ponieważ prezentowana struktura jako pierwsza ukazuje model miejsca wiązania eukariotycznego aktywatora, współrzędne atomowe kieszeni efektorowej oraz związanej z nią cząsteczki Fru2,6-P<sub>2</sub> zostały zastrzeżone prawem patentowym (numery zgłoszeń patentowych: P383866, P383868).



**Rys. 55.** a) cząsteczka aktywatora, Fru2,6-P<sub>2</sub>, kolorem zielonym zaznaczono tą część cząsteczki, która tworzy najwięcej oddziaływań z białkiem; b) schemat potencjalnego efektoru enzymu ssaczego, którego poszczególne reszty mogą zmieniać się zgodnie z Tabelą 18.



**Tabela 18.** Przykłady modyfikacji aktywatora w kierunku nowych związków o potencjalnym charakterze aktywacyjnym.

A, C	B	D	E	#	R1 <sup>§</sup>	R2 <sup>§</sup>
-PO4	-O- grupa eterowa	-PO4	-H	atom C o hybrydyzacji sp <sup>3</sup>	-CH-OH   X	-CH-OH   X
-SO4	-S- grupa tioeterowa	-SO4			-C=O   X	-C=O   X
-C-SO2O		-OH			-H	-H
		-C-SO2O				

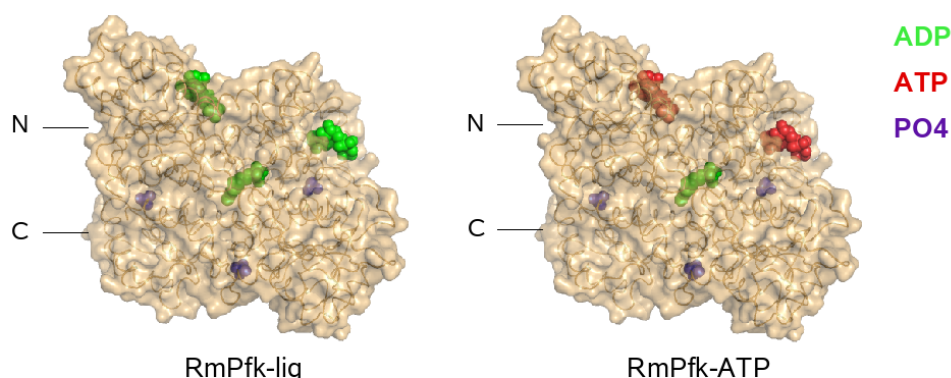
<sup>§</sup> X w kolumnach R1 i R2 oznacza atom wodoru lub wiązanie do sąsiedniego R lub też wiązanie do sąsiedniego R poprzez grupę -CH<sub>2</sub>-.

### **Pfk z *O. cuniculus***

Fosfofruktokinaza eukariotyczna jest skomplikowanym enzymem ze względu na możliwość wiązania się z dużą liczbą ligandów. W strukturach RmPfk znaleziono w każdej podjednostce trzy cząsteczki nukleotydu oraz trzy cząsteczki jonów fosforanowych. Ze względu na słabą rozdzielczość oraz brak tworzenia stabilnego tetrameru, jednoznaczna definicja miejsc w których związały się ligandy nie jest możliwa. W podjednostce struktury RmPfk-lig związały się trzy cząsteczki ADP, natomiast w strukturze RmPfk dwie z nich zostały zastąpione przez cząsteczki ATP pochodzące z roztworu krioprotekcyjnego (Rys.56).

W miejscu aktywnym podjednostek związała się, zależnie od struktury, cząsteczka ADP lub ATP. Reszty aminokwasowe tworzące kieszeń katalityczną są silnie zachowane z stosunku do enzymu drożdżowego i bakteryjnego. Wnęka wiążąca substrat cukrowy w strukturach z *O. cuniculus* jest pusta mimo obecności Fru6-P w kropli krystalizacyjnej, prawdopodobnie ze względu na brak prawidłowej struktury czwartorzędowej i oddziaływań ze strony sąsiedniego łańcucha, który najprawdopodobniej na wzór struktury yeast-12S-Pfk powinien tworzyć wiązania wodorowe z ligandem.

W centralnej części podjednostki w obu strukturach związała się cząsteczka ADP. Miejsce to zarówno w enzymie bakteryjnym jak i drożdżowym nie było obserwowane jako miejsce wiążące ligand. Wiązanie liganda w tym miejscu wydaje się być nieprzypadkowe z dwóch powodów, po pierwsze: cząsteczka ADP nie została tu zastąpiona przez cząsteczkę ATP podczas przygotowywania drugiego kryształu, po drugie: reszta adeniny ADP ułożona jest pomiędzy dwoma pierścieniami fenyloalaniny tworząc z nimi oddziaływania warstwowe. Można przypuszczać, iż jest to miejsce wiązania ADP jako aktywatora.



**Rys. 56.** a) podjednostka enzymu w strukturze RmPfk-lig; b) podjednostka enzymu w strukturze RmPfk-ATP; kolorami oznaczono poszczególne ligandy: ADP – zielony, ATP – czerwony, PO4 - fioletowy.

W subdomenie mniejszej N-terminalnej połowy związała się trzecia cząsteczka nukleotydu, którą zależnie od struktury jest ADP lub ATP. W tej lokalizacji również wcześniej nie obserwowano miejsca wiązania. Cząsteczka nukleotydu grupą adeninową skierowana jest do wnętrza białka tworząc oddziaływania warstwowe z grupą boczną tryptofanu. Grupy fosforanowe nukleotydu są natomiast wystawione na działanie środowiska. Zidentyfikowana kieszeń potencjalnie może być miejscem wiązania inhibitora ATP, jak również jedynie efektem procesu krystalizacji. Fakt, iż w miejscu tym wiąże się również ADP, a część fosforanowa jest mocno wystawiona na działanie środowiska nie przemawia za zdefiniowaniem tego miejsca jako miejsca wiązania allosterycznego inhibitora ATP.

Jeden ze związanych jonów fosforanowych znajduje się w kieszeni wiązania aktywatora Fru2,6-P<sub>2</sub>, w położeniu w którym wiąże się grupa fosforanowa aktywatora w pozycji 2. Cząsteczka Fru2,6-P<sub>2</sub> nie związała się w tym miejscu najprawdopodobniej ze względu na brak prawidłowych oddziaływań ze strony sąsiedniego łańcucha.

Dwa pozostałe jony fosforanowe zostały zlokalizowane w miejscach odpowiadających bakteryjnym miejscom efektorowym wiążącym zarówno ADP jak i PEP. Wynika stąd, iż miejsca te zostały zachowane w enzymie eukariotycznym, ale na temat ich roli można jedynie spekulować. Zbliżony charakter aminokwasowy kieszeni w enzymie eukariotycznym w stosunku do enzymu bakteryjnego pozwala przypuszczać, iż mógłby się tu również wiązać nukleotyd (być może ATP jako inhibitor), z drugiej jednak strony nie uległ on związaniu mimo obecności w roztworze. Nie można wykluczyć, iż drugi inhibitor, cytrynian,

ze względu na swój charakter chemiczny mógłby tworzyć oddziaływania wodorowe z resztami argininy obecnymi w kieszeni, ponieważ nie zastosowano cytrynianu podczas krystalizacji nie można potwierdzić tej tezy.

W literaturze na podstawie wyników mutagenyzy kieszeń zlokalizowaną w sąsiedztwie N- i C-końców określono jako wiążącą cytrynian (Li, 1999; Chang, 2002), a tą znajdującą się w pobliżu pętli łączącej dwie domeny jako wiążącą inhibitorowy ATP (Chang, 2002) bądź aktywator AMP (Li, 1999). Dane krystalograficzne nie pozwalają na rozstrzygnięcie tej kwestii.

## **Mutacje sekwencji aminokwasowej Pfk związane z chorobą Taruiego**

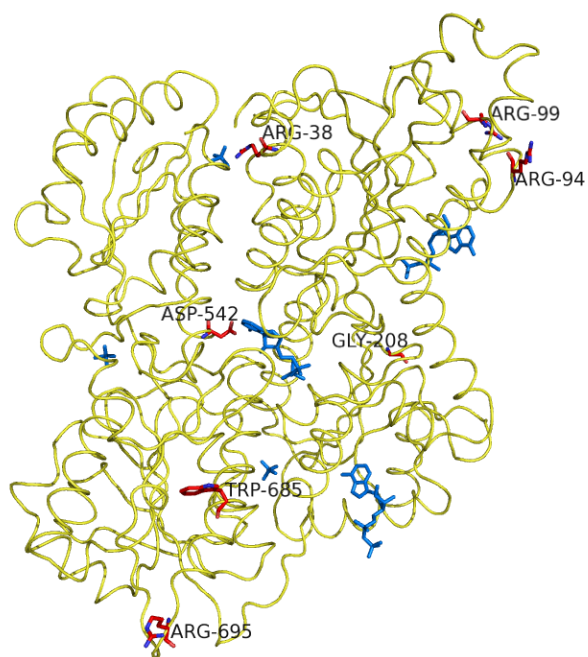
Możliwość analizy modelu struktury Pfk z mięśnia szkieletowego królika, którego sekwencja wykazuje 96% podobieństwo z sekwencją Pfk z mięśnia człowieka (HmPfk) pozwala rozważać, w którym miejscu w strukturze zlokalizowane są mutacje reszt aminokwasowych wywołujące symptomy choroby Taruiego.

Mutacje wykryte u chorych dotkniętych chorobą dotyczą: Arg38Pro/Leu, Arg94X, Arg99Gln, Gly208Asp, Asp542Ala, Trp685Cys, Arg695His (Nakajima, 2002). Te same reszty występują w Pfk z mięśnia szkieletowego królika. Ich lokalizację przedstawia rysunek 57, z którego wynika, iż Arg38 tworzy wiązania wodorowe z jonem fosforanowym związanym w pobliżu odcinków terminalnych, reszta Gly208 znajduje się w miejscu wiązania Fru6-P w centrum aktywnym, natomiast reszta Asp542 oddziałuje z adeniną cząsteczki ADP związanej w centrum podjednostki. Pozostałe cztery reszty aminokwasowe (Arg94, Arg99, Trp685, Arg695) zlokalizowane są w zewnętrznych partiach podjednostki. Powyższe obserwacje, wskazują na znaczenie oraz nieprzypadkowość miejsca, w którym związała się cząsteczka ADP w centralnej części podjednostki oraz miejsca wiążącego jon fosforanowy. Pozostałych mutacji nie można wytłumaczyć w oparciu o niniejszy model krystalograficzny. Być może ich miejsca odpowiadają oddziaływaniom z innymi cząsteczkami w żywej komórce, takimi jak struktury cytoszkieletu, z którymi oddziałuje Pfk (Beitner, 1993).

**Tabela 19.** Porównanie sekwencji fosfofruktokinazy z mięśnia królika i człowieka. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsca mutacji wykrytych w enzymie człowieka w związku z chorobą Taruiego.

HmPfk	THEEHHAAKTLGIGKAI AVL TSGGDAQGMNAAVRAVVRVGI FTGARVFFVHEGYQGLVDG	60
RmPfk	THEEHHAARTLGVGKAI AVL TSGGDAQGMNAAVRAVVRVGI FTGARVFFVHEGYQGLVDG	60
	*****;***:*****	
HmPfk	GDHIKEATWESVSMMLQLGGTVIGSARCKDFREREGRLRAAYNLVKRGITNLCVIGGDGS	120
RmPfk	GDHIREATWESVSMMLQLGGTVIGSARCKDFREREGRLRAAHNLVKRGITNLCVIGGDGS	120
	****:*****;*****	
HmPfk	LTGADTFRSEWSDLLSDLQKAGKITDEEATKSSYLNIVGLVGSIDNDFCGTDMTIGTDSA	180
RmPfk	LTGADTFRSEWSDLLSDLQKAGKITAEATRSSYLNIVGLVGSIDNDFCGTDMTIGTDSA	180
	***** *****:*****	
HmPfk	LHRIMEIVDAITTTAQSHQRTFVLEVMGRHCGYLALVTSLSGADWVFIPECPPDDDDWEE	240
RmPfk	LHRITEIVDAITTTAQSHQRTFVLEVMGRHCGYLALVTSLSGADWVFIPECPPDDNWED	240
	**** *****:***	
HmPfk	HLCRRLSETRTRGSRNLNIIIVAEGAIDKNGKPI TSEDIKNLVVKRLGYDTRVTVLGHVQR	300
RmPfk	HLCRRLSETRTRGSRNLNIIIVAEGAIDRNGKPI TSEGVDLVVRRVRLGYDTRVTVLGHVQR	300
	*****:*****;***:*****	
HmPfk	GGTPSAFDRILGSRMGVEAVMALLEGTPDTPACVVSLSGNQAVRLPLMECVQVTKDVTKA	360
RmPfk	GGTPSAFDRILGSRMGVEAVMALLEGTPDTPACVVSLSGNQAVRLPLMECVQVTKDVTKA	360
	*****	
HmPfk	MDEKKFDEALKLRGRSFMNWEVYKLLAHVRPPVSKSGSHTVAVMNVGAPAAGMNAAVRS	420
RmPfk	MDEKRFDEAMKLRGRSFMNWEVYKLLAHIRPPAPKSGSYTVAVMNVGAPAAGMNAAVRS	420
	****:****:*****:***.****:*****	
HmPfk	TVRIGLIQGNRVLVVDHGFEGFLAKGQIEEAGWSYVGGWTGQGGSKLGTKRTLPKKSFEQI	480
RmPfk	TVRIGLIQGNRVLVVDHGFEGPAKGQIEEAGWSYVGGWTGQGGSKLGTKRTLPKKSFEQI	480
	***** *****:*****	
HmPfk	SANITKFNIQGLVIIGGFEAYTGGLLEMEGRKQFDEL CIPFVVIPATVSNNVPGSDFSVG	540
RmPfk	SANITKFNIQGLVIIGGFEAYTGGLLEMEGRKQFDEL CIPFVVIPATVSNNVPGSDFSVG	540
	*****	
HmPfk	ADTALNTICTTCDRIKQSAAGTKRRVFI IETMGGYCGYLATMAGLAAGADAAYIFEFPFT	600
RmPfk	ADTALNTICTTCDRIKQSAAGTKRRVFI IETMGGYCGYLATMAGLAAGADAAYIFEFPFT	600
	*****	
HmPfk	IRDLQANVEHLVQKMKTTVKRGLVLRNEKCNENYTTDFIFNLYSEEKGI FDSRKNVLGH	660
RmPfk	IRDLQANVEHLVQKMKTTVKRGLVLRNEKCNENYTTDFIFNLYSEEKGI FDSRKNVLGH	660
	*****	
HmPfk	MQQGSPTPFDRNFATKMGAKAMNWMMSGKIKESYRNGRIFANTPDSGCVLGMRKRALVFQ	720
RmPfk	MQQGSPTPFDRNFATKMGAKAMNWMAGKIKESYRNGRIFANTPDSGCVLGMRKRALVFQ	720
	*****:*****	
HmPfk	PVAELKDQTD FEHRIPKEQWWLKLRLPILKILAKYEIDLDTSDHAHLEHITRKRSGEAAV	779
RmPfk	PVTELQNQTD FEHRIPKEQWWLKLRLPILKILAKYEIDLDTSEHAHLEHISRKRSGEATV	779
	**:*:*:*****:*****:*****:*	

\* identyczne reszty aminokwasowe; : reszty o tym samym charakterze chemicznym; . reszty o zbliżonym charakterze chemicznym



**Rys. 57.** Podjednostka RmPfk-ATP z zaznaczonymi resztami (kolor czerwony), których mutacje wykryto u osób cierpiących na chorobę Taruiego, ligandami związane ze strukturą zaznaczono w kolorze niebieskim.

## **Podsumowanie**

Celem niniejszej pracy była szeroko pojęta analiza struktur rentgenograficznych fosfofruktokinazy pochodzącej z jednokomórkowego organizmu eukariotycznego *S. cerevisiae* oraz z mięśnia szkieletowego *O. cuniculus* jako przedstawiciela zwierząt wyższych.

Analiza porównawcza struktur enzymów eukariotycznych i prokariotycznych ujawniła istniejące między nimi podobieństwa i różnice. Istniejące różnice w sposobie kontroli enzymów, w sekwencjach aminokwasowych, w wielkości podjednostek i stopniu oligomeryzacji oraz w miejscach wiązania ligandów stanowią unikalne cechy poszczególnych białek będące obiecującym celem podczas poszukiwania lub projektowania specyficznie działających reagentów w badaniach farmakologicznych i biotechnologicznych. Elementy zmienne pozwalają nie tylko wyodrębnić potencjalne cele terapeutyczne, ale także głębiej zrozumieć ewolucję metabolizmu i jego kontroli w tych organizmach. Natomiast zachowawczość tak sekwencyjna jak i strukturalna w cząsteczkach białek zwraca uwagę na najistotniejsze cechy struktury cząsteczki lub mechanizmu reakcji w obliczu ewolucji. Wyróżnienie elementów wspólnych w strukturach enzymów o tej samej funkcji, choć pochodzących z różnych organizmów, wskazuje na fragmenty cząsteczki, których zachowanie ma istotne znaczenie między innymi dla utrzymania funkcji enzymu.

## Literatura

- Alves G., Sola-Penna, M.,** (2003). Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase. *Mol. Gen. Met.* **78**, 302-306.
- Aman, R. A., Kenyon, G. L., Wang, C. C.,** (1985). Cross-linking of the enzymes in the glycosome of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **260**, 6966–6973.
- Andrés, V., Carreras, J., Cusso, R.,** (1996). Myofibrilbound muscle phosphofructokinase is less sensitive to inhibition by ATP than the free enzyme, but retains its sensitivity to stimulation by bisphosphorylated hexoses. *Int. J. Biochem.* **28**, 1179-1184.
- Arnold, H., Henning, R., Pette, D.,** (1971). Quantitative comparison of the binding of various glycolytic enzymes to F-actin and the interaction of aldolase with G-actin. *Eur. J. Biochem.* **22**, 121-126.
- Arnold, H., Pette, D.,** (1968). Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of the muscle. *Eur. J. Biochem.* **6**, 163-177.
- Ashkenazy-Shahar, M., Ben-Porat, H., Beitner, R.,** (1998). Insulin stimulation binding of phosphofructokinase to cytoskeleton and increases glucose 1,6-bisphosphate levels in NIH-3T3 fibroblasts, which is prevented by calmodulin antagonists. *Mol. Gen. Met.* **65**, 213-219.
- Bär, J., Huse, K., Kopperschläger, G., Behlke, J., Schultze, W.,** (1988). *Int. J. Biol. Macromolecul.* **10**, 99-105.
- Bär, J., Schellenberger, W., Kopperschläger, G.,** (1997). Purification and characterization of phosphofructokinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **13**, 1309–1317.
- Bárcena, M., Radermacher, M., Bär, J., Kopperschläger, G., Ruiz, T.,** (2007). The structure of the ATP-bound state of *S. cerevisiae* phosphofructokinase determined by cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **159**, 135–143.
- Bartrons, R., Van Schaftingen, E., Vissers, S., Hers, H. G.,** (1982). The stimulation of yeast phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate. *FEBS Lett.* **143**, 137-40.
- Beitner, R.,** (1993). Control of glycolytic enzymes through binding to cell structures and by glucose 1,6-bisphosphate under different conditions. The role of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Int J Biochem.* **25**, 297-305.
- Berger, S. A., Evans, P. R.,** (1992). Site-Directed Mutagenesis Identifies Catalytic Residues in the Active Site of *Escherichia coli* Phosphofructokinase. *Biochemistry* **31**, 9237-9242.



**Blangy, D.**, (1968). Phosphofructokinase from *E. coli*: evidence for a tetrameric structure of the enzyme. *FEBS Letters* **2**, 109–111.

**Bradford, M. M.**, (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

**Brünger, A. T.**, (1993). Assessment of phase accuracy by cross validation: the free *R* value. Methods and applications. *Acta Cryst.* **D49**, 24-36.

**Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kuntze, R. W.,** (1998). Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905–921.

**Chang, S. H., Kemp, R. G.**, (2002). Role of Ser530, Arg292, and His662 in the allosteric behavior of rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **290**, 670-675.

**Chen-Zion, M., Bassukevitz, Y., Beitner, R.**, (1992). Sequence of insulin effects on cytoskeletal and cytosolic phosphofructokinase, mitochondrial hexokinase, glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate levels, and the antagonistic action of calmodulin inhibitors, in diaphragm muscle. *Int. J. Biochem.* **24**, 1661-1667.

Collaborative Computational Project Number 4. (1994). The CCP4 suite: program for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.

**Cronin, C. N., Tipton, K. F.**, (1985). Purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei*. *Biochem. J.* **227**, 113–124.

**Cronin, C. N., Tipton, K. F.**, (1987). Kinetic studies on the reaction catalysed by phosphofructokinase from *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **245**, 13–18.

**DeLano, W. L.**, (2002). The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>

**Dunaway, G. A., Kasten, T.P.**, (1985). Nature of the rat brain 6-phosphofructo-1-kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* **260**, 4180-4185.

**El-Bacha, T., de Freitas, M. S., Sola-Penna, M.**, (2003). Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Mol. Genet. Metab.* **79**, 294-299.

**Emsley, P., Cowtan, K.,** (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **D60**, 2126-2132.

**Engh, R. A., Huber, R.,** (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.

**Evans, P. R.,** (1992). Activity and allosteric regulation in bacterial phosphofruktokinase. "The Robert A. Welch Foundation Conference on Chemical Research XXXVI Regulation of Protein by Ligand" which was held in Houston, Texas, October 26-27.

**Evans, P. R., Farrants, G. W., and Hudson, P. J.,** (1981). Phosphofruktokinase: structure and control. *Philos. Trans. R. Soc. London B* **293**, 53-62.

**Foe, L. G., Trujillo, J. L.,** (1980). Quaternary structure of pig liver phosphofruktokinase. *J. Biol. Chem.* **255**, 10537-10541.

**French, S., Wilson, K.,** (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst.* **A34**: 517-525.

**Garman, E.,** (1999). Cool data: quantity and quality. *Acta Cryst.* **D55**, 1641-1653.

**Heinisch, J.,** (1986). Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofruktokinase in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 75-82.

**Heinisch, J., Ritzel, R.G., von Borstel, R.C., Aguilera, A., Rodicio, R., Zimmermann, F.K.,** (1989). The phosphofruktokinase genes of yeast evolved from two duplication events. *Gene* **78**, 309-321.

**Hellings, H. W., Evans, P. R.,** (1987). Mutations in the Active Site of *Escherichia coli* Phosphofruktokinase. *Nature* **327**, 437-439.

**Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.,** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.

**Hofer, H.W.,** (1987). Regulatory properties and the development of structure in phosphofruktokinase. *Arch. Biol. Med. Exp.* **20**, 359-70.

**Hofmann, E., Kopperschläger, G.,** (1982). Phosphofruktokinase from yeast. *Methods Enzymol.* **90**, 49-60.

**Jarvest, R. L., Lowe, G., Potter, B. V. L.,** (1981). The stereochemical course of phosphoryl transfer catalysed by *Bacillus stearothermophilus* and rabbit skeletal-muscle phosphofruktokinase with a chiral [<sup>16</sup>O,<sup>17</sup>O,<sup>18</sup>O]phosphate ester. *Biochem. J.* **199**, 427-432.

**Kabsch W.,** (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst.* **A32**, 922-923.

**Kabsch, W., Sander, C.,** (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical feature. *Biopolymers* **22**: 2577-2637.

**Kemp, R.G. and , D.,** (2002). Evolution of the allosteric ligand sites of mammalian phosphofruktokinase. *Biochemistry* **41**, 9426–9430.

**Kemp, R. G., Foe, L. G.,** (1983). Allosteric regulatory properties of muscle phosphofruktokinase. *Mol. Cell Biochem.* **57**, 147–154.

**Kemp, R. G., Fox, R. W., and Latshaw, S. P.,** (1987). Amino acid sequence at the citrate allosteric site of rabbit muscle phosphofruktokinase. *Biochemistry* **26**, 3443–3446.

**Kessler, R., Nissler, K., Schellenberger, W., Hofmann, E.,** (1982). Fructose-2,6-bisphosphate increases the binding affinity of yeast phosphofruktokinase to AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 506–510.

**Kopperschläger, G., Bär, J., Nissler, K., Hofmann, E.,** (1977). Physicochemical parameters and subunit composition of yeast phosphofruktokinase. *Eur. J. Biochem.* **81**, 317–325.

**Kopperschläger, G., Bär, J., Stellwagen, E.,** (1993). Limited proteolysis of yeast phosphofruktokinase. Sequence locations of cleavage sites created by the actions of different proteinases. *Eur. J. Biochem.* **217**, 527-533.

**Kricke, J., Mayer, F., Kopperschlager, G., Kriegel, T.,** (1999). Phosphofruktokinase-1 from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of molecular structure and function by electron microscopy and self-catalysed affinity labelling. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 27–35.

**Laine, R., Deville-Bonne, D., Auzat, I., Garel, J-R.,** (1992). Interaction between the carboxyl group of Asp127 and Asp129 in the active site of *Escherichia coli* Phosphofruktokinase. *Eur. J. Biochem.* **207**, 1109-1114.

**Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M.,** (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283–291.

- Lau, F. T., and Fersht, A. R.,** (1989). Dissection of the effector-binding site and complementation studies of *Escherichia coli* phosphofruktokinase using site-directed mutagenesis, *Biochemistry* **28**, 6841-6847.
- Laurent, M., Chaffotte, A.F., Tenu, J.P., Roucous, C., Seydoux, F.J.,** (1978). Binding of nucleotides AMP and ATP to yeast phosphofruktokinase: evidence for distinct catalytic and regulatory subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 646–652.
- Laurent, M., Seydoux, F.J., Dessen, P.,** (1979). Allosteric regulation of yeast phosphofruktokinase. Correlation between equilibrium binding, spectroscopic and kinetic data. *J. Biol. Chem.* **254**, 7515-7520.
- Le Bras, G., Deville-Bonne, D., and Garel, J. R.,** (1991). Purification and properties of the phosphofruktokinase from *Lactobacillus bulgaricus*. A non-allosteric analog of the enzyme from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* **198**, 683-687.
- Li, Y., Lau, F. T., and Fersht, A. R.,** (1989). Dissection of the effector-binding site and complementation studies of *Escherichia coli* phosphofruktokinase using site-directed mutagenesis, *Biochemistry* **28**, 6841-6847.
- Rivera, D., Ru, W., D., and Kemp, R. G.,** (1999). Identification of allosteric sites in rabbit phosphofruktokinase. *Biochemistry* **38**, 16407–16412.
- López, C., Chevalier, N., Hannaert, V., Rigden, D. J., Michels, P. A. M., Ramirez, J. L.,** (2002). *Leishmania donovani* phosphofruktokinase: gene characterization, biochemical properties and structure-modelling studies. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3978–3989.
- Lorberg, A., Kirchrath, L., Ernst, J.F., Heinisch, J.J.,** (1999). Genetic and biochemical characterization of phosphofruktokinase from the opportunistic pathogenic yeast *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* **260**, 217–226.
- Luther, M. A., Cai, G.-Z. and Lee, J. C.,** (1986) Thermodynamics of dimer and tetramer formations in rabbit muscle phosphofruktokinase. *Biochemistry* **25**, 7931–7937.
- Łangowska, K.,** (2005). O małej cząsteczce chemicznej niezbędnej do istnienia życia na naszej planecie. *Wydawnictwo Naukowe UAM*.
- Martinez-Oyanedel, J., McNae, I. W., Nowicki, M. W., Keillor, J. W., Michels, P. A. M., Fothergill-Gilmore, L. A.,** (2007). The First Crystal Structure of Phosphofruktokinase from a Eukaryote: *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* **366**, 1185–1198.

**McCoy, A. J., Grosse-Kuntze, R. W., Storoni, L. C., Read, R. J.,** (2005). Likelihood enhanced fast translation functions. *Acta Cryst.* **D61**, 458–464.

**McRee, D. E.,** (1999). XtalView/Xfit: A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J Struct. Biol.* **125**: 156-165.

**Michels, P. A. M., Chevalier, N., Opperdoes, F. R., Rider, M. H., Rigden, D. J.,** (1997). The glycosomal ATP-dependent phosphofruktokinase of *Trypanosoma brucei* must have evolved from an ancestral pyrophosphate-dependent enzyme. *Eur. J. Biochem.* **250**, 698–704.

**Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J.,** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst* **D53**, 240-255.

**Nakajima, H., Raben, N., Hamaguchi, T., Yamasaki, T.,** (2002). Phosphofruktokinase deficiency; past, present and future. *Curr Mol Med.* **2**, 197-212.

**Nakamura, K., Nakajima, Y., Nakamura, Y.,** (1986). Suppression of glucose utilization of murine peritoneal exudate macrophages by body fluids from cancer patients and identification of the susceptible enzyme. *J. Natl. Cancer. Inst.* **77**, 1035-1038.

**Narabayashi, H., Lawson, J. W., Uyeda, K.,** (1985). Regulation of phosphofruktokinase in perfused rat heart. Requirement for fructose 2,6-bisphosphate and a covalent modification. *J. Biol. Chem.* **260**, 9750-9758.

**Navaza, J.,** (1994). AmoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.

**Navaza, J.,** (2001). Implementation of molecular replacement in AmoRe. *Acta Cryst.* **D57**, 1367-1372.

**Nissler, K., Hofmann, E., Stel'maschuk, V., Orlova, E., Kiselev, N.,** (1985). An electron microscopy study of the quaternary structure of yeast phosphofruktokinase. *Biomed. Biochim. Acta* **44**, 251–259.

**Nissler, K., Kessler, R., Schellenberger, W., Hofmann, E.,** (1977a). Binding of fructose-6-phosphate to phosphofruktokinase from yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 973–978.

**Nissler, K., Schellenberger, W., Hofmann, E.,** (1977b). Binding of MgATP to yeast phosphofruktokinase. *Acta Biol. Med. Ger.* **36**, 1027–1033.

Otwinowski, Z., Minor, W., (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.

Paricharttanakul, N. M., Ye, S., Menefee, A. L., Javid-Majd, F., Sacchettini, J. C., Reinhart, G. D., (2005). Kinetic and Structural Characterization of Phosphofruktokinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochemistry* **44**, 15280-15286.

Parmeggiani, A., Luft, J. H., Love, D. S., Krebs, E. G., (1966). Crystallization and properties of rabbit skeletal muscle phosphofruktokinase. *J. Biol. Chem.* **241**, 4625-4637.

Plietz, P., Damaschun, G., Kopperschläger, G., Müller, J.J., (1978). Small-angle X-ray scattering studies on the quaternary structure of phosphofruktokinase from baker's yeast. *FEBS Lett.* **91**, 230-232.

Poorman, R.A., Randolph, A., Kemp, R.G., Heinrikson, R.L., (1984). Evolution of phosphofruktokinase—gene duplication and creation of new effector sites. *Nature* **309**, 467–469.

Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V., (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99.

Reuter, R., Eschrich, K., Schellenberger, W., Hofmann, E., (1979). Kinetic modelling of yeast phosphofruktokinase. *Acta Biol. Med. Ger.* **38**, 1067–1079.

Reuter, R., Naumann, M., Bär, J., Haferburg, D., Kopperschläger, G., (2000). Purification, molecular and kinetic characterization of phosphofruktokinase-1 from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for an unusual subunit composition. *Yeast* **16**, 1273–1285.

Riley-Lovingshimer, M. R., Ronning, D. R., Sacchettini, J.C., Reinhart, G.D., (2002). Reversible ligand-induced dissociation of a tryptophan-shift mutant of phosphofruktokinase from *Bacillus Stearothermophilus*. *Biochemistry* **41**, 12967.

Rossmann, M. G., Blow, D. M., (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.

Roussel, A., Cambillau, C., (1991). *Silicon Graphics Geometry Partners Directory*, p. 86. Mountain View, CA, USA: Silicon Graphics.

Ruiz, T., Kopperschläger, G., Radermacher, M., (2001). The first three-dimensional structure of phosphofruktokinase from *Saccharomyces cerevisiae* determined by electron microscopy of single particles. *J. Struct. Biol.* **136**, 167–180.

- Ruiz, T., Mechin, I., Bär, J., Rypniewski, W., Kopperschläger, G., Radermachera, M.,** (2003) The 10.8-Å structure of *Saccharomyces cerevisiae* phosphofruktokinase determined by cryoelectron microscopy: localization of the putative fructose 6-phosphate binding sites. *J. Struct. Biol.* **143**, 124-134.
- Shirakihara, Y., Evans, P.R.,** (1988). Crystal structure of the complex of phosphofruktokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* **204**, 973–994.
- Schirmer, T., and Evans, P. R.,** (1990). Structural basis of the allosteric behavior of phosphofruktokinase. *Nature* **343**, 141–145.
- Schwartz, D., Beitner, R.,** (2000). Detachment of the glycolytic enzymes, phosphofruktokinase and aldolase, from cytoskeleton of melanoma cells, induced by local anesthetics. *Mol. Genet. Metab.* **69**, 159–164.
- Silva, A. P., Alves, G. G., Araujo, A. H. and Sola-Penna, M.,** (2004) Effects of insulin and actin on phosphofruktokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle. *An. Acad. Bras. Cienc.* **76**, 541–548.
- Sols, A.,** (1981). Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Top. Cell. Regul.* **19**, 77–101.
- Telford, J. N., Lad, P. M., Hammes, G. G.,** (1975). Electron microscope study of native and crosslinked rabbit muscle phosphofruktokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 3054-3056.
- Teng, T. Y. J.,** (1990). Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing thin film. *J. Appl. Cryst.* **23**, 387-391.
- Tijane, M.N., Seydoux, F.J., Hill, M., Roucoux, C., Laurent, M.,** (1979). Octameric structure of yeast phosphofruktokinase as determined by crosslinking with disuccinimidyl beta-hydroxymuconate. *FEBS Lett.* **105**, 249–253.
- Uyeda, K.,** (1979). Phosphofruktokinase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **48**, 193–244.
- Wang, B. C.,** (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods. Enzymol.* **115**, 90-112.
- Wilson, A. J. C.,** (1950). Largest likely values for the reliability index. *Acta Cryst.* **3**, 397-398.
- Vinuela, E., Salas, M. L., Sols, A.,** (1963). End-product inhibition of yeast phosphofruktokinase by ATP. *Biochem Biophys Res Commun.* **12**, 140-145.

**Zancan, P. and Sola-Penna, M.**, (2005). Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 401–411.