

Imię i nazwisko autora rozprawy: Kamila Rząd

Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Enzymy o aktywności aminotransferazy kwasu L- α -aminoadypinowego z *Candida albicans* - właściwości i rola w metabolizmie komórki grzybowej

Tytuł rozprawy w języku angielskim: L- α -Aminoadipate aminotransferases from *Candida albicans* - properties and role in fungal cell metabolism

Promotor <i>podpis</i>	Drugi promotor <i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski	
Promotor pomocniczy <i>podpis</i>	Kopromotor <i>podpis</i>
Dr inż. Iwona Gabriel	

Dziękuję mojemu Promotorowi

Panu prof. dr inż. hab. Sławomirowi Milewskiego za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i wskazówki udzielane podczas pisania pracy.

Chciałabym również podziękować mojej Promotor pomocniczej Pani dr inż. Iwonie Gabriel za życzliwość, zaangażowanie, pomoc w realizacji badań i poświęcony czas przy redagowaniu pracy.

Dziękuję prof. Joachimowi Morschhäuserowi za możliwość odbycia stażu na Uniwersytecie w Würzburg i nieocenioną pomoc w realizacji badań.

Dziękuję dr inż. Agnieszce Kiliszek i prof. dr hab. Wojciechowi Rypniewskiemu za owocną współpracę i możliwość wykonywania badań w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Doktorantom i Pracownikom Katedry Technologii Leków i Biochemii za życzliwość każdego dnia i miłą atmosferę pracy.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	6
WYKAZ SKRÓTÓW.....	9
1 CEL I ZAKRES PRACY	10
2 CZĘŚĆ TEORETYCZNA	11
2.1 Wprowadzenie	11
2.2 Szlak kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny	13
2.3 Znaczenie szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego	15
2.4 α -Aminotransferaza L- α -aminoadypinowa (AmAA)	22
3 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	33
3.1 Materiały.....	33
3.1.1 Aparatura	33
3.1.2 Wzorce masowe (markery wielkości).....	33
3.1.3 Pożywki i podłoża.....	34
3.1.4 Szczepy bakteryjne i grzybowe.....	34
3.1.5 DNA.....	35
3.1.6 Enzymy restrykcyjne	42
3.1.7 Oprogramowanie.....	42
3.2 Metody	42
3.2.1 Warunki hodowli drobnoustrojów	42
3.2.2 Przygotowanie komórek kompetentnych	43
3.2.3 Transformacja do komórek kompetentnych E. coli	43
3.2.4 Oczyszczanie DNA	43
3.2.5 Elektroforeza agarozowa	44
3.2.6 Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE	44
3.2.7 Analiza restrykcyjna DNA	45
3.2.8 Oznaczenie stężenia białka metodą Bradford	45
3.2.9 Analiza bioinformatyczna	45
3.2.10 Amplifikacja badanych genów.....	46
3.2.11 Wprowadzenie produktu PCR do wektora pET101/D-TOPO®	47
3.2.12 Mutagenезa ukierunkowana plazmidowego DNA	48
3.2.13 Nadprodukcja rekombinantowego białka w systemie Tabora - Studiera.....	50
3.2.14 Przygotowanie ekstraktu bezkomórkowego	51
3.2.15 Oczyszczanie rekombinantowego białka przy pomocy chromatografii metalopowinowactwa na kolumnie HisTrap.....	51
3.2.16 Oczyszczanie białka rekombinantowego bez domeny oligoHis przy pomocy chromatografii jonowymiennej na kolumnie ResourceQ	52
3.2.17 Oczyszczanie preparatów białkowych przy pomocy chromatografii rozmiarów wykluczających	53
3.2.18 Wyznaczanie masy cząsteczkowej białka i struktury oligomerycznej	53
3.2.19 Zateżnianie preparatów białkowych przez ultrafiltrację	55

3.2.20	Wymiana buforu preparatu białkowego	55
3.2.21	Immunodetekcja białek rekombinantowych techniką Western Blotting	55
3.2.22	Krystalizacja białka rekombinantowego	55
3.2.23	Oznaczanie aktywności aminotransferazowej	56
3.2.24	Oznaczenie stężenie inhibitora hamującego w 50 % aktywność enzymu (IC ₅₀)	59
3.2.25	Wykonanie widm absorpcyjnych dla enzymów wykorzystujących PLP	60
3.2.26	Określenie optymalnego pH działania enzymów	60
3.2.27	Przygotowanie kasety do usunięcia genu z genomu <i>C. albicans</i>	60
3.2.28	Usuwanie genu z genomu <i>C. albicans</i>	63
3.2.29	Hybrydyzacja metodą Southern Blotting	66
3.2.30	Przygotowanie kasety do komplementacji usuniętego genu	66
3.2.31	Komplementacja genu	69
3.2.32	Hodowla grzybowa w podłożu minimalnym z różnym źródłem azotu, z inhibitorami aminotransferaz oraz związkami wskazującymi na defekt komórek mutantów	71
3.2.33	Badanie zdolności wytwarzania biofilmu	71
3.2.34	Indukcja transformacji morfologicznej	72
4	OMÓWIENIE WYNIKÓW	73
4.1	Identyfikacja genów kodujących białka o przypuszczalnej aktywności AmAA w genomie <i>C. albicans</i>	73
4.2	Określanie roli genów kodujących białka o przypuszczalnej aktywności AmAA poprzez badanie fenotypu mutantów delecyjnych	80
4.2.1	Konstrukcja mutantów <i>C. albicans</i> SC5314 z usuniętymi genami kodującymi AmAA	80
4.2.2	Sprawdzenie poprawności konstrukcji mutantów <i>C. albicans</i>	85
4.2.3	Wzrost mutantów w podłożu minimalnym z różnymi źródłami azotu	87
4.2.4	Wpływ inhibitora aminotransferaz AOA na wzrost analizowanych mutantów	90
4.2.5	Wpływ delecji genów na zdolność <i>C. albicans</i> do transformacji morfologicznej Y → M. ..	93
4.2.6	Wpływ delecji genów na zdolność <i>C. albicans</i> do wytwarzania biofilmu	94
4.3	Charakterystyka biochemiczna produktów genów kodujących białka o przypuszczalnej aktywności AmAA	95
4.3.1	Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych do nadprodukcji białek CaAro8p, CaAro9p, CaBna3p, CaYer152Cp w komórkach <i>E. coli</i>	95
4.3.2	Optymalizacja nadprodukcji badanych białek w komórkach ekspresyjnych <i>E. coli</i>	99
4.3.3	Optymalizacja oczyszczania rekombinowanych białek	106
4.3.4	Wyznaczenie masy cząsteczkowej i struktury oligomerycznej	111
4.3.5	Potwierdzenie zdolności wiązania PLP	113
4.3.6	Wyznaczenie parametrów kinetycznych	119
4.3.7	Określanie optimum pH działania enzymów	123
4.3.8	Inhibicja CaAro8p i CaAro9p	124
4.3.9	Próby otrzymania form krystalicznych białek CaAro8p i CaAro9p	127
4.3.9.1	Analiza bioinformatyczna pod kątem zdolności do krystalizacji	128
4.3.9.2	Optymalizacja krystalizacji	133
4.3.9.3	Podsumowanie wyników krystalizacji	137

4.4	Dyskusja.....	139
5	PODSUMOWANIE.....	145
	ZAŁĄCZNIK 1	147
	BIBLIOGRAFIA	151
	SPIS RYSUNKÓW.....	161
	SPIS TABEL	165
	DOROBEK NAUKOWY	168

STRESZCZENIE

Candida albicans, oportunistycznie patogenny drobnoustrój grzybowy, jest elementem naturalnej flory drobnoustrojowej człowieka. Występuje na śluzówce przewodu pokarmowego, jamy ustnej, narządów płciowych. U osób z zaburzeniem odporności drożdżak ten rozprzestrzenia się i może powodować ciężkie do wyleczenia choroby. W ostatnich latach liczba przypadków fungemii wzrosła, przy czym nadal tylko połowa jest poprawnie diagnozowana. Zjawisko to jest paradoksalnie związane z rozwojem medycyny, stwarzaniem sytuacji obniżenia odporności u osób z założonymi na stałe cewnikami, stosujących karmienie pozajelitowe, poddanych chemoterapii lub transplantacji. Podobieństwo komórek grzybowych i ssaczych, wzrost częstości występowania infekcji grzybiczych wraz ze stopniowym wzrostem pojawiania się oporności patogenów na dostępne preparaty przeciwgrzybiczne stwarza potrzebę poszukiwania nowych związków o odmiennym mechanizmie działania, które dodatkowo wykazywałyby selektywne działanie na komórki grzybów. Jedną z dróg obroną przez naukowców w celu poszukiwania determinantów zjadliwości, mechanizmów oporności *Candida spp.* i zaprojektowania nowych metod detekcji czy zwalczania tych mikroorganizmów jest analiza szlaków biosyntezy aminokwasów egzogennych dla człowieka.

Szlaki biosyntezy aminokwasów, zwłaszcza te, które nie występują w komórkach ludzkich a są wykorzystywane w komórkach grzybowych, są niezwykle interesującym tematem w zakresie poszukiwania nowych celów molekularnych w terapii przeciwgrzybowej. Kluczowe procesy zachodzące podczas infekcji grzybowej, takie jak: adhezja, filamentacja, penetracja i niszczenie komórek gospodarza związane są z nadprodukcją licznych białek, co prowadzi do znacznego zwiększenia zapotrzebowania mikroorganizmów na aminokwasy. Zablockowanie enzymów uczestniczących w szlakach anabolicznych może prowadzić do zahamowania wirulencji patogenu. Analogi aminokwasów hamują biosyntezę grzybowych makromolekuł na etapach specyficznych dla drobnoustrojów grzybowych. Przykładami są związek RI-331 hamujący dehydrogenazę homoserynową uczestniczącą w biosyntezie aminokwasów z rodziny kwasu asparaginowego [Yamaki i in. 1990] czy azoksybacylina, inhibitor ekspresji genu kodującego jeden z enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny [Aoki i in. 1996]. Oba te związki wykazują wysoką aktywność przeciwgrzybową *in vitro* i *in vivo* oraz niską toksyczność wobec ssaków. Na uwagę zasługuje również jeden z najbardziej znanych herbicydów, Glifosat (*N*-(fosfonometylo)glicyna), handlowa nazwa Roundup, inhibitor biosyntezy aminokwasów aromatycznych w komórkach roślinnych.

L-lizyna jest jedynym aminokwasem mającym dwa odrębne szlaki biosyntezy wśród dwudziestu podstawowych białkowych aminokwasów. Jest aminokwasem niezbędnym do funkcjonowania organizmów zwierzęcych i roślinnych. Syntetyzowana jest *de novo* tylko u bakterii, niższych eukariota i niektórych roślin. Te informacje skłoniły naukowców do przeprowadzenia szeregu badań sprawdzających czy enzymy szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny mogą być dobrymi celami molekularnymi w terapii przeciwgrzybowej. Uzyskane wyniki nie są jednak jednoznaczne. Zablockowanie enzymów uczestniczących w szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego może prowadzić do auktotrofii szczepu *C. albicans* względem L-lizyny,

jednak efekt ten nie jest jednoznaczny ze zmniejszeniem przeżywalności tego drobnoustroju w organizmie gospodarza. Duże znaczenie ma zdolność patogennych grzybów do wykorzystywania różnorodnych składników odżywczych w celu pozyskania azotu i węgla, pierwiastków niezbędnych do prawie wszystkich biosyntetycznych procesów. Drożdżak *Candida albicans* jest w stanie wykorzystywać 20 podstawowych aminokwasów jako źródło azotu [Brunke i in. 2014]. Możliwość ta jest jednym z czynników wirulencji tego drobnoustroju i może być związana z aktywnością aminotransferaz. Korelacja szlaku biosyntezy L-lizyny z innymi szlakami metabolicznymi w komórce daje jednak nadzieję, że zahamowanie funkcjonowania enzymu z tego szlaku o aktywności α -aminotransferazy kwasu L- α -aminoadypinowego (AmAA) może wpłynąć na zmniejszenie wirulencji szczepu.

Przedmiotem badań w ramach rozprawy doktorskiej były enzymy AmAA z drożdżaków *Candida albicans*. Zadanie obejmowało zidentyfikowanie genów kodujących enzymy o potencjalnej aktywności AmAA, scharakteryzowanie produktów tych genów pod kątem biochemicznym, skonstruowanie i scharakteryzowanie mutantów delecyjnych z usuniętymi genami AmAA oraz krystalizacja białek o aktywności AmAA.

Grzybowa AmAA jest enzymem bardzo słabo poznanym, co więcej aktywność AmAA przypisywana jest, lecz nie potwierdzona jednoznacznie, produktom kilku genów. Dotychczas poznane białka o aktywności AmAA z innych źródeł posiadają szerokie spektrum substratowe (aminokwasy aromatyczne, histydyna, kwas L- α -aminoadypinowy, kwas kinurenowy). W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano pięć genów kodujących białka o potencjalnej aktywności AmAA: *ARO8*, *ARO9*, *BNA31*, *BNA32*, *YER152C*. Wykazano, że w przypadku *C. albicans* aktywność AmAA wykazują białka *CaAro8p* oraz *CaAro9p*. Białko *CaAro8p* wykazuje najwyższą efektywność katalityczną względem kwasu L- α -aminoadypinowego (L-AA) i α -ketoadypinianu. Enzym ten katalizuje biosyntezę i degradację kwasu L-AA z równą efektywnością. Białko *CaAro9p* wykazuje najwyższą efektywność katalityczną względem α -ketoadypinianu. Białko *CaYer152Cp* nie posiada aktywności AmAA, a tylko katalizuje reakcje degradacji aromatycznych aminokwasów. Nie zbadano aktywności białek *CaBna31p* i *CaBna32p*, są one prawdopodobnie zaangażowane w kinurenowy szlak transformacji tryptofanu do NAD⁺ ale nie biorą udziału w biosyntezie żadnego białkowego aminokwasu.

Charakterystyka fenotypowa mutantów delecyjnych wykazała, że białko *CaAro8p* jest najbardziej wszechstronną aminotransferazą spośród przebadanych. Jest zaangażowane w katabolizm L-histydyny, L-lizyny, aromatycznych aminokwasów jak również biosyntezy L-lizyny, L-feniloalaniny i L-tyrozyny. *CaAro9p* jest mniej istotnym enzymem w komórce *C. albicans*. Uczestniczy w katabolizmie aromatycznych aminokwasów i L-lizyny, pełni rolę wspomagającą w sytuacji nadmiernej ilości wspomnianych aminokwasów w komórce.

Ponadto wykazano, że degradacja L-Lys jest całkowicie zależna od obecności aminotransferaz, *CaAro8p*, *CaAro9p* oraz prawdopodobnie także innych, nieprzebadanych w tej pracy. Natomiast biosynteza L-Lys nie zależy od *CaAro8p* ani od innej badanej aminotransferazy. Badane aminotransferazy: *CaAro8p*, *CaAro9p*, *CaYer152Cp*, *CaBna3p* nie pełnią pojedynczo kluczowej roli w żadnym szlaku biosyntezy aminokwasów białkowych w komórce *C. albicans*. Usunięcie



genów kodujących poszczególne enzymy nie wpłynęło na przeżywalność szczepu *C. albicans* w warunkach *in vitro*, ani na jego podstawowe procesy biochemiczne. Testy wykazały, że badane enzymy nie mają również wpływu na zjadliwość szczepu. Wyklucza to tym samym badane białka, jako istotne cele molekularne w terapii przeciwgrzybowej. Wyniki przedstawionych badań potwierdzają jednak wszechstronność aminotransferaz *C. albicans*, stanowiącą podstawę dla żywieniowej elastyczności tego patogennego drożdżaka.

W niniejszej pracy opracowano również warunki krystalizacji i uzyskano dane rentgenograficzne z dwóch kryształów białka CaAro8p: bez związanych ligandów w strukturze oraz ze związanym PLP i fenylopirogronianem oraz z dwóch kryształów białka CaAro9CHp: ze związanym PLP oraz ze związanym PLP, fenylopirogronianem (PhePi) i kwasem L- α -aminoadypinowym (AA). Poznanie struktury III rzędowej białka może przyczynić się do zrozumienia funkcjonowania metabolizmu komórki czy mechanizmu reakcji katalizowanej przez enzym. Wszystkie uzyskane struktury są obecnie udokładniane i przewidywane jest opublikowanie tych struktur w niedalekiej przyszłości.

WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Wyjaśnienie
4-HPP	Kwas 4-hydroksyfenylopirogronowy
aa	Aminokwasy
AASA	δ -Semialdehyd kwasu L- α -aminoadypinowego
AmAA	α - Aminotransferaza kwasu L- α -aminoadypinowego
AOA	Aminooksyoctan
AP-3	3-Fosfonoalanina
BSA	Albumina surowicy bydłowej
CaAro8p, ScAro8p	Białko Aro8p z <i>Candida albicans</i> (Ca) i <i>S. cerevisiae</i> (Sc); nazwy białek z innych mikroorganizmów tworzone analogicznie
CS	Cykloseryna
C _{substrat}	Stężenie substratu
FBS	Płodowa surowica bydłowa
GSAM	Aminomutaza glutamino-1-semialdehydowa
I3P	Kwas indolo-3-pirogronowy
IC ₅₀	Wartość stężenia inhibitora powodującego obniżenie aktywności enzymu o 50%
KAT	α -Aminotransferaza L-kinureninowa/L- α -aminoadypinowa
K _i	Stała inhibicji
K _{kat}	Stała katalityczna
K _M	Stała Michaelisa
L-AA	Kwas L- α -aminoadypinowy
L-Kyn	L-Kinurenina
LLP	Kompleks PLP z ϵ -aminową grupą reszty lizynowej aminotransferazy
M	Wzorzec masowy
MPP	Jodek 1-metylo-4-fenylopirydyny
MW	Masa cząsteczkowa
Nou	Nourseotrycyna
NouR	Oporność na nourseotrycynę
NPA	Kwas 3-nitropropionowy
oligoHis, heksaHis, HisTag	Domena polihistydynowa, fragment łańcucha aminokwasowego składający się z 6 histydyn dołączony metodami inżynierii genetycznej do łańcucha aminokwasowego białka typu dzikiego
OPS	o-Fosfo-L-seryna
PBS	Sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PhePi	Kwas fenylpirogronowy
PMSF	Fluorek fenylometylosulfonylu
Rf	Ruchliwość elektroforetyczna
SA	Siarczan amonu
SC	Sulfincysteina
V	Prędkość początkowa reakcji
V _{dek}	Objętość swobodna kolumny
V _e	Objętość elucji
V _{max}	Maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej
XTT	(2,3-Bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo]-5-[(fenyloamino)karbonylo]-2H-tetrazolo hydroksyd)
α -KA	Kwas α -ketoadypinowy
α -KG	Kwas α -ketoglutazarowy

1 CEL I ZAKRES PRACY

Celem projektu badawczego realizowanego w ramach rozprawy doktorskiej było zidentyfikowanie i pełna charakterystyka enzymów o aktywności α -aminotransferazy kwasu L- α -aminoadypinowego (AmAA) w drożdżakach *Candida albicans* oraz weryfikacja hipotezy możliwości wykorzystania ich jako celów molekularnych w chemoterapii przeciwgrzybowej. Uzyskane wyniki mają pozwolić na zrozumienie funkcjonowania szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny z *C. albicans*, znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy badane enzymy uczestniczą w tym szlaku i jak ważną pełnią w nim rolę oraz mają wyjaśnić wpływ aktywności enzymów AmAA na zjadliwość komórek *C. albicans*.

Zakres badań obejmował:

- identyfikację genów kodujących enzymy o potencjalnej aktywności AmAA, konstrukcję plazmidów ekspresyjnych umożliwiających nadprodukcję białek rekombinantowych w komórkach *E. coli*, optymalizację oczyszczania białek rekombinantowych,
- charakterystykę biochemiczną uzyskanych białek rekombinantowych,
- skonstruowanie mutantów delecyjnych z usuniętymi genami kodującymi enzymy o aktywności AmAA,
- charakterystykę fenotypową mutantów delecyjnych,
- uzyskanie kryształów białek o aktywności AmAA i informacji o strukturze przestrzennej białek na podstawie danych rentgenograficznych.

2 CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1 Wprowadzenie

Candida albicans jest oportunistycznie patogennym drobnoustrojem bytującym na błonach śluzowych i skórze człowieka. Występuje u około 50% ludzi jako składnik naturalnej flory fizjologicznej jelita grubego i w warunkach prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego nie stanowi zagrożenia. U osób z zaburzeniem odporności, drożdżak ten rozprzestrzenia się i może powodować poważne choroby zwane kandydozami [McManus i Coleman 2013].

W polskich szpitalach, u 5-10% pacjentów rozwijają się tzw. zakażenie szpitalne, z których część jest powodowana przez drobnoustroje grzybowe. Zakażenia związane z dostaniem się komórek grzybowych do krwioobiegu są śmiertelne u 30-81% przypadków [Chang i in. 2008; Krysiak 2011; Velasco i Bigni 2008; Xess i in. 2007]. W latach 1979-2000, liczba przypadków fungemii wzrosła o 200%, przy czym nadal tylko połowa jest poprawnie diagnozowana. Zjawisko to jest paradoksalnie związane z rozwojem medycyny, stwarzaniem sytuacji obniżenia odporności u osób z założonymi na stałe cewnikami, stosujących karmienie pozajelitowe, poddanych chemoterapii lub transplantacji. Fungemia jest głównie wywoływana przez drożdżaki *C. albicans* (48-58 % przypadków) natomiast *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* i inne gatunki (*C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *Saccharomyces*) są rzadziej wykrywane [Chang i in. 2008; Dzierżanowska i in. 2003]. Wbrew pozorom, najczęściej spotykanymi zakażeniami szpitalnymi są te endogenne, a więc takie, których trudno uniknąć, gdyż chorobotwórcze grzyby pochodzą z flory bakteryjnej człowieka. Rozpoznanie infekcji grzybiczych nie jest łatwe, a terapie komplikuje duża możliwość adaptacyjna grzybów do warunków środowiskowych zmienionych pod wpływem leków tj. produkcja enzymów lipolitycznych i hydrolitycznych, form zarodnikowych i przetrwalnikowych, nabywanie większej oporności na różne czynniki niszczące [Krajewska-Kułąk i in. 2000; Maleszka i Adamski 2001; Passowicz-Muszyńska i in. 2007]. W wielu krajach Europy, zakażenia wywoływane przez grzyby z gatunku *Candida albicans* wyprzedzają nawet ilość zakażeń szpitalnych wywoływanych przez bakterię *Escherichia coli* [Ciszewski i Czekaj 2014].

W związku ze zwiększającą się ilością przypadków kandydoz szpitalnych, organizacja Infectious Diseases Society of America w 2009 roku wprowadziła wytyczne dotyczące ich leczenia [Pappas i in. 2009]. Pierwszym stosowanym lekiem przeciwko zakażeniu *C. albicans* jest flukonazol, antymykotyk względnie bezpieczny i dobrze tolerowany, działający grzybobójczo przeciwko *Aspergillus spp.* natomiast grzybostatycznie przeciwko *Candida spp.* Grzybostatyczne działanie flukonazolu oraz jego częste stosowanie do profilaktyki zakażeń u chorych z grupy wysokiego ryzyka (tj. pacjentów z obniżoną odpornością, odbiorców przeszczepów narządowych, czy stosujących chemoterapię) czy w ramach wspomagania antybiotykoterapii doprowadziło do pojawienia się oporności u szczepów *Candida spp.* na ten lek i inne tzw. azole [Robbins i in. 2011]. W zależności od badanego ośrodka, ilość zaobserwowanych szczepów *C. albicans* opornych na flukonazol waha się od poniżej jednego do kilkudziesięciu procent [Dynowska i in. 2004; Gualco i in. 2007; Jafari-Nodoushan i in. 2008;

Skrodenienė i in. 2006; Yang i in. 2004]. Sprawę komplikuje fakt, że spośród szczepów *C. albicans* opornych na flukonazol, tylko 28% pozostaje wrażliwych na worikonazol [Pfaller i in. 2010], ponadto pojawia się oporność krzyżowa na inne leki, zaobserwowana i opisywana wielokrotnie przez różne grupy badawcze [Cernicka i Subik 2006; Goldman i in. 2004; Kamai i in. 2004; Mondello i in. 2003; Nawrot i in. 2005]. W roku 2011 problem oporności dostrzegło również Polskie Ministerstwo Zdrowia wprowadzając do rejestracji na listę patogenów alarmowych przypadki szczepów *C. albicans* niewrażliwych na leki z grupy azoli lub kandydyn [Dz. U. 2011 nr 294 poz. 1741]. Coraz częstsze pojawienie się oporności na flukonazol, zmusza do stosowania innych antymykotyków, gorzej tolerowanych przez pacjentów. Amfoterycyna B, antybiotyk z grupy tzw. makrolidów polienowych, o szerokim spektrum działania przeciwgrzybiczego, wykazuje działanie grzybobójcze w stosunku do *C. albicans*, jednakże charakteryzuje się długim okresem półtrwania, szerokim rozprzestrzenieniem się w tkankach i toksycznością w stosunku do komórek gospodarza [Bondaryk i in. 2013]. Pomimo, że kaspofungina (echinokandydyna) i amfoterycyna B są skuteczne w zwalczaniu *C. albicans in vitro*, to w ostatnich latach pojawił się gatunkowo-specyficzny wzrost oporności na te leki, a częste stosowanie tych antymykotyków dodatkowo stymuluje zjadliwość grzyba [Li i in. 2013; Papon i in. 2013].

Kolejnym problemem są trudności diagnostyczne kandydoz [Warzocha i Seferyńska 2006]. Przebieg kliniczny fungemii w początkowej fazie często ograniczony jest tylko do gorączki [Stradomska 2006], diagnostyka opiera się więc na badaniach mikroskopowych, posiewach mikrobiologicznych i badaniach serologicznych oraz molekularnych [Garczewska i in. 2008; Przyjałkowski 2006]. Często jednak wyniki tych badań, pomimo występującego zakażenia, są fałszywie negatywne. Szacuje się, że prawidłowe wyniki posiewów uzyskuje się u 25-50% chorych z potwierdzoną grzybicą [Espinel-Ingroff 2008; Garczewska i in. 2008].

Idealny antymykotyk nie istnieje, a częste stosowanie leków grzybobójczych i grzybostatycznych sprzyja powstawaniu różnorodnych mechanizmów oporności i rozwijaniu kandydoz, których czynnikiem etiologicznym są inne gatunki *Candida spp.* niewrażliwe na dotychczas poznane leki. Podobieństwo komórek grzybowych i ssaczy, wzrost częstości występowania infekcji grzybiczych wraz ze stopniowym wzrostem pojawiania się oporności patogenów na dostępne preparaty przeciwgrzybicze stwarza potrzebę poszukiwania nowych związków o odmiennym mechanizmie działania, które dodatkowo wykazywałyby selektywne działanie na komórki grzybów. Jedną z dróg obraną przez naukowców w celu poszukiwania determinantów zjadliwości, mechanizmów oporności *Candida spp.* i zaprojektowania nowych metod detekcji czy zwalczania tych mikroorganizmów jest analiza szlaków biosyntezy aminokwasów egzogennych dla człowieka.

Kluczowe procesy zachodzące podczas infekcji grzybowej, takie jak: adhezja, filamentacja, penetracja i niszczenie komórek gospodarza związane są z nadprodukcją licznych białek, co prowadzi do znacznego zwiększenia zapotrzebowania mikroorganizmów na aminokwasy. Szlaki biosyntezy aminokwasów mogą więc być potencjalnym źródłem nowych celów molekularnych dla chemoterapii przeciwgrzybowej. Na szczególną uwagę zasługują zwłaszcza

te aminokwasy, których szlaki biosyntetyczne nie występują w komórkach ludzkich a znajdują się w komórkach grzybowych. Dla przykładu, L-lizyna syntetyzowana jest *de novo* tylko u bakterii, niższych eukariota i niektórych roślin [Zabriske i Jackson 2000], jest aminokwasem niezbędnym do funkcjonowania organizmów zwierzęcych i roślinnych oraz należy do grupy tych związków, które nie są produkowane w organizmie człowieka, a muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Te informacje skłoniły badaczy do przeprowadzenia szeregu badań sprawdzających czy enzymy szlaku biosyntezy L-lizyny mogą być dobrymi celami molekularnymi w terapii przeciwgrzybowej. Uzyskane do tej pory wyniki pochodzące z różnych źródeł nie są jednoznaczne [Gabriel i in. 2014; Horbach i in. 2009; Kingsbury i in. 2004; Kur i in. 2010; Liebmann i in. 2004; Shepherd 1985; Tang i in. 1994]. Z jednej strony zablokowanie niektórych enzymów uczestniczących w szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny prowadzi do auksotrofii szczepu *C. albicans* względem L-lizyny, jednak efekt ten nie jest jednoznaczny ze zmniejszeniem przeżywalności tego drobnoustroju w organizmie gospodarza [Kur i in. 2010]. Duże znaczenie w przeżywalności szczepu ma zdolność patogennych grzybów do wykorzystywania szerokiego spektrum składników odżywczych. Drożdżak *Candida albicans* jest w stanie wykorzystywać 20 podstawowych aminokwasów jako źródło azotu [Brunke i in. 2014]. Możliwość ta jest jednym z czynników wirulencji tego drobnoustroju. Z drugiej strony, korelacje szlaku biosyntezy L-lizyny z innymi szlakami metabolicznymi w komórce dają nadzieję, że zahamowanie funkcjonowania jednego z enzymów szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny może jednak wpłynąć na zmniejszenie wirulencji szczepu. W literaturze można znaleźć doniesienia takich przypadków; dla przykładu mutant *Colleotrichium graminicola* (patogen roślinny) pozbawiony genu kodującego reduktazę α -aminoadypinową (enzym szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny) wykazuje zredukowaną zdolność do wnikania do komórek liści i tworzenia nekrotycznych strzępek grzybni (*hyphae*) [Horbach i in. 2009].

2.2 Szlak kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny

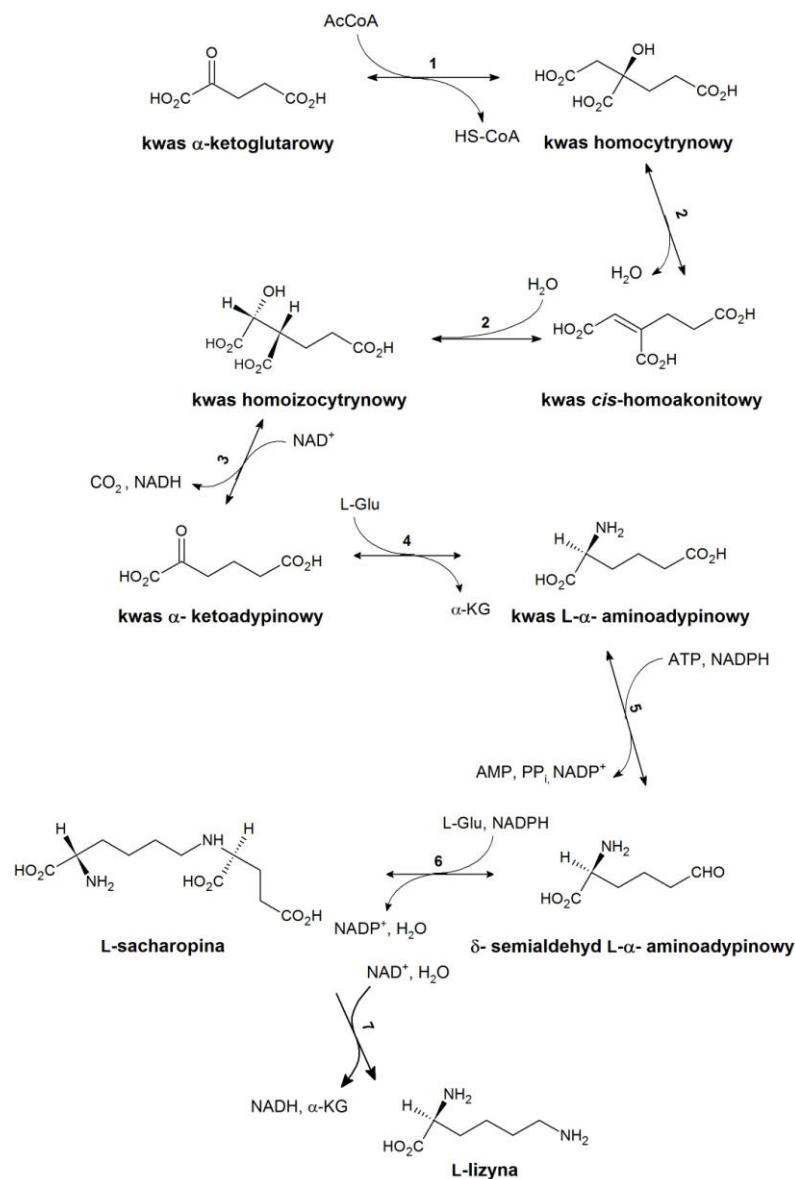
Organizmy prokariotyczne, niższe eukariotyczne i niektóre rośliny są w stanie syntetyzować L-lizynę *de novo* wykorzystując dwa odmienne szlaki biosyntezy: szlak kwasu L- α -aminoadypinowego (L-AA) występujący u euglenoidów, wyższych grzybów (w tym u *Candida spp.*) i niektórych prokariotów (*T. thermophilus*, *P. horikoshii*, *P. abyssii*), szlak diaminopimelinowy charakterystyczny dla roślin zielonych, niższych grzybów (niektóre *Phycomycetes*) i prokariotów [Davis 1952; Mitchell i Houlahan 1948; Nishida i Nishiyama 2000; Vogel 1960]. Wśród dwudziestu podstawowych białkowych aminokwasów, L-lizyna jest jedynym aminokwasem mającym dwa odrębne szlaki biosyntezy [Xu i in. 2006].

Funkcjonowanie szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego (L-AA), jego biochemiczne i genetyczne aspekty, zostały opisane przede wszystkim na podstawie badań przeprowadzonych na takich mikroorganizmach jak: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Neurospora crassa*, niektóre *Candida*. Jego występowanie zostało potwierdzone również w komórkach *Magnaporthe grisea*, *Cryptococcus neoformans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis*, *Penicillium chrysogenum* i *Aspergillus fumigatus*. Szlak L-AA jest jednym ze szlaków

biosyntezy aminokwasów z rodziny glutaminianu, przypomina szlak biosyntezy arginy występujący u bakterii [Nishida i Nishiyama 2000; Vogel 1965]. W ośmiu reakcjach katalizowanych przez siedem enzymów kwas α -ketoglutarowy (α -KG) przekształcany jest do L-lizyny [Zabriskie i Jackson 2000].

Przebieg szlaku

Pierwsza część reakcji omawianego szlaku prowadząca do powstania kwasu L- α -aminoadypinowego zachodzi w mitochondrium (za wyjątkiem reakcji powstania kwasu homocytrynowego, która zachodzi w jądrze), kolejna - w cytoplazmie. Taki podział jest bardzo korzystny dla przebiegu szeregu przemian w szlaku. Ułatwia regulację poszczególnych reakcji, umożliwia dostęp niezbędnych kofaktorów, udostępnia odpowiednie pH, niezbędne do zapewnienia właściwego kierunku reakcji [Zabriskie i Jackson 2000].



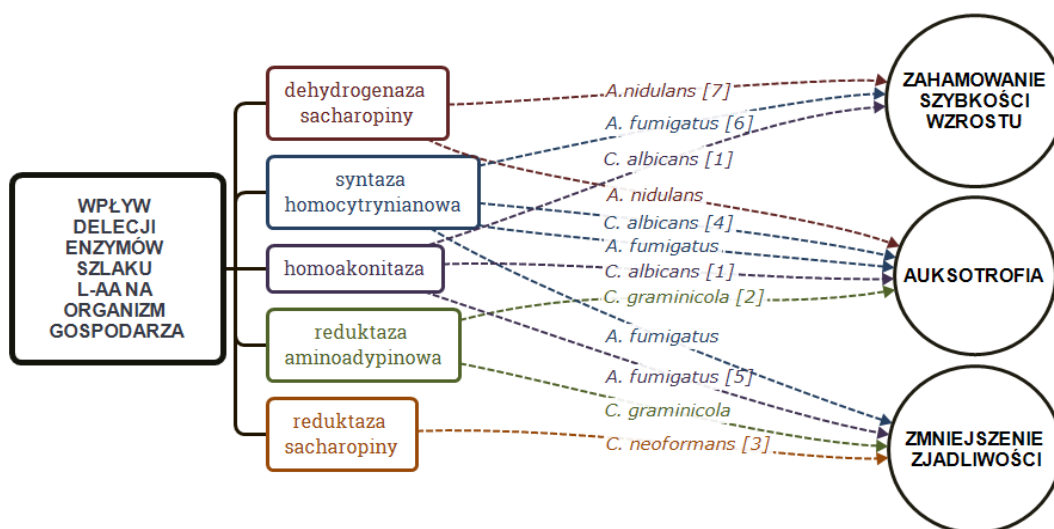
Rys. 1 Schemat reakcji szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny. Enzymy biorące udział w szlaku: 1 syntaza homocytrynianową EC 4.1.3.21, 2 homoakonitaza EC 4.2.1.36, 3 dehydrogenaza homoizocytrynianową EC 1.1.1.87, 4 α -aminotransferaza L- α -aminoadypinowa EC 2.6.1.39, 5 reduktaza α -aminoadypinowa EC 1.2.1.31, 6 reduktaza sacharopiny EC 1.5.1.10, 7 dehydrogenaza sacharopiny (tworząca L-lizynę) EC 1.5.1.7 [Rząd i Gabriel 2015]

Przemiany prowadzące do L-lizyny w szlaku L-AA (Rys. 1) zainicjowane są przez reakcję kondensacji kwasu α -ketoglutazarowego i acetylo-koenzymu A (AcCoA), katalizowaną przez syntazę homocytrynianową **1**. Powstaje wówczas kompleks homocytrylo-koenzymu A (HS-CoA) związany z enzymem, który następnie jest hydrolizowany do kwasu homocytrynowego. Następnie kwas homocytrynowy ulega dehydratacji do kwasu *cis* - homoakonitynowego z udziałem homoakonitazy **2** która, wykorzystując powstający produkt, przekształca go do kwasu homoizocytrynowego **2**. Kwas homoizocytrynowy ulega dekarboksylacji w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę homoizocytrynianową **3** z udziałem NAD^+ . Zależna od L-glutaminianu transaminacja kwasu α -ketoadypinowego, przeprowadzana przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową **4**, umożliwia powstanie kwasu L- α -aminoadypinowego. Związek ten, w reakcji przebiegającej w cytoplazmie, zależnej od ATP, NADPH i katalizowanej przez reduktazę kwasu L- α -aminoadypinowego **5**, ulega redukcji do δ -semialdehydu kwasu L- α -aminoadypinowego (AASA). Przemiana ta jest niepowtarzalnym procesem występującym u grzybów, w którym zachodzi adenylacja i redukcja [Nishida i Nishiyama 2000]. Reduktaza sacharopiny **6** w warunkach fizjologicznych katalizuje reakcję przekształcenia AASA i L-glutaminianu do iminy, redukowanej przez NADPH do L-sacharopiny. Końcową reakcją szlaku jest oksydacyjna deaminacja L-sacharopiny katalizowana przez dehydrogenazę sacharopiny (tworzącą L-lizynę), **7** prowadząca do powstania L-lizyny.

2.3 Znaczenie szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego

Szlak L-AA biosyntezy L-lizyny jest interesujący ze względu na jego powiązania z innymi szlakami metabolicznymi w komórce grzybowej. Na podstawie informacji dotyczących usunięcia genów enzymów szlaku L-AA z różnych mikroorganizmów wysunięto wnioski, że selektywne inhibitory enzymów tego szlaku mogłyby wpłynąć na zahamowania zjadliwości komórek grzybowych równocześnie nie wywierając toksycznego efektu na komórki ludzkie (brak celu molekularnego) (Rys. 2). Niektóre grupy badawcze wykazały, że auksotrofia wobec L-lizyny u grzybów powoduje zmniejszenie ich zjadliwości i może mieć wpływ na ich wzrost *in vivo*. W 1985 Shepherd wysnuł hipotezę, że auksotroficzne wobec L-lizyny mutanty *C. albicans* nie są zdolne do wywołania kandydozy [Shepherd, 1985]. Jednakże przeprowadzone wówczas badania dotyczyły mutantów spontanicznych, istnieje więc prawdopodobieństwo, że szczepy te mogły posiadać więcej niż jedną mutację, niekoniecznie związaną ze szlakiem biosyntezy L-lizyny. Grupa Tang w 1994 roku udowodniła, że szczepy *Aspergillus nidulans* pozbawione dehydrogenazy sacharopiny, ostatniego enzymu szlaku (Rys. 1, enzym **7**), poprzez usunięcie genu *lysA* stają się auksotroficzne względem L-lizyny. Ponadto ich szybkość wzrostu w komórkach płucnych neutropenicznych myszy przy zakażeniu mieszanym innokulum (szczep dziki i mutanty auksotroficzne) jest niższa niż szybkość wzrostu szczepu dzikiego. Jednakże, nie zaobserwowano takiego efektu przy zakażeniu myszy przy pomocy jednorodnego innokulum mutantów, co wskazuje na to, że mutanty auksotroficzne pozostają tak samo zjadliwe jak szczep dziki [Tang i in. 1994]. Nowsze badania z 2004 roku pokazują, że usunięcie genu *lysF* kodującego homoakonitazę (Rys. 1, enzym **2**) u *Aspergillus fumigatus* prowadzi do zahamowania infekcji w tkankach płucnych myszy zarażonych tym

szczepem poprzez drogi oddechowe [Liebmann i in. 2004]. Taki sam efekt, w identycznym modelu zakażenia, zaobserwowano podczas usunięcia chimerycznego genu *spe3-lys9* kodującego syntazę spermidyny i reduktazę sacharopiny (Rys. 1, enzym 6) u *Cryptococcus neoformans*. Szczepy z usuniętym genem kodującym tylko reduktazę sacharopiny miały mniejszą zjadliwość, jednakże nie były całkowicie awirulentne [Kingsbury i in. 2004]. Również patogen roślinny *Colleotrichium graminicola* pozbawiony genu kodującego reduktazę α -aminoadypinową (Rys. 1, enzym 5) był auksotroficzny względem L-lizyny i wykazywał zredukowaną zdolność do wnikania do komórek liści i tworzenia nekrotycznych strzępek grzybni (*hyphae*). Niemniej jednak, dodatek L-lizyny do kropli innokulum stosowanej do infekcji komórek liści niwelował ten efekt [Horbach i in. 2009]. Z kolei, mutanty *C. albicans* pozbawione genów kodujących syntazę homocytrynianową (Rys. 1, enzym 1) oraz homoakonitazę (Rys. 1, enzym 2) pozostają tak samo zjadliwe w modelu mysiej kandydozy *in vivo* jak szczep dziki, pomimo występującej auksotrofii względem L-lizyny [Gabriel i in. 2014; Kur i in. 2010].

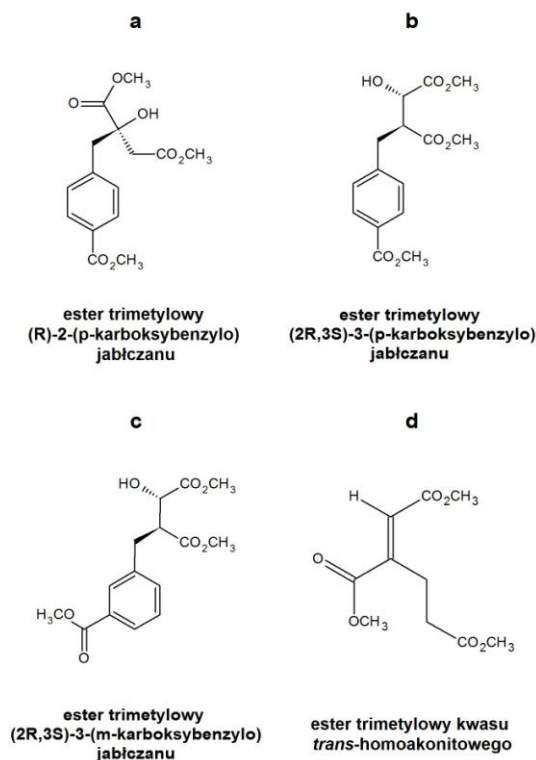


Rys. 2 Podsumowanie danych literaturowych dotyczących wpływu delecji genów kodujących enzymy szlaku L-AA na organizm gospodarza. [1] Gabriel i in. 2014, [2] Horbach i in. 2009, [3] Kingsbury i in. 2004, [4] Kur i in. 2010, [5] Liebmann i in. 2004; [6] Schöbel i in. 2010, [7] Tang i in. 1994

W przypadku usunięcia genu homoakonitazy, zaobserwowano u powstałych mutantów *C. albicans* mniejszą zdolność do zmiany formy morfologicznej. Jednak prawidłowość ta związana jest z ogólną zmianą szybkości wzrostu szczepu [Gabriel i in. 2014]. Usunięcie genu kodującego syntazę homocytrynianową (Rys. 1, enzym 1) wpłynęło natomiast na częściowe zahamowanie wirulencji *Aspergillus fumigatus* w modelu oskrzelowo-płucnej aspergilozy myszy zakażonych donosowo z użyciem zarodników grzyba. Jednakże zjadliwość tego szczepu była porównywalna do szczepu dzikiego w przypadku zakażenia drogą dożylną [Schöbel i in. 2010]. Grupa Schöbela wykazała również, że konidia mutantów auksotroficznych *A. fumigatus* względem L-lizyny nie są zdolne do produkowania proteaz umożliwiających pozyskanie L-lizyny z białek, podczas gdy forma mycelialna, jest zdolna do pozyskania brakującego aminokwasu ze środowiska. U myszy zakażonych donosowo z użyciem zarodników mutantów *A. fumigatus*, rozwój infekcji następował więc wolniej niż u myszy zakażonych szczepem dzikim.

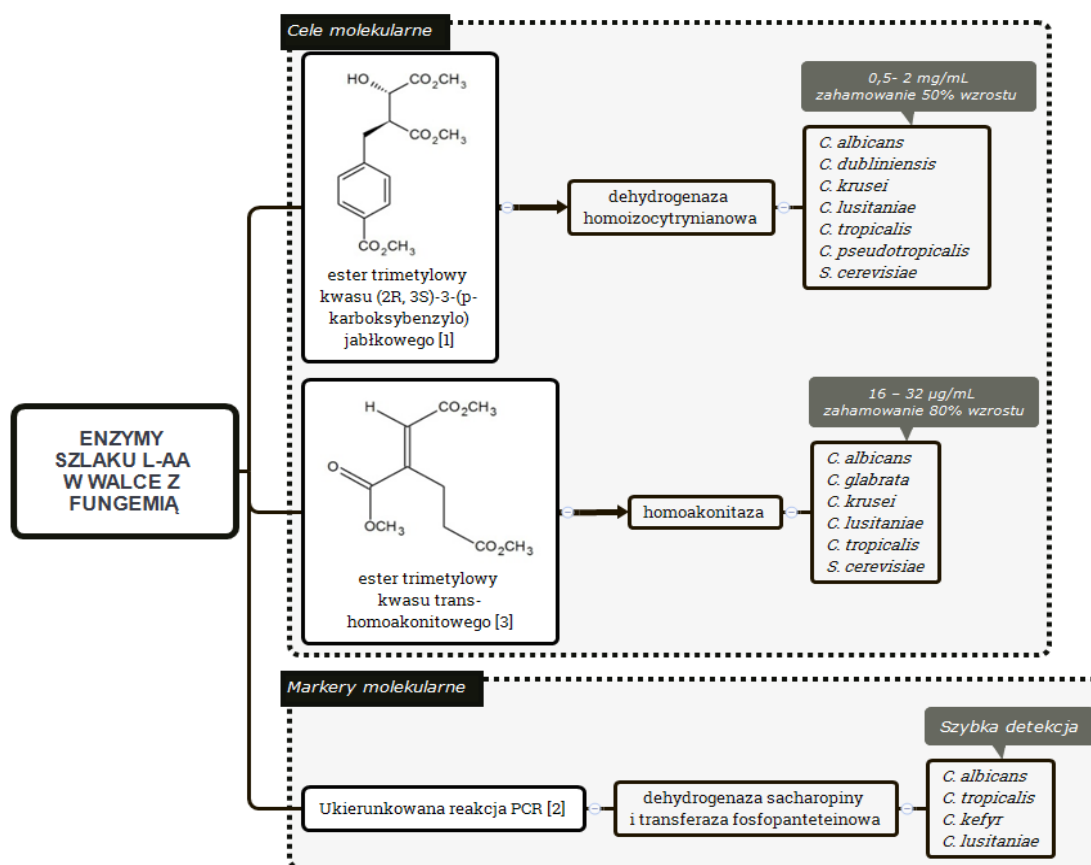
Udowodniono tym samym spowolnienie procesu kiełkowania mutantów aukstotroficznych, ich wolniejszy wzrost i zmniejszoną zjadliwość. Wysłano wniosek, że związki blokujące biosyntezę L-lizyny mogłyby znaleźć zastosowanie jako leki profilaktyczne, zapobiegające zakażeniu w przypadku pacjentów narażonych na aspergilozę oskrzelowo-płucną [Schöbel i in. 2010].

Optymizmem napawać mogą także wyniki ostatnich badań wskazujące, że inhibitory enzymów szlaku L-AA wykazują działanie przeciwgrzybowe. Dla przykładu, analogi kwasu (R)-homocytrynowego oraz (2R,3S)-homoizocytrynowego (Rys. 3, a, b, c) hamowały w 50% wzrost *A. nidulans* w pożywce minimalnej przy stężeniu 3 mM. Efekt ten nie był obserwowany w przypadku pożywki suplementowanej L-lizyną, co potwierdza fakt, że związki te są inhibitorami enzymów szlaku biosyntezy L-lizyny [Palmer i in. 2004]. W kolejnych latach, uzupełniono powyższe badania i wykazano, że ester trimetylowy kwasu (2R,3S)-3-(p-karboksybenzylo) jabłkowego (Rys. 3b) jest inhibitorem dehydrogenazy homoizocytrynianowej (Rys. 1, enzym 3) z *C. albicans*. Wykazuje on również aktywność przeciwgrzybową względem *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* oraz *S. cerevisiae*. Przy stężeniu 0,5-2 mg mL⁻¹ w pożywkach RPMI (bogata) i YNB (minimalna) związek ten hamował 50% wzrostu komórek tych szczepów [Gabriel i in. 2013]. Inhibitory homoakoniazy (Rys. 1, enzym 2) z *C. albicans* również wykazują właściwości przeciwgrzybowe. W 2012 roku wykazano, że ester trimetylowy kwasu *trans*-homoakoniowego (Rys. 3 d) przy stężeniu 16–32 µg mL⁻¹ hamuje w 80 % wzrost szczepów *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* oraz *C. glabrata* [Milewska i in. 2012].



Rys. 3 Inhibitory enzymów szlaku L-AA wykazujące działanie przeciwgrzybowe [na podstawie Milewska i in. 2012 i Palmer i in. 2004]

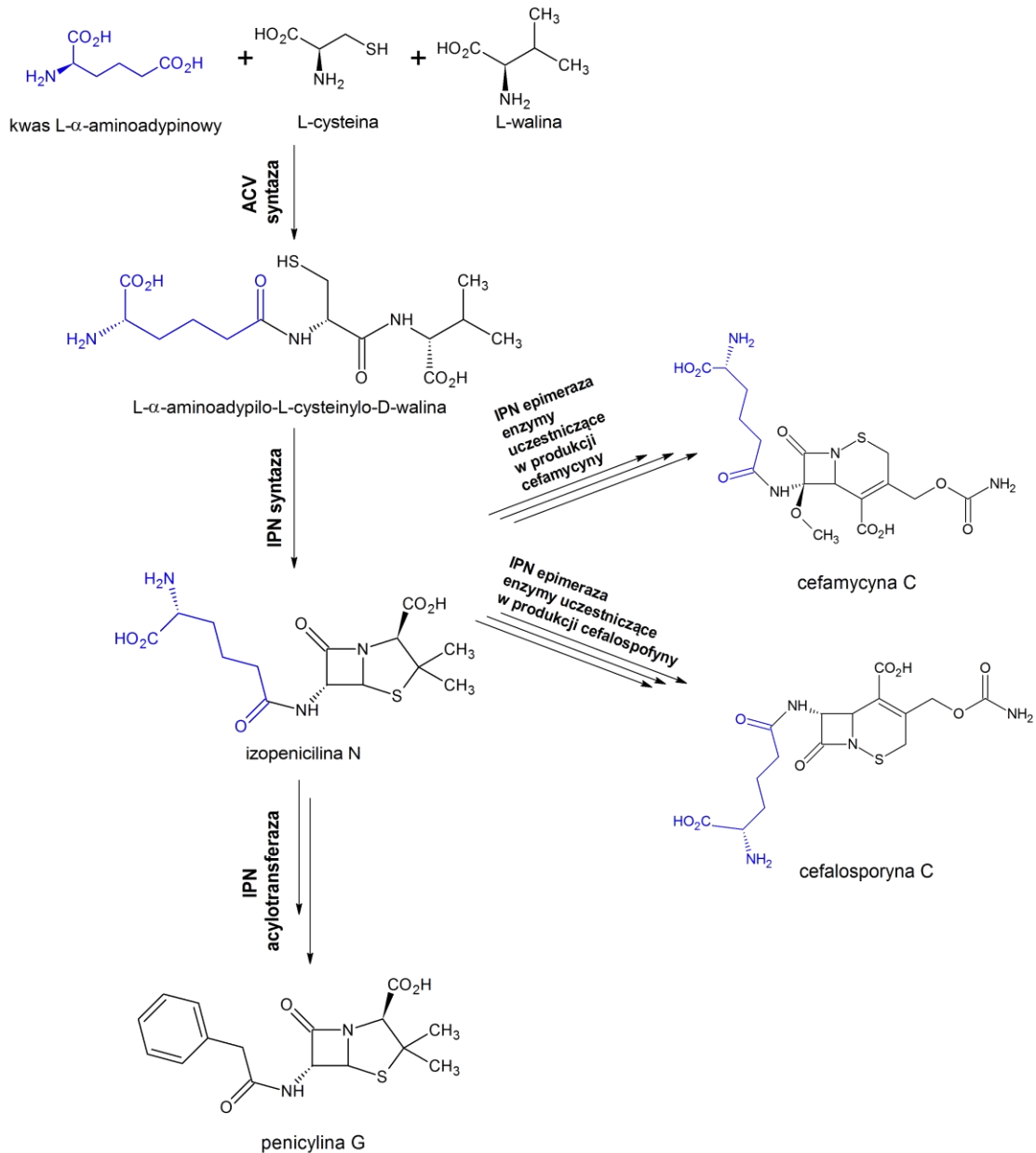
Drugim interesującym aspektem szlaku L-AA biosyntezy L-lizyny jest możliwość wykorzystania unikalnych sekwencji nukleotydowych kodujących enzymy szlaku z grzybów do opracowania metod na bazie reakcji PCR do szybkiej detekcji zakażenia (Rys. 4). Wykazano, że łańcuch polipeptydowy dehydrogenazy sacharopiny (Rys. 1, enzym 7) z *C. albicans* zawiera sekwencję 12 unikalnych reszt aminokwasowych (od Leu158 do Gly169), natomiast transferaza fosfopanteteinowa (produkt ekspresji genu *lys5*; potranskrypcyjny aktywator reduktazy α -aminoadypinowej) zawiera unikalną sekwencję 16 reszt aminokwasowych (od Ser131 do Ala146) [Garrad i in. 1994; Guo i Bhattacharjee 2003; Guo i in. 2006]. Selektywne startery rozpoznające geny kodujące te dwie sekwencje zastosowane w reakcji PCR umożliwiają szybką detekcję obecności *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*. Zastosowana metoda nie wymaga znakowania radioaktywnego, wynik jest czytelny po rozdzieleniu prób na żelu agarozowym. Ponadto jednoznaczne wyniki można uzyskać z użyciem 10 pg DNA. Jedynym ograniczeniem metody jest zastosowana technika izolacji DNA z materiału biologicznego [Guo i Bhattacharjee 2006].



Rys. 4 Zestawienie danych literaturowych dotyczących możliwości wykorzystania enzymów szlaku L-AA w chemoterapii przeciwgrzybowej i diagnostyce. [1] Gabriel i in. 2013, [2] Guo i Bhattacharjee 2006, [3] Milewska i in. 2012

Szlak L-AA jest również interesujący ze względu na jego powiązania ze szlakiem biosyntezy antybiotyków z grupy penicylin. L-AA jest ważnym prekursorem w biosyntezie penicyliny G, jednak nie wchodzi w skład jej struktury (Rys. 5) [Fazius i in. 2013]. Inaczej jest natomiast w przypadku cefalosporyny C i cefamycyny C. Obecność L-AA jest kluczowa dla produkcji tych antybiotyków. Udowodniono, że dodatek L-AA do pożywki zwiększa produkcję

penicyliny przez *P. chrysogenum*. Podobny efekt uzyskuje się poprzez delecję genu *lys2* kodującego reduktazę α -aminoadypinową (Rys. 1, enzym 5).

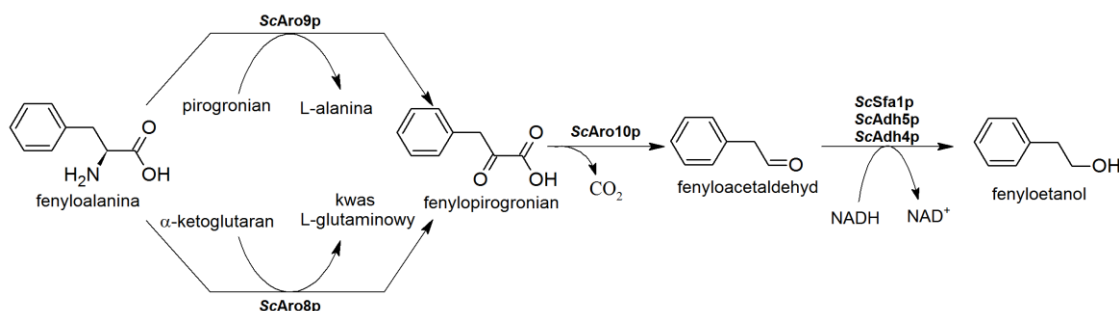


Rys. 5 Znaczenie kwasu L- α -aminoadypinowego w biosyntezie antybiotyków β -laktamowych [na podstawie Fazius i in. 2013]

Zwiększając produkcję L-AA, można zwiększyć produkcję poszczególnych antybiotyków [Casqueiro i in. 1999]. Poznając procesy regulujące działanie L-AA i enzymy uczestniczące w tym szlaku, można się przyczynić do poszerzenia wiedzy w zakresie ogólnego funkcjonowania szlaku.

Istnieją również badania sugerujące, że białka o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej (AmAA) (Rys. 1, enzym 4) mogą mieć wpływ na jakość fermentacji żywności przeprowadzanej przez *S. cerevisiae* [Schoondermark-Stolk i in. 2006]. Ciekawym aspektem aplikacyjnym może być również powiązanie białka Aro8p o aktywności AmAA

(Rys. 1, enzym 4 [Bulfer i in. 2013; Rząd i Gabriel 2015]) ze szlakiem biosyntezy aminokwasów aromatycznych i produkcją różnego aromatu, jakim jest fenyloetanol, popularny dodatek do żywności czy kosmetyków (Rys. 6) [Etschmann i in. 2002; Romagnoli i in. 2015]. Ze względu na wysoki potencjał energetyczny, fenyloetanol jest również rozpatrywany w charakterze potencjalnego biopaliwa [Shen i in. 2016]. Naturalny fenyloetanol otrzymywany jest w procesie ekstrakcji z roślin, kwiatów. Ten proces charakteryzuje się jednak małą wydajnością, niską powtarzalnością i wysokimi kosztami produkcji ze względu na ograniczony dostęp do materiału i jego niejednorodność [Hua i Xu 2011; Mei i in. 2009]. W czasie syntezy chemicznej natomiast, generowane są toksyczne produkty uboczne a produkt końcowy nie może być określany mianem naturalnego. Ze względu na zaostrzenie regulacji prawnych ustawodawstwa europejskiego i światowego o zakazie stosowania sztucznych aromatów, biotechnologiczna produkcja fenyloetanolu z glukozy z wykorzystaniem komórek drożdżowych może być niezwykle ekonomicznie korzystną alternatywą [Eshkol i in. 2009; Etschmann i in. 2002; Etschmann i in. 2005; Shen i in. 2016]. Tym bardziej, że w warunkach tlenowych na pożywce z fenyloalaniną *S. cerevisiae* produkuje fenyloetanol i fenylooctan w proporcji 9:1 natomiast w warunkach beztlenowych produkowany jest tylko fenyloetanol [Vuralhan i in. 2003; Vuralhan i in. 2005]. Produkcja fenyloetanolu z fenyloalaniny nie jest jednak opłacalna.

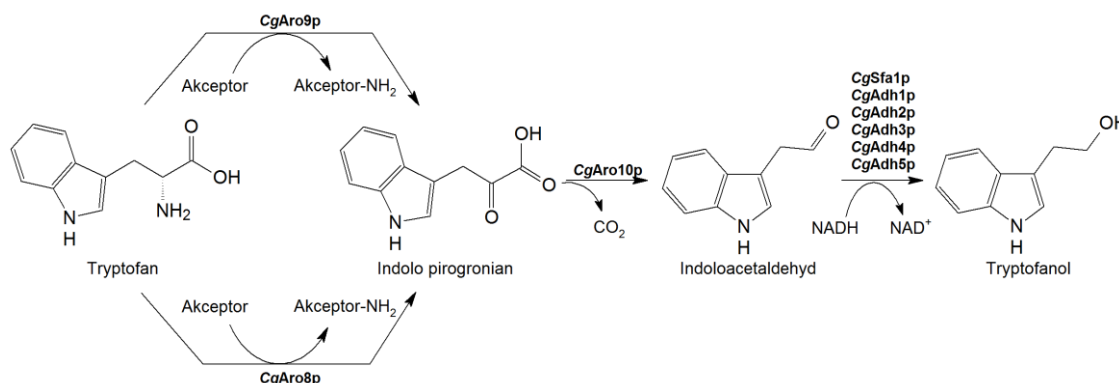


Rys. 6 Szlak Ehrlicha w *S. cerevisiae*, katabolizm fenyloalaniny do fenyloetanolu. ScAro8p- aromatyczna aminotransferaza I, α -aminotransferaza kwasu L- α -aminoadypinowego, ScAro9p – aromatyczna aminotransferaza II, ScAro10p- dekarboksylaza fenylopirogroonianowa, ScSfa1p –dehydrogenaza formaldehydowe, ScAdh5p, ScAdh4p- dehydrogenazy etanolowe IV i V [na podstawie: Brunke i in. 2010; Hazelwood i in. 2008; Shen i in. 2016]

Usunięcie genu Δ aro8 powoduje zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia aromatycznych aminokwasów, co wpływa na aktywację białka Aro80p z *S. cerevisiae* (ScAro80p), aktywatora ekspresji ARO10. Dodatkowo usunięcie genu ARO8 umożliwia potranslacyjną aktywację dekarboksylazy fenylopirogroonianowej, a tym samym nieznaczną produkcję fenyloetanolu na pożywce syntetycznej z glukozą i siarczanem amonu [Romagnoli i in. 2015]. W celu opracowania opłacalnego ekonomicznie biotechnologicznego procesu wytwarzania fenyloetanolu w komórkach grzybowych wymagane są dalsze badania w zakresie regulacji jego produkcji na poziomie komórkowym i optymalizacja procesu.

Białko Aro8p może mieć również znaczenie dla wirulencji komórek grzybowych. Wykazano, że delecja genu ARO8 kodującego aromatyczną aminotransferazę u *C. glabrata* powoduje zahamowanie pigmentacji na pożywce z tryptofanem, jako źródłem azotu, co może być związane ze zmniejszeniem wirulencji tego szczepów [Brunke i in. 2010]. Barwnik produkowany przez *C. glabrata* oparty jest na bazie tryptofanu [Brunke i in. 2010;

Mayser i in. 2007] i wykazuje podobieństwo do barwnika z *Malassezia furfur* [Mayser i in. 1998; Mayser i in. 2007]. Pigmentacja pozwala na zabezpieczenie komórki grzyba przed reakcją obronną gospodarza. Wiadomo, że neutrofile chroniące organizm przed atakiem patogenów produkują H_2O_2 , który następnie powoduje powstawanie szeregu toksycznych substancji [Kowanko i in. 1991; Nathan 1989]. Komórki *C. glabrata* produkujące pigment wykazują większą odporność na działanie H_2O_2 , a tym samym wykazują większą odporność na reakcje obronne organizmu gospodarza. Grzybowe komórki pigmentujące wywołują również większe uszkodzenia monowarstwy komórek ludzkich w modelu kandydozy ludzkiego nabłonka. Pigment z *M. furfur* natomiast powoduje apoptozę ludzkich melanocytów [Krämer i in. 2005], chroni komórki przed szkodliwym promieniowaniem UV [Machowinski i in. 2006; Mayser i in. 2002] i jest odpowiedzialny za patogenezę tego mikroorganizmu [Krämer i in. 2005]. Zablokowanie produkcji pigmentu może mieć więc wpływ na zmniejszenie zjadliwości szczepu. Zarówno u *C. glabrata* jak i *M. furfur* pigmentacja w warunkach laboratoryjnych występuje, gdy w pożywce obecny jest tryptofan, jako źródło azotu [Mayser i in. 2007]. Obecność innego aminokwasu w pożywce jako źródło azotu redukuje pigmentację. Delecja genu *ARO8* u *C. glabrata* powoduje zahamowanie pigmentacji. Natomiast szczep $\Delta aro10$ wykazuje wzmoczoną produkcję barwnika [Brunke i in. 2010].



Rys. 7 Szlak Ehrlicha u *C. glabrata*, katabolizm tryptofanu do tryptofanolu [na podstawie Brunke i in. 2010]

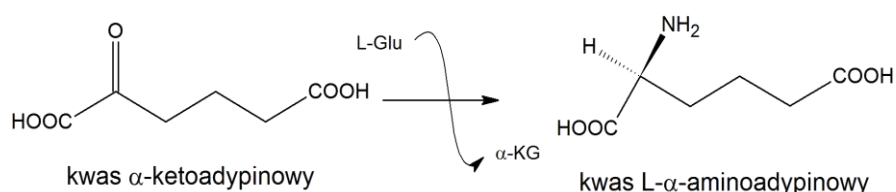
W szczepie *C. glabrata* z usuniętym białkiem Aro10p (*CgAro10p*), indolopirogronian prawdopodobnie nie jest przetwarzany do tryptofanolu, natomiast powstaje z niego brązowy pigment (Rys. 7). Szczep *C. glabrata* $\Delta aro8$ nie jest auksotroficzny względem żadnego aminokwasu, ale wykazuje zmniejszoną szybkość wzrostu na pożywce z tryptofanem, fenyloalaniną, tyrozyną, histydyną czy metioniną, jako źródłem azotu [Brunke i in. 2010]. Wzrost na pożywce z L-Trp i L-His jest bardzo słaby. Wykazano, że enzym Aro8p z *C. glabrata* (*CgAro8p*) umożliwia wykorzystanie histydyny jako źródła azotu, zwiększając tym samym właściwości przystosowawcze tego szczepu [Brunke i in. 2014]. Niewielkie różnice w szybkości wzrostu zaobserwowano również dla mutantu $\Delta aro9$. Delecja tego genu nie ma jednak wpływu na pigmentację [Brunke i in. 2010]. Również w *S. cerevisiae* usunięcie genu *ARO9* tylko w niewielkim stopniu wpływa na wzrost komórek na pożywce z różnymi źródłami azotu [Urrestarazu i in. 1998].

C. albicans ma również zdolność do produkcji pigmentu na bazie tryptofanu. Do tej pory nie opisano enzymu odpowiedzialnego za ten proces. Produkcja pigmentu jest zależna od

obecności światła, promieniowania UV oraz od pH podłoża [Chaskes i in. 2008]. Podobny co do właściwości fizykochemicznych pigment znaleziono w *M. furfur*. Wykazano, że u *M. furfur* w produkcji pigmentu uczestniczy aminotransferaza tryptofanowa MfTam1p [Preuss i in. 2013]. Enzym ten wykazuje powinowactwo do α -ketoglutaranu, L-Trp i fenylopirogrońianu, jednakże nie katalizuje reakcji z L-Phe, L-Ala, L-His. Nie sprawdzano też powinowactwa enzymu do kwasu L- α -aminoadypinowego czy kwasu α -ketoadypinowego. Produkcja pigmentu przez *C. albicans* jest ciekawym tematem do dalszych badań.

2.4 α -Aminotransferaza L- α -aminoadypinowa (AmAA)

Grzybowa α -aminotransferaza L- α -aminoadypinowa (AmAA) jest czwartym enzymem szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego (L-AA) biosyntezy L-lizyny (Rys. 1). Przekształca kwas α -ketoadypinowy (α -KA) do L-AA, z użyciem L-Glu, jako donora grupy aminowej (Rys. 8).



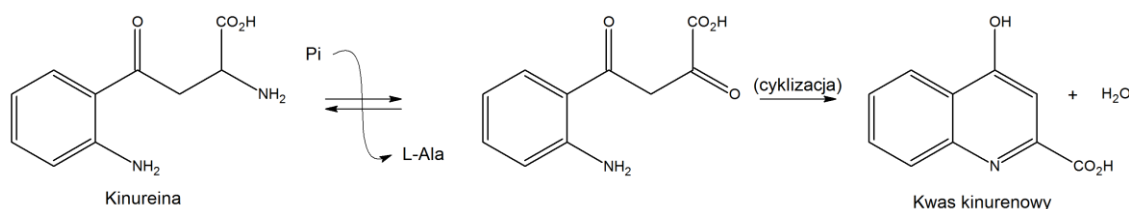
Rys. 8 Reakcja katalizowana przez α -aminotransferazę kwasu L- α -aminoadypinowego

AmAA mogą również uczestniczyć w szlaku biosyntezy aromatycznych aminokwasów oraz ich degradacji. Te cechy mogą wiązać się ze zdolnością grzybów do wykorzystywania szeregu aminokwasów, jako źródła azotu, umiejętnością produkcji pigmentu z tryptofanu (czynnika wirulencji?) [Brunke i in. 2010; Brunke i in. 2014; Chaskes i in. 2008; Chaskes i in. 2014; Preuss i in. 2013] czy umiejętnością biosyntezy fenyloetanolu (związku o aromacie różanym) wykorzystywanego w przemyśle (Roz. 2.3). AmAA pełni istotną funkcję w procesie produkcji antybiotyków z grupy penicylin (Roz. 2.3) a także może uczestniczyć w szlaku biosyntezy aminokwasów rozgałęzionych [Urrestarazu i in. 1998; Miyazaki i in. 2004]. Szerokie spektrum działania tych białek powoduje, że stają się one ciekawym zagadnieniem badawczym.

Enzymy o aktywności AmAA mogą uczestniczyć zarówno w procesie biosyntezy L-lizyny, jak i degradacji (hKATIIP, α -aminotransferaza L-kinureninowa/L- α -aminoadypinowa z ludzkiej wątroby [Han i in. 2008a], α -aminotransferazy L-kinureninowej/L- α -aminoadypinowej (KAT) ze szczurzej nerki [Mawal i in. 1991; Tobes i Mason 1977]). Grzybowa AmAA jest enzymem bardzo słabo poznanym, co więcej aktywność AmAA przypisywana jest produktom kilku genów. W *S. cerevisiae*, aktywność AmAA wykazano u trzech białek ScYer152Cp, ScBna3p, ScAro8p [Iraqi i in. 1998; King i in. 2009; Wogulis i in. 2008]. Ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej ScAro9p do białka ScAro8p (54% podobne [Iraqi i in. 1998]) oraz na podstawie wyników badań wykonanych przez zespoły Matsuda i Ogur [1969] i Urrestarazu [1998] można przypuszczać, że ScAro9p również może spełniać rolę AmAA w komórce. W 2011 roku wykazano, że gen kodujący białko Yer152Cp jest silnie zakonserwowany w genomach komórek drożdży, natomiast w *K. thermotolerans* występuje w dwóch kopiach, co sugeruje, że enzym ten pełni istotną rolę w metabolizmie komórki [Hébert i in. 2011]. Białka Aro8p i Yer152Cp są obecne u *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *S. stipitis*,

C. albicans, *Y. lipolytica*, *Z. rouxii*, *K. thermotolerans*, *L. kluyveri*, *K. lactis*, *E. gossypii* i *D. hansenii*, wszystkich szczepach przeanalizowanych przez grupę Héberta natomiast Aro9p nie występuje tylko u *E. gossypii* i *D. hansenii* [Hébert i in. 2011]. Ponadto wiadomo, że Aro8p, Aro9p i Yer152Cp są w większości białkami cytoplazmatycznymi. Jedynie Aro9p w *Y. lipolytica* występuje w mitochondrium. W przypadku AmAA z nerki szczurzej i nerki wołowej, sytuacja wygląda inaczej tj. 70% wołowej i 55% szczurzej AmAA znajduje się w mitochondrium [Deshmukh i Mungre 1989] natomiast ludzka AmAA znajduje się tylko w mitochondrium [Goh i in. 2002]. Z kolei, w komórkach bakteryjnych *T. thermophilus* istnieją co najmniej dwa białka o aktywności AmAA [Miyazaki i in. 2004], jednakże dotychczas udało się wyznaczyć parametry kinetyczne tylko jednego enzymu, T α LysNp.

Rola białka ScBna3p w komórce *S. cerevisiae* nie jest do końca jasna. Wykazano, że posiada ono aktywność aminotransferazy kinureninowej (KAT), jednakże wiadomo też, że może uczestniczyć jeszcze w innych procesach biosyntezy [Wogulis i in. 2008]. Katalizuje reakcje przekształcania kinureniny do jej α -ketokwasu, który ulega cyklizacji do kwasu kinurenowego (Rys. 9). Jest enzymem PLP zależnym.



Rys. 9 Reakcja katalizowana przez kinureninową aminotransferazę [na podstawie King i in. 2009]

Wiadomo, że ScBna3p może też katalizować reakcję AmAA [King i in. 2009], jednak wykazuje aktywność na niskim poziomie w porównaniu do zbadanej aktywności ScAro8p czy ScYer152Cp. Do tej pory nie wyjaśniono, która reakcja katalizowana przez ScBna3p dominuje *in vivo*. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej można przypuszczać, że białko ScBna3p pełni rolę AmAA. Białko ScBna3p wykazuje bowiem wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej do ludzkich białek o aktywności KAT: hKATI_p (39%) oraz hKATI_{IIp} (45%). Podobnie jest w przypadku białek ScAro8p i ScAro9p, ich podobieństwo do ludzkich KAT wynosi: 41-42% do hKATI_p i 47% do hKATI_{IIp}. Białko hKATI_{IIp} opisywane jest jako α -aminotransferaza L-kinureninowa/L- α -amino-adypinowa. Wykazano, że hKATI_{IIp} katalizuje reakcje rozkładu L-AA (tj. w kierunku katabolizmu L-lizyny), a powinowactwo enzymu do L-AA jest nawet wyższe niż do kwasu kinurenowego (K_M L-AA = $0,9 \pm 0,1$ [mM]; K_M kw. kinurenowy = $4,7 \pm 0,8$ [mM]) [Han i in. 2008a]. Ponadto, analizując mutanty delecyjne *S. cerevisiae*, można by wykluczyć rolę ScBna3p jako KAT w komórce. Usunięcie genu *ARO9* z genomu *S. cerevisiae* wywołuje bowiem 96% spadek aktywności KAT w surowym ekstrakcie, natomiast dla szczepu Δ aro8 spadek aktywności KAT wynosi 15% [Urrestarazu i in. 1998]. Nie sprawdzono jednakże aktywności KAT w surowym ekstrakcie szczepu Δ aro8 Δ aro9, co ostatecznie mogłoby wyjaśnić rolę ScBna3p w szlaku kwasu kinurenowego.

Białka o aktywności AmAA charakteryzują się zdolnością do wykorzystywania szerokiego spektrum substratowego (Tab. 1), a co za tym idzie mogą brać udział w wielu

reakcjach metabolizmu. Ich cechą charakterystyczną jest fakt, że trudno jest je odpowiednio sklasyfikować i określić, która ich funkcja jest dominująca *in vivo*.

Tab. 1 Zestawienie szeregu substratów wykorzystywanych przez białka o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej i aminotransferazy aromatycznej z różnych organizmów. [1] Kradolfer i in. 1982, [2] King i in. 2009, [3] Chen i in. 2009, [4] Matsuda i Ogur 1969, [5] Miyazaki i in. 2004, [6] Passera i in. 2011, [7] Wogulis i in. 2008, [8] Han i in. 2008a, [9] Iraqui i in. 1998, [10] Karsten i in. 2011, [11] Brunke i in. 2010, [12] Urrestarazu i in. 1998, [13] Brunke i in. 2014

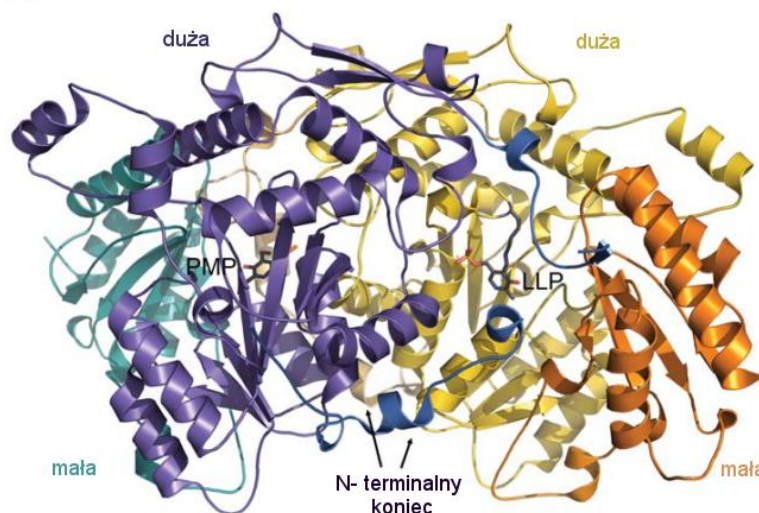
Białko	Donor grupy aminowej	Akceptor grupy aminowej
ScAro8p <i>S. cerevisiae</i>	tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina ^{9,10} , kwas L- α -aminoadypinowy ^{2,9,10} , kinurenina, metionina, leucyna, kwas glutaminowy ¹² , histydyna ¹³	α -ketoglutaran ^{2,9} , fenylopirogrońian ⁹ , α -ketoadypinian ¹⁰
ScYer152Cp <i>S. cerevisiae</i>	kwas L- α -aminoadypinowy ²	α -ketoglutaran ²
ScBna3p <i>S. cerevisiae</i>	kwas L- α -aminoadypinowy ² , kinurenina ⁷	α -ketoglutaran ² , pirogrogrońian, α -ketobutyrynian ⁷
ScAro9p <i>S. cerevisiae</i>	fenyloalanina ³ , tryptofan ⁹ , metionina, leucyna, kinurenina, kwas L- α -aminoadypinowy ¹²	pirogrogrońian ⁹ , fenylopirogrońian ⁹ , α -ketoadypinian ¹²
CgAro8p <i>C. glabrata</i>	tryptofan ¹¹ , fenyloalanina, histydyna ¹³	α -ketoglutaran ¹¹
Transaminaza α -ketoadypino glutaminowa I <i>S. cerevisiae</i>	kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, kwas L- α -aminoadypinowy ⁴	α -ketoadypinian, α -ketoglutaran ⁴
Transaminaza α -ketoadypino glutaminowa II <i>S. cerevisiae</i>	kwas glutaminowy, kwas L- α -aminoadypinowy ⁴	α -ketoadypinian, α -ketoglutaran ⁴
Aromatyczna aminotransferaza I <i>S. cerevisiae</i>	tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina ¹	α -ketoglutaran, hydroksyfenylopirogrońian, pirogrogrońian ¹
Aromatyczna aminotransferaza II <i>S. cerevisiae</i>	tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina ¹	fenylopirogrońian, pirogrogrońian ¹
TfLysNp <i>T. thermophilus</i>	kwas glutaminowy ⁵	α -ketoadypinian, pirogrogrońian, fenylopirogrońian, szczawiooctan, α -ketoizowalerian, α -ketoizokapronian, α -keto-3-metylowalerian ⁵
hKATIIP <i>H. sapiens</i>	m.in. kinurenina, kwas L- α -aminoadypinowy ⁶ , metionina, tryptofan, kwas glutaminowy, glutamina, tyrozyna, alanina, leucyna ⁸	m.in. α -ketoglutaran ⁶ , kwas glioksalowy, kwas α -ketokapronowy, fenylopirogrońian, indolo-3-pirogrogrońian, α -ketoadypinian, α -ketobutyrynian, pirogrogrońian, hydroksyfenylopirogrońian, merkaptopirogrogrońian ⁸

Struktura przestrzenna AmAA

α -Aminotransferaza L- α -aminoadypinowa ScAro8p z *S. cerevisiae* zbudowana jest z dwóch homodimerów złożonych z podjednostek A i B oraz C i D (Rys. 10) [Bulfer i in. 2013].

Ogólna struktura wykazuje typowe pofałdowanie dla aminotransferaz typu I. AmAA należą do tej subgroupi wraz z aminotransferazami: asparaginową, alaninową oraz aromatyczną [Mehta i Christen 1993]. ScAro8p składa się z domeny dużej (reszty od 52 do 368) i małej (reszty 369 do 500) ułożonych względem siebie w konfiguracji α/β . N-terminalny koniec (reszty 1-51) poprzedza dużą domenę. Podobną budowę ma α -aminotransferaza L- α -aminoadypinowa TfLysNp z *T. thermophilus*. Białko TfLysNp tworzy dimer z dużym wewnętrznym złączeniem

podjednostek. Każdy monomer jest podzielony na trzy strukturalne domeny: N-terminalny koniec (reszty od 5 do 19), małą domenę złożoną z dwóch regionów (reszty od 20 do 45 i od 285 do 395) i dużą domeną (reszty od 46 do Gly284). Taki układ zaobserwowano też dla asparaginowej aminotransferazy z *T. thermophilus* [Nakai i in. 1999] i aromatycznej aminotransferazy *Paracoccus denitrificans* [Okamoto i in. 1998].



Rys. 10 Struktura ScAro8p z *S. cerevisiae*. N-terminalny koniec, mała i duża domena podjednostki C zaznaczone odpowiednio na kolor ciemno niebieski, morski i fioletowy, natomiast z podjednostki D na kolor jasno pomarańczowy, ciemno pomarańczowy i żółty [Bulfer i in. 2013]

Domenę dużą w ScAro8p tworzą β -kartki, $\beta 4$ - $\beta 5$ oraz $\beta 8$ - $\beta 12$, otoczone α -helisami $\alpha 4$ - $\alpha 8$, $\alpha 11$, $3_{10}6$ [Bulfer i in. 2013]. Dwie β -kartki $\beta 2$ - $\beta 3$ tworzą antyrównoległą kartkę oddziałującą z odpowiednimi β -kartkami sąsiadującej podjednostki tworząc 4-kartkowy styk dimerów. Ten rodzaj połączenia zaobserwowano jeszcze w aminotransferazie ludzkiej hKATIIp [Rossi i in. 2008a]. Nie jest to jednak typowy element drugorzędowej struktury aminotransferaz typu I, które w tej pozycji posiadają α -helisy (np. *TtLysNp* *T. thermophilus* [Karsten i in. 2011; Tomita i in. 2009]). Kolejną różnicą pomiędzy ScAro8p oraz *TtLysNp* i hKATIIp jest obecność w dużej domenie białka z *S. cerevisiae* zewnętrznej pętli zawierającej helisy $\alpha 10$, $\alpha 11$ [Bulfer i in. 2013].

Mała domena białka ScAro8p zawiera 4-niciowe antyrównoległe β -kartki $\beta 13$ i $\beta 14$ oraz $\beta 16$ i $\beta 17$ osłonięte przez grupę α -helis $\alpha 13$ - $\alpha 15$ i $3_{10}8$. Pofałdowanie małej domeny jest homologiczne z *TtLysNp* i hKATIIp, poza obecnością dodatkowej pętli w ScAro8p zawierającej helisy $3_{10}9$, $3_{10}10$, $3_{10}12$ [Bulfer i in. 2013; Karsten i in. 2011; Rossi i in. 2008a; Tomita i in. 2009].

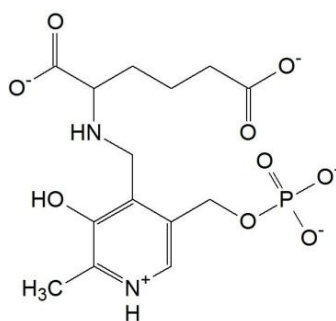
Motyw N-końca w ScAro8p różni się znacząco od typowego pofałdowania aminotransferaz typu I. W *TtLysNp* i aminotransferazach typu I znajdują się w tym miejscu dwie α -helisy, gdzie $\alpha 2$ blokuje wejście do centrum aktywnego tej samej podjednostki [Tomita i in. 2009]. W ScAro8p natomiast heliakalny region N-końca ($\alpha 1$ - $\alpha 2$, $\beta 1$ i $3_{10}1$ - $3_{10}2$) blokuje wejście do centrum aktywnego enzymu sąsiadującej podjednostki [Bulfer i in. 2013]. Taki sam układ zaobserwowano dla hKATIIp. Zamknięcie zbudowane z helisy $\alpha 2$ zostało zaobserwowane w kryształach ScAro8p w podjednostkach A i C natomiast dla B i D zauważono nieuporządkowaną

strukturę wskazującą na wysoką elastyczność tego regionu [Bulfer i in. 2013]. W hKATIIP N-koniec jest elementem ruchomym i obserwowanym w kryształach jako region nieuporządkowany. Podczas wiązania kinureniny do enzymu, N-koniec przemieszcza się z dala od centrum aktywnego robiąc miejsce dla substratu. Tak samo dzieje się podczas wiązania kwasu α -ketoglutarynowego [Han i in. 2008a].

Centrum aktywne ScAro8p znajduje się w szczelinie pomiędzy dużą i małą domeną, ułożone wzdłuż podjednostki, osłonięte N-terminalnym końcem dużej domeny sąsiedniej podjednostki [Bulfer i in. 2013]. Sposób wiązania PLP w ScAro8p jest podobny jak w innych aminotransferazach typu I: PLP tworzy zasadę Schiffa z ϵ -aminową grupą Lys305 (LLP) i oddziałuje z kilkoma wysoce zakonserwowanymi resztami. Pierścień pirydynowy LLP znajduje się pomiędzy resztami Phe141 i Pro250, a C2' oddziałuje hydrofobowo z Ile215. Atom O3' LLP tworzy wiązanie wodorowe z bocznym łańcuchem Tyr251 i Asn220, a azot pirydynowy tworzy mostek solny z grupą karboksylową Asp248. Grupa fosforanowa LLP jest stabilizowana przez wiele oddziaływań typu dipol-dipol. Tworzy wiązanie wodorowe z grupami aminowymi łańcuchów głównych Asn141, Thr142 i grupami hydroksylowymi łańcuchów bocznych Thr142, Ser303, Ser304 i Tyr105' (sąsiedniej podjednostki) oraz mostek solny z guanidynową grupą Arg312 [Bulfer i in. 2013]. Zaobserwowane oddziaływania LLP w ScAro8p są analogiczne jak dla hKATIIP i T δ LysNp za wyjątkiem obecności Phe166 i Ile215, które w hKATIIP są zastąpione tyrozyną i waliną [Han i in. 2008b; Rossi i in. 2008a].

Oddziaływania kofaktora PMP z podjednostkami ScAro8p jest identyczne jak podczas stabilizacji LLP [Bulfer i in. 2013]. Grupa fosforanowa każdego kofaktora zajmuje te same pozycje i tworzy te same wiązania wodorowe i mostki solne z odpowiednimi resztami. Jednakże w PMP pierścień pirydoksalu z atomem C4 jest przesunięty o $\sim 16^\circ$ od Lys305. Takie ułożenie LLP, PMP czy kompleksu PLP-substrat jest powszechnie obserwowanym zjawiskiem wśród α -aminotransferaz L- α -aminoadypinowych i występuje również w T δ LysNp i hKATIIP (obrót o odpowiednio 29° i 20° stopni) [Han i in. 2008b; Tomita i in. 2009]. LLP i PMP wiążą się z centrum aktywnym ScAro8p wprowadzając tylko niewielkie zmiany konformacyjne [Bulfer i in. 2013]. Do tej pory nie udało się uzyskać kryształu ScAro8p ze związanym substratem, jednakże na podstawie podobieństwa strukturalnego przypuszcza się, że enzym ten wiąże substraty analogicznie do T δ LysNp i hKATIIP. Białka T δ LysNp i hKATIIP uzyskano ze związanym odpowiednio analogiem substratu tj. związkami PPA (Rys. 11) i kinureniną [Han i in. 2008b; Tomita i in. 2009]. Wykazano, że związane substraty oddziałują z argininą, Arg23 w T δ LysNp i Arg20 w hKATIIP. W T δ LysNp δ -karboksylowa grupa L- α -aminoadypinianu jest stabilizowana przez utworzony mostek solny z guanidynową grupą Arg23 [Ouchi i in. 2009], natomiast Arg20 z hKATIIP bierze udział w oddziaływaniach kation- π z kinureniną [Han i in. 2008b]. W ScAro8p arginina zastąpiona jest Lys26 i znajduje się w α -helisie kontaktującej się z centrum aktywnym sąsiedniej podjednostki homodimeru. Modelowanie molekularne wykazało, że ta reszta lizynowa może pełnić istotną rolę w rozpoznawaniu substratów, analogicznie do reszty argininowej [Bulfer i in. 2013]. Kluczowe miejsca oddziaływania substratu, uwzględniając mostki solne i wiązania wodorowe pomiędzy kinureniną a resztami aminokwasowymi są

zakonserwowane w ScAro8p i hKATIIP (poza słabym wiązaniem wodorowym Tyr142 gdzie w ScAro8p obecna jest Phe166) [Bulfer i in. 2013].



Rys. 11 Związek PPA, analog substratu AmAA, połączenie kwasu L- α -aminoadypinowego z fosforanem pirydoksalu [na podstawie Han i in. 2008b]

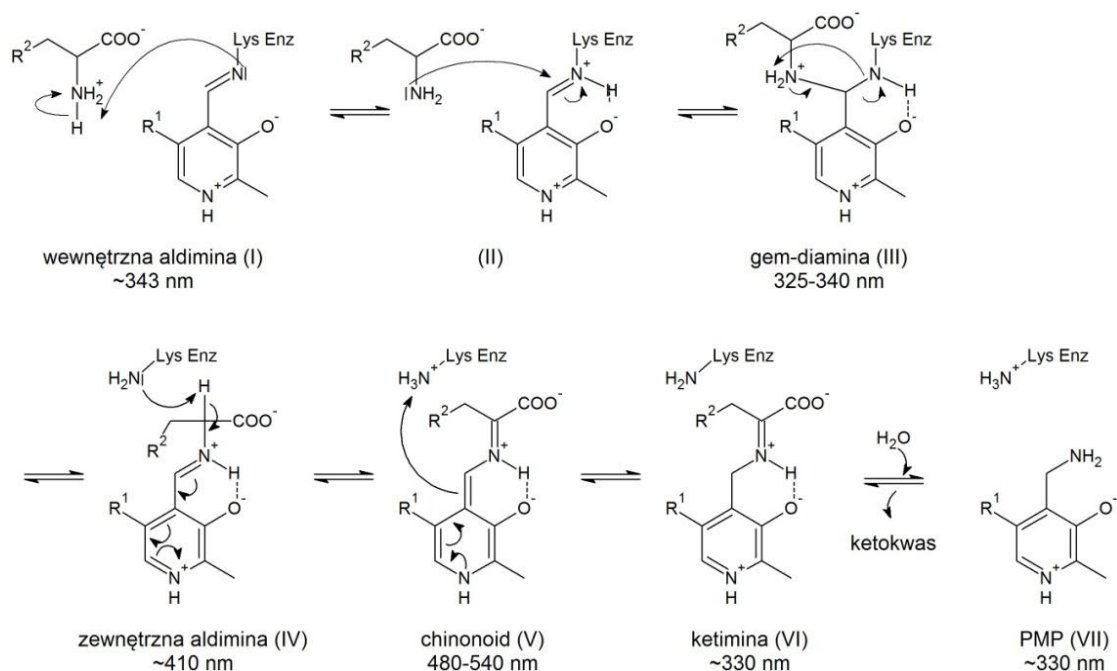
Obecność Lys26 w ScAro8p może wpływać na wiązanie niektórych substratów do enzymu. Dla przykładu ScAro8p wykazuje słabe powinowactwo do pary L-Glu i 4-hydroksyfenilo- pirogronianu (prekursorów L-Trp) [Karsten i in. 2011]. Inaczej jest natomiast dla enzymu hKATIIP, który jest w stanie katalizować reakcję powstawania L-tryptofanu [Han i in. 2008b]. Nie zostały jeszcze wyznaczone parametry kinetyczne dla T ϵ LysNp względem aromatycznych aminokwasów jednak wiadomo, że Arg23 ma znaczącą rolę w rozpoznawaniu kwasu glutaminowego. Wprowadzenie Ala lub Gln w miejsce Arg23 powoduje spadek efektywności katalizacyjnej o T ϵ LysNp 2-3 rzędy wielkości [Ouchi i in. 2009].

Na specyficzność substratową ScAro8p może mieć również wpływ zmienność konformacyjna N-końcowego regionu blokującego wejście do centrum aktywnego enzymu [Bulfer i in. 2013]. Wiązanie odpowiednich par aminokwasów i ketokwasów do T ϵ LysNp i hKATIIP obejmuje zmiany konformacyjne N-terminalnego motywu zawierającego helisę α 2. Nie jest to typowe dla aminotransferaz. Zarówno w aminotransferazie ludzkiej hKATIIP jak i aminotransferazie aminokwasów rozgałęzionych z *E. coli* zachodzą znacznie mniejsze zmiany konformacyjne po związaniu substratu [Jäger i in. 1994; Rossi i in. 2008b].

Mechanizm katalizowanej reakcji

Badania nad T ϵ LysNp oraz nad ScAro8p wykazały, że białka te katalizują przeprowadzaną reakcję według mechanizmu ping-pong charakterystycznego dla aminotransferaz [Karsten i in. 2011; Miyazaki i in. 2004]. Wykazano, że miejsce aktywne enzymu ScAro8p ma hydrofobowy charakter, co powoduje powinowactwo do podobnych substratów. Na podstawie badań kinetycznych, badań spektralnych i wpływu pH na aktywność enzymu zaproponowano mechanizm reakcji katalizowanej przez ScAro8p [Karsten i in. 2011]. W pierwszym etapie, następuje oderwanie protonu z dodatnio naładowanej grupy aminowej substratu przez wolną parę elektronową wewnętrznej iminy enzymu (Rys. 12, I). Następnie, nukleofilowa grupa aminowa substratu wykonuje atak na utworzoną zasadę Schiffa, w wyniku czego tworzy się produkt przejściowy *gem*-diamina (III), który ulega przegrupowaniu do iminy (IV). W wyniku oderwania -protonu przez lizynę, pochodzącą z miejsca aktywnego enzymu, powstaje struktura chinonoidowa (V), która ulega przegrupowaniu do ketiminy (VI).

W kolejnym kroku następuje hydroliza ketiminy, dzięki czemu powstaje odpowiedni ketokwas i pirydoksyamidowa forma enzymu [Karsten i in. 2011].



Rys. 12 Schemat mechanizmu reakcji katalizowanej przez AmAA zaproponowany na podstawie badań kinetycznych, spektralnych i wpływu pH na aktywność enzymu [na podstawie Karsten i in. 2011]

Analizując obecność zakonserwowanych reszt aminokwasowych w ScAro8p z *S. cerevisiae* Asn220, Asp248, Tyr251, Gly43, Lys305, TlLysNp z *T. thermophilus* Asn174, Asn202, Tyr205, Gly40 i Lys238 oraz asparaginowej aminotransferazie z *E. coli* (EcAsp-AT) Asn194, Asp222, Tyr225, Gly38, Lys258, można przypuszczać, że mechanizm transaminacji katalizowany przez α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowe będzie analogiczny z zaproponowanym dla EcAsp-AT [Tomita i in. 2009]. Grupa Hayashi wykazała, że naprężenie sprotonowanej wewnętrznej aldiminy (zasady Schiffa) utworzonej poprzez związanie PLP z Lys258 w EcAsp-AT wzmacnia zdolność katalityczną enzymu poprzez zmianę energii aktywacji reakcji [Hayashi i in. 1998]. pK_a aldiminy wzrasta o 3 jednostki w trakcie prowadzenia reakcji, od $pK_a = 6,8$ dla zasady Schiffa przez $pK_a = 8,8$ dla kompleksu Michaelisa (związanie aminokwasu w centrum aktywnym enzymu) do $pK_a > 10$ dla zewnętrznej aldiminy. Niska wartość pK_a wewnętrznej aldiminy jest spowodowana utrzymywaniem wewnętrznych naprężeń kompleksu poprzez obecność wiązań wodorowych pomiędzy atomem O3' PLP a grupą amidową bocznego łańcucha Asn194 i grupą hydroksylową Tyr225 oraz poprzez wytworzenie mostku solnego pomiędzy azotem pierścienia pirydynowego PLP i grupą karboksylową Asp222. Powstałe wewnętrzne naprężenia ulegają relaksacji poprzez przyłączenie aminokwasu do enzymu (kompleks Michaelisa), a następnie wytworzenie zewnętrznej aldiminy i uwolnienie Lys258. EcAsp-AT zmienia konformację z otwartej na zamkniętą co zmusza karbonylowy atom tlenu Gly38 do oddziaływania z hydroksylową grupą Tyr225. Niesprotonowana wewnętrzna aldimina (stan przed związaniem aminokwasu do centrum aktywnego enzymu) powoduje odpychanie wolnej pary elektronowej karbonylowego atomu tlenu Gly38 co wpływa na

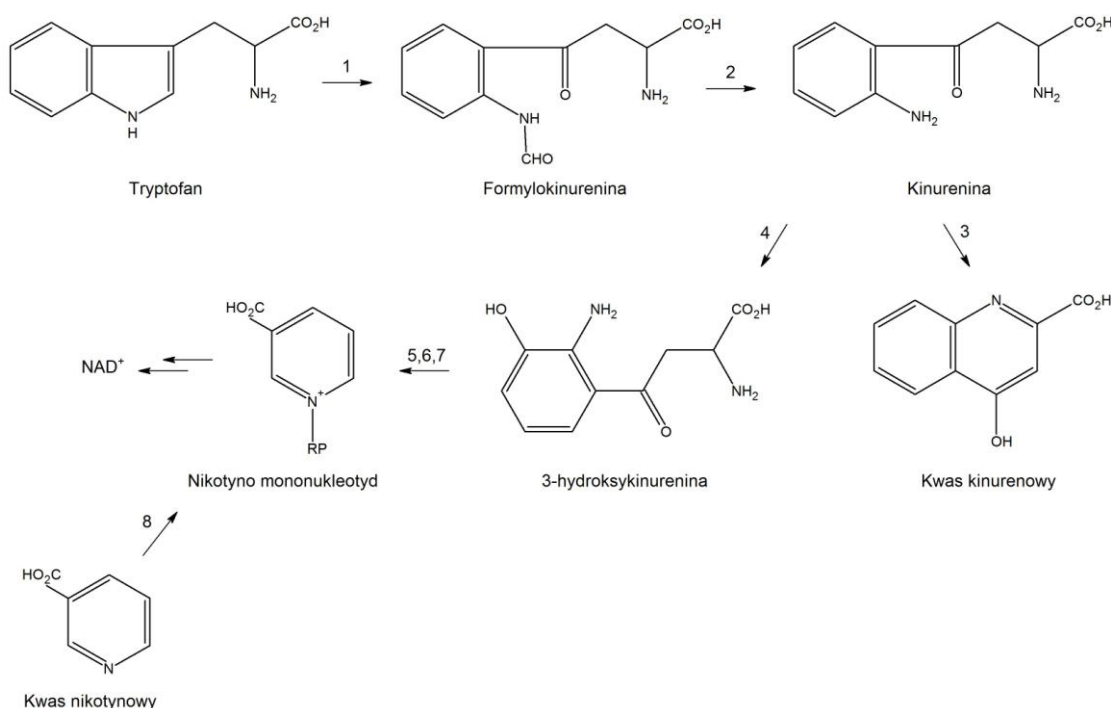
utworzenie energii aktywacji niezbędnej do powstania kompleksu Michaelisa, promując funkcje katalityczne [Hayashi i in. 2003].

Wpływ usunięcia genów AmAA na funkcjonowanie mikroorganizmu

Badanie fenotypu komórek, w których usunięto geny kodujące AmAA pozwala zrozumieć funkcjonowanie szlaków biosyntezy L-lizyny oraz biosyntezy aminokwasów aromatycznych i powiązanie produktów przejściowych tych szlaków z innymi procesami w komórce (Rys. 14). Szczep *S. cerevisiae* z usuniętym genem *ARO8* jest niezdolny do wzrostu na pożywce, w której jedynym źródłem azotu jest aminokwas aromatyczny (L-Phe, L-Tyr lub L-Trp) lub kinurenina [Urrestarazu i in. 1998]. Pomimo obecności białka ScAro9p odpowiadającego za degradację aromatycznych aminokwasów, usunięcie genu *ARO8* uniemożliwia przeprowadzenie tego procesu. Jednakże szczep Δ aro8 nie jest auksotroficzny względem żadnego aminokwasu (rośnie na pożywce, w której jedynym źródłem azotu jest siarczan amonu). Delecja genu *ARO8* nie wpływa znacząco na zaburzenie któregokolwiek szlaku biosyntezy. Mutant Δ aro9 jest w stanie wykorzystywać kinureninę i aromatyczne aminokwasy jako źródło azotu, jednakże jego wzrost na pożywkach z dodatkiem tych substancji jest słabszy niż wzrost szczepu dzikiego. Dopiero usunięcie obydwu genów *ARO8* i *ARO9* w jednym szczepie wywołuje auksotrofię względem aromatycznych aminokwasów [Urrestarazu i in. 1998]. Taki rezultat potwierdza wyłączność białek ScAro8p i ScAro9p jako aromatycznych aminotransferaz w *S. cerevisiae*. Ponadto aktywność AmAA w lizacie komórkowym szczepu *S. cerevisiae* z usuniętym genem *ARO8* jest o połowę niższa w porównaniu do szczepu dzikiego. Niewielką różnicę w spadku aktywności można zauważyć w szczepie Δ aro8 Δ aro9 [Urrestarazu i in. 1998]. Ten wynik potwierdza istnienie jeszcze jakiegoś białka w *S. cerevisiae* odpowiedzialnego za rolę AmAA *in vivo*. Ciekawym spostrzeżeniem jest 96% spadek aktywności aminotransferazy kinureninowej w szczepach z usuniętym białkiem ScAro9p [Urrestarazu i in. 1998]. Wcześniejsze doniesienia wskazują, że główną rolą ScAro9p jest degradacja tryptofanu [Kradolfer i in. 1982]. To stwierdzenie nie opiera się jednak na analizie wpływu delecji genów na fenotyp mikroorganizmu. Opiera się na analizie parametrów kinetycznych enzymów [Kradolfer i in. 1982]. Na podstawie analizy wpływu usunięcia genów na *S. cerevisiae* zauważono natomiast, że delecja *ARO8* i *ARO9* zmniejsza również szybkość wzrostu mutantów na pożywce z jedynym źródłem azotu w postaci metioniny czy leucyny. Aktywność ScAro8p i ScAro9p białek *in vivo* jest więc powiązana ze szlakiem degradacji tych aminokwasów [Urrestarazu i in. 1998]. Auksotrofii względem żadnego aminokwasu nie wykazuje również szczep *T. thermophilus* z usuniętym genem *LYSN* kodującym białko o aktywności AmAA [Miyazaki i in. 2004]. Jednakże wykazuje on defekt szybkości wzrostu, rośnie wolniej na podłożu minimalnym od szczepu dzikiego. Dodatek L-lizyny czy kwasu L- α -aminoadypinowego do pożywki w stężeniu 0,1 mM (związków, do których wytworzenia niezbędna jest AmAA) powoduje zwiększenie szybkości wzrostu mutantu, ale nie uzyskuje się takiego efektu podczas dodania 0,1 mM kwasu α -ketoadypinowego (związku, z którego AmAA wytwarza kwas L- α -aminoadypinowy). Taki wynik potwierdza rolę białka T θ LysNp jako AmAA. Ponadto wskazuje na obecność jeszcze jednego enzymu o tej aktywności.

Powiązanie białka *TfLysNp* z innymi szlakami metabolicznymi może sugerować jego sposób regulacji. Dodatek leucyny, izoleucyny lub waliny do pożywki powoduje zwiększenie szybkości wzrostu mutantu $\Delta lysN$ [Miyazaki i in. 2004]. Wskazuje to, podobnie jak w przypadku białka *ScAro8p* z *S. cerevisiae*, na powiązanie ze szlakiem biosyntezy rozgałęzionych aminokwasów [Urrestarazu i in. 1998]. Powiązanie ze szlakiem biosyntezy aromatycznych aminokwasów w przypadku białka *TfLysNp* jest jednak znikome. *TfLysNp* wykazuje bardzo niską aktywność w kierunku biosyntezy L-Phe, a dodatek aromatycznych aminokwasów do pożywki, jako źródła azotu nie ma wpływu na szybkość wzrostu mutantu [Miyazaki i in. 2004].

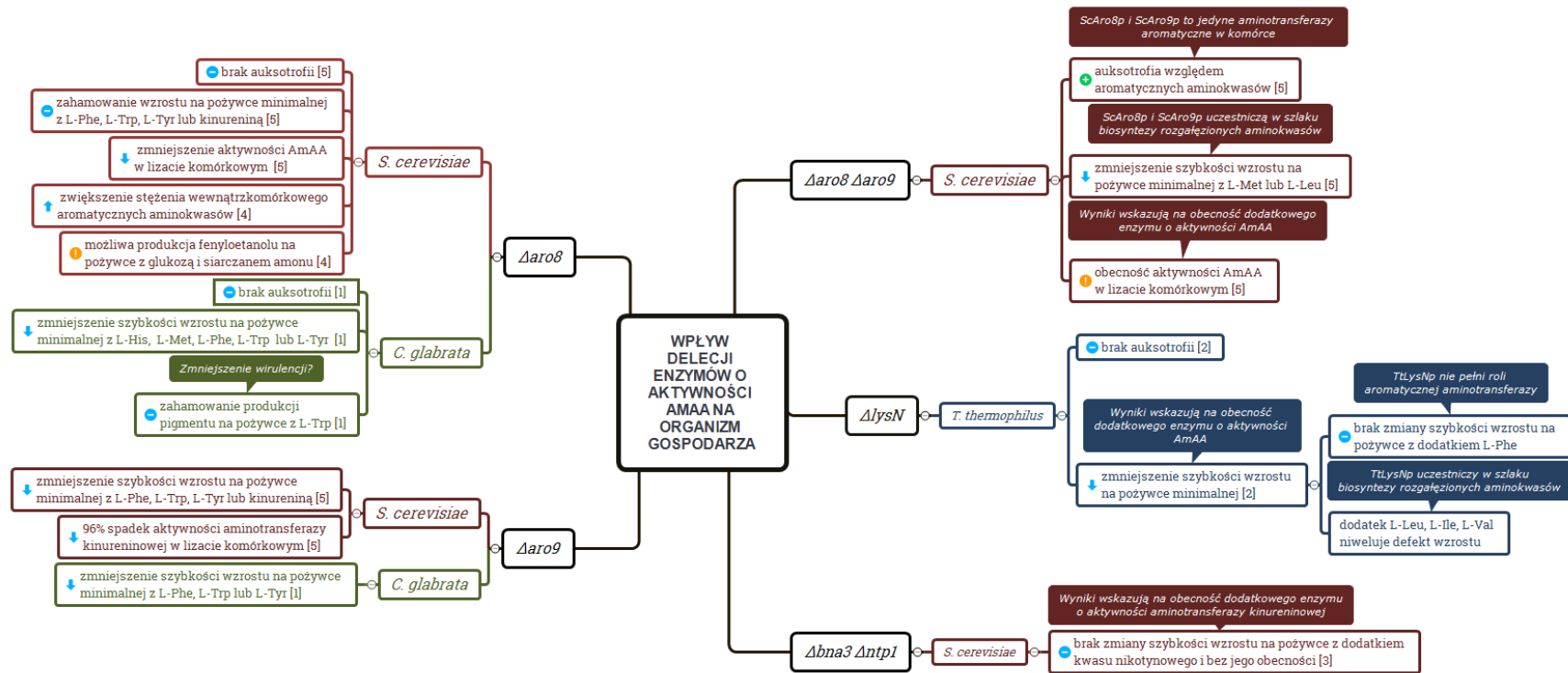
Analiza fenotypu mutantów *S. cerevisiae* z usuniętym genem kodującym białko *ScBna3p*, nie daje jednoznacznej odpowiedzi co do roli tego enzymu w komórce. Jak wspomniano wcześniej (Roz. 2.4) wiadomo, że *ScBna3p* może katalizować reakcję AmAA [King i in. 2009], jednakże wykazuje też aktywność KAT [Wogulis i in. 2008], może uczestniczyć w szlaku biosyntezy NAD^+ . W *S. cerevisiae* NAD^+ produkowany jest *de novo* w szlaku kwasu kinurenowego rozpoczynającym się od tryptofanu (Rys. 13).



Rys. 13 Schemat reakcji szlaku kwasu kinurenowego u *S. cerevisiae*. Enzymy biorące udział w szlaku: 1 *ScBna2p* 2,3 -dioksygenaza tryptofanowa, 2 *ScBna7p* formamidaza formylokinureninowa, 3 *ScBna3p* aminotransferaza kinureninowa, 4 *ScBna4p* monooksydaza kinureninowa, 5 *ScBna1p* dioksygenaza kwasu 3- hydroksyantralinowego, 6 *ScBna5p* kinureninaza, 7 *ScBna6p* fosforybosylotransferaza chinolinowa, 8 *ScNpt1p* fosforybosylotransferaza nikotynowa [na podstawie Wogulis i in. 2008]

Usunięcie genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy NAD^+ oraz genu *NPT1* z genomu *S. cerevisiae* jest letalne. Takiego efektu nie obserwuje się jednak dla mutantu $\Delta bna3 \Delta npt1$. Wykazano również, że szybkość wzrostu szczepu z usuniętym białkiem *ScBna3p* na pożywce z dodatkiem kwasu nikotynowego i bez jego obecności jest taka sama. Takie wyniki sugerują obecność innego białka w komórce posiadającego aktywność KAT [Panozzo i in. 2002] (*ScAro9p?*). Powiązanie białka *ScBna3p* z innymi szlakami metabolicznymi potwierdzają też badania dotyczące regulacji szlaku biosyntezy NAD^+ z *S. cerevisiae* [Bedalov i in. 2003].

Przykładem może być tu rola transkrypcyjnego czynnika Sum1p, który uruchamia NAD⁺ zależną deacetylazę Hst1p. Hst1p reguluje biosyntezę NAD⁺. W szczepach *S. cerevisiae* Δ sum1 poziom ekspresji *BNA2* wzrasta 14,1 razy, *BNA4* 11,7 razy, *BNA5* 4,6 razy, *BNA1* 3,9 razy, *BNA6* 1,9 razy natomiast poziom ekspresji *BNA3* pozostaje niezmienny. Odmienne regulacja ekspresji tego enzymu może świadczyć o istnieniu dodatkowej roli tego białka w komórce. Fakt ten mogą potwierdzać wyniki analizy bioinformatycznej szczepów grzybowych, których wzrost jest zależny od obecności kwasu nikotynowego w pożywce. Szczepy te nie posiadają genów kodujących białka uczestniczące w szlaku biosyntezy NAD⁺ jednakże posiadają białko ScBna3p [Li i Bao 2007].



Rys. 14 Podsumowanie danych literaturowych dotyczących wpływu delecji genów kodujących enzymy o aktywności AmAA na organizm gospodarza. [1] Brunke i in. 2010, [2] Miyazaki i in. 2004, [3] Panozzo i in. 2002, [4] Romagnoli i in. 2015, [5] Urrestarazu i in. 1998

3 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1 Materiały

3.1.1 Aparatura

Tab. 2 Wykaz aparatury stosowanej w niniejszej pracy

- 1) Sprzęt będący na wyposażeniu laboratorium Uniwersytetu w Würzburgu.
- 2) Sprzęt będący na wyposażeniu laboratorium Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Aparat do elektroforezy agarozowej DNA Gdańsk DELFIN
Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej DNA Gdańsk BlueStart nr Blue 01C
Aparat do wywoływania filmów CAWOMAT 200 IR ¹
Aparat UV Stratalinker 1800 ¹
Bezilnikowe mieszadło magnetyczne SRSE
Czytnik mikroplitek Victor ³ V PerkinElmer
Dezintegrator ultradźwiękowy BRANSON Sonifer W-250D
Elektroporator MicroPulser Elektroporator BioRad ¹
Filtry do zagęszczania białka Amicon [®] Ultra-4 Centrifugal Filter Units MILIPORE 10 kDa
Inkubator powietrzny z wytrząsaniem Unitron HT INFORS
Kolumna HiTrap Desalting GE Healthcare
Kolumna Resource Q 6 mL Amersham Biosciences
Kolumna Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare
Kolumna Superdex 200 16/600 GL GE Healthcare
Kołyśka laboratoryjna JWElectronic
Kuweta do elektroporacji, Sigma-Aldrich, szczelina 0,2 cm ¹
Łaźnia wodna Waterbath Type 356 Unipan
Mieszadło magnetyczne ATM typ MM5
Mikroskop spektroskopowy z polaryzacją Olympus SZ61 ²
pH-metr Elemetron CP-551
Piec hybrydacyjny Biometra OV2 ¹
Robot do krystalizacji biomolekuł Gryphon Art. Robbins ²
Spektrofotometr ThermoSpectronic Genesis 4001/4
Spektrofotometr UV-Vis PerkinElmer Instruments Lambda 45 6K15
Steryliizator Sp 32 E Wadem
Termoblok DNA Gdańsk Red-Hot 35 digital
Termocykler Eppendorf Mastercycler gradient
Transluminator Vilber Lourmat
Waga analityczna Zakłady Mechaniki Precyzyjnej ZP Gdańsk
Waga Radwag WPS 730/C/2
Wirówka 1 Eppendorf Centrifuge 5415R
Wirówka 2 Sigma 1-15K
Wirówka 3 Sigma 3-18K
Worteks Lab Dancer IKA
Zasilacz DNA Gdańsk Thunder Power supply
Zestaw do kolumnowej średniociśnieniowej chromatografii cieczowej (FPLC) AKTA sprzężony z detektorem UV (λ=254, 280 nm) i kolektorem frakcji

3.1.2 Wzorce masowe (markery wielkości)

Tab. 3 Wykaz wzorców masowych używanych w badaniach

Nazwa	Wielkość prążków	Zastosowanie
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 kDa	Białka (SDS-PAGE)
1 Kb Plus DNA Ladder ThermoFisher Scientific	12 000, 10 000, 11 000, 9 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 650, 1 000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 pz	DNA (elektroforeza agarozowa)
DNA Gdańsk M10kpz #MR18	10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 800, 600, 400, 200	DNA (elektroforeza agarozowa)
The NativeMark Unstained Protein Standard Invitrogen, Life Technologies	1236, 1048, 720, 480, 242, 146, 66, 20 kDa	Białka (Native-PAGE)

Nazwa	Wielkość prążków	Zastosowanie
Sigma Markers for isoelectric focusing IEF-M2	Tyroglobulina 669 kDa, β -amylaza 200 kDa, dehydrogenaza alkoholowa 150 kDa, BSA (albumina wołowa) 66 kDa, anhydraza węglanowa 29 kDa	Białka (filtracja żelowa)

3.1.3 Pożywki i podłoża

Tab. 4 Wykaz pożywek i podłoży wykorzystywanych w badaniach. Przygotowane pożywki jałowiono w autoklawie (120 °C, 30 min, 1,5 atm.)

Nazwa	Skład	Zastosowanie
LA	NaCl 10 g L ⁻¹ , ekstrakt drożdżowy 5 g L ⁻¹ , pepton 10 g L ⁻¹ , agar bakteriologiczny 15 g L ⁻¹	hodowle bakteryjne
LB	NaCl 10 g L ⁻¹ , ekstrakt drożdżowy 5 g L ⁻¹ , pepton 10 g L ⁻¹ , pH 7 ustalone przy użyciu NaOH	hodowle bakteryjne
Pożywka autoindukcyjna	Bufor fosforanowy pH 7,2, trypton 20 g L ⁻¹ , ekstrakt drożdżowy 5 g L ⁻¹ , NaCl 5 g L ⁻¹ , jałowione w autoklawie 60 % v/v glicerolu 10 mL, 10% w/v glukozy 5 mL, 8% w/v laktozy 25 mL, jałowione przez filtr strzykawkowy Argos 0,22 μ m	hodowle bakteryjne
SOC	NaCl 0,5 g L ⁻¹ ekstrakt drożdżowy 5 g L ⁻¹ , trypton 20 g L ⁻¹ , MgSO ₄ 2,44 g L ⁻¹	hodowle bakteryjne

Dodatki do w/w pożywek: ampicylina 100 μ g mL⁻¹, chloramfenikol 50 μ g mL⁻¹, glukoza 1 g L⁻¹, etanol 3 mL L⁻¹.

Nazwa	Skład	Zastosowanie
RPMI-1640	glukoza 18 g L ⁻¹ , RPMI-1640 bez wodorowęglanu sodu, z L-glutaminą 10,4 g L ⁻¹ , MOPS 34,5 g L ⁻¹ , pH 7 ustalone przy użyciu NaOH	hodowle grzybowe
SLAD	glukoza 20 g L ⁻¹ , agar 20 g L ⁻¹ , siarczan amonu 6,4 mg L ⁻¹ , YNB (bez siarczanu amonu i bez aminokwasów) 1,7 g L ⁻¹	hodowle grzybowe, zmiana formy morfologicznej
SPIDER	Nutrient broth 10g L ⁻¹ , D-mannitol 10g L ⁻¹ , K ₂ HPO ₄ 2g L ⁻¹ , agar 13,5 g L ⁻¹ , pH 7,2 ustalone przy użyciu kwasu fosforowego (V)	hodowle grzybowe, zmiana formy morfologicznej
YCB	YCB 23,4 g L ⁻¹ , ekstrakt drożdżowy 2 g L ⁻¹ , pH 4 ustalone przy użyciu HCl	hodowle grzybowe, indukcja promotora <i>MAL2p</i> kasety nokautującej
YEPG	glukoza 20 g L ⁻¹ , pepton 10 g L ⁻¹ , ekstrakt drożdżowy 10 g L ⁻¹ , agar bakteriologiczny (opcjonalnie) 25 g L ⁻¹	hodowle grzybowe
YNB	glukoza 20 g L ⁻¹ , siarczan amonu 5 g L ⁻¹ (opcjonalnie), YNB bez aminokwasów i siarczanu amonu 1,7 g L ⁻¹ , agar bakteriologiczny (opcjonalnie) 25 g L ⁻¹ , 100 mM bufor fosforanowy pH 5,8	hodowle grzybowe

Dodatki do w/w pożywek: nourseotrycyna 100-200 μ g mL⁻¹, aminokwasy 10 mM, FBS 100 mL L⁻¹, BSA 10 g L⁻¹, kongo red 5 mg L⁻¹, kalkofluor biały mg L⁻¹, SDS 20 mg L⁻¹.

3.1.4 Szczepy bakteryjne i grzybowe

Tab. 5 Wykaz szczepów bakteryjnych i grzybowych wykorzystywanych w badaniach

Nazwa	Genotyp	Źródło	Zastosowanie
<i>Candida albicans</i> SC5314	Szczep typu dzikiego	Katedra Technologii Leków i Biochemii/ Uniwersytet w Würzburgu	Wzorcowy szczep <i>C. albicans</i>
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Uniwersytet w Würzburgu	Szczep wykorzystywany do namnożenia plazmidu zawierającego kasetę nokautującą
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	<i>F mcrAmrrhsdRMS endAmcrBC Φ80lacΔM15 recA Tet^R</i>	Katedra Technologii Leków i Biochemii	Szczep wykorzystywany do namnożenia plazmidu

Nazwa	Genotyp	Źródło	Zastosowanie
			ekspresyjnego, sprawdzenia poprawności klonowania
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	<i>endA1 hsdR17</i> (r_{K12}^- m_{K12}^+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyr A96 rel A1 lac F'</i> [pro A ⁺ B ⁺ <i>lacI</i> ^q ΔM15::Tn10 (tet ^R)](DE3) pLysS RARE (Cm ^R)	Katedra Technologii Leków i Biochemii	Szczepy ekspresyjne, nadekspresja rekombinantowego genu w systemie Tabora-Studiera
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3) pLacI	<i>F' ompT hsdS_B</i> (r_B^- m_B^-) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3) pLacI RARE (Cm ^R)	Katedra Technologii Leków i Biochemii	
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	<i>F' ompT hsdS_B</i> (r_B^- m_B^-) <i>gal, dcm, lacZY</i> (DE3) pLysS CamR	Katedra Technologii Leków i Biochemii	
<i>Escherichia coli</i> BL21 Star (DE3)	<i>F', ompT hsdS_B</i> (r_B^- m_B^-) <i>gal dcmrne131</i> (DE3)	Firma Invitrogen	
<i>Escherichia coli</i> Origami 2 (DE3) pLysS	Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'</i> [<i>lac⁺ lacI^f pro</i>] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> pLysS (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu	

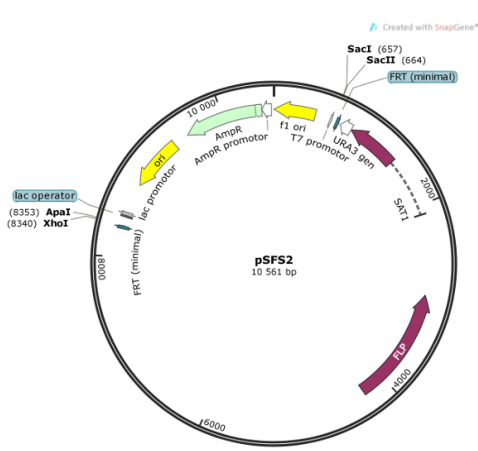
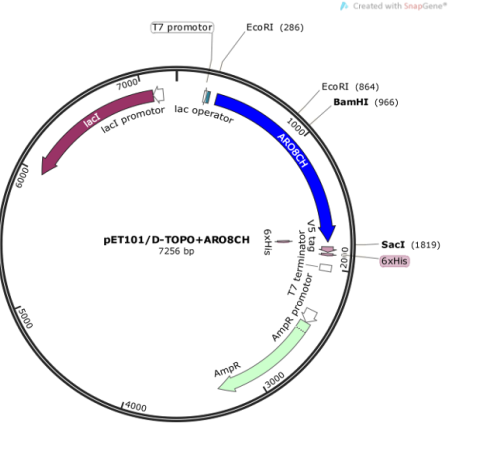
* Joachim Morschhäuser, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Niemcy

3.1.5 DNA

Plazmidy

Tab. 6 Plazmidy stosowane/skonstruowane podczas badań

Nazwa	Opis	Mapa
pET101/D-TOPO [®]	<p>T7 promotor ø10 faga T7, T7 terminator miejsce terminacji transkrypcji polimerazy RNA faga T7, lac operator operonu laktozowego, epitop V5tag sekwencja C-terminalnego końca białek P i V małpiego wirusa 5, 6xHis sekwencja domeny fuzyjnej HisTag, AmpR sekwencja niosąca oporność na ampicylinę, ori miejsce ori replikacji, rop fragment kodujący białko rop biorące udział w replikacji, lacI gen kodujący białko represorowe operonu laktozowego.</p> <p>Plazmid stosowany do konstrukcji plazmidów ekspresyjnych wykorzystywanych w pracy.</p> <p>Źródło: Katedra Technologii Leków i Biochemii, firma Invitrogen</p>	

Nazwa	Opis	Mapa
<p>pSFS2 [Sasse i in. 2011]</p>	<p>ori miejsce ori replikacji, AmpR gen oporności na ampicylinę T7 promotor ϕ10 faga T7, sekwencja FRT miejsce rozpoznania dla rekombinazy FLP, SAT1 gen oporności na nourseotrycynę, FLP gen kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP (będący pod kontrolą promotora <i>MAL2p</i>), lac operator operonu laktozowego.</p> <p>Plazmid stosowany do usuwania genów <i>C. albicans</i> techniką SAT1-flipper.</p> <p>Źródło: Uniwersytet w Würzburgu*</p>	 <p>The map shows a circular plasmid with the following features: ori (10,000 bp), AmpR (Ampicillin resistance gene), AmpR promoter, T7 promoter, F1 ori, URA3 gene, FRT (minimal) sites, SAT1 (Nourseotricin resistance gene), FLP (Flippase gene), and lac operator. Restriction sites for SacI (657), SacII (664), FRT (minimal), XhoI (8340), and ApaI (8353) are also indicated.</p>
<p>pET101/D-TOPO + <i>ARO8CH</i> (przykładowa mapa plazmidu ekspresyjnego)</p>	<p>ARO8CH gen kodujący białko CaAro8p z domeną fuzyjną HisTag z <i>C. albicans</i>.</p> <p>Pozostałe plazmidy ekspresyjne skonstruowane analogicznie, w miejscu genu <i>ARO8CH</i> znajdują się geny:</p> <p>ARO8 gen kodujący białko CaAro8p; wielkość plazmidu 7238 pz,</p> <p>YER152C gen kodujący białko CaYer152Cp; wielkość plazmidu 7010 pz,</p> <p>YER152CH gen kodujący białko CaYer152Cp z domeną fuzyjną HisTag; wielkość plazmidu 7028 pz,</p> <p>BNA3 gen kodujący białko CaBna3p; wielkość plazmidu 7134 pz,</p> <p>BNA3CH gen kodujący białko CaBna3p z domeną fuzyjną HisTag; wielkość plazmidu 7152 pz,</p> <p>ARO9 gen kodujący białko CaAro9p; wielkość plazmidu 7334 pz,</p> <p>ARO9CH gen kodujący białko CaAro9p z domeną fuzyjną HisTag; wielkość plazmidu 7352 pz.</p> <p>Źródło: plazmidy z genami <i>ARO8</i> i <i>ARO8CH</i> skonstruowane przez mgr inż. Katarzynę Drózd, pozostałe - konstrukcja własna</p>	 <p>The map shows a circular plasmid with the following features: T7 promoter, EcoRI (286), lac, lacI promoter, lac operator, ARO8CH (7,256 bp), BamHI (966), EcoRI (864), SacI (1819), 5xHis, AmpR, AmpR promoter, T7 terminator, and ori. Restriction sites for XhoI (8340) and ApaI (8353) are also indicated.</p>

Nazwa	Opis	Mapa
pARO8M1 (przykładowa mapa plazmidu zawierający kasetę nokautującą)	<p>upARO8 sekwencja przed genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (ang. <i>upstream</i>)</p> <p>dARO8 sekwencja za genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (ang. <i>downstream</i>)</p> <p>Plazmid zawierający kasetę usuwającą gen <i>ARO8</i>.</p> <p>Pozostałe plazmidy zawierające kasety nokautujące skonstruowane analogicznie, w miejscu upARO8 i dARO8 znajdują się fragmenty:</p> <p>upYER152C, dYER152C</p> <p>upARO9, dARO9</p> <p>upBNA31, dBNA31</p> <p>upBNA32, dBNA32</p> <p>Źródło: konstrukcja własna</p>	
pARO8K1 (przykładowa mapa plazmidu do komplementacji)	<p>up-ARO8-d sekwencja genu <i>ARO8</i> z <i>C. albicans</i> wraz z sekwencjami flankującymi (ang. <i>upstream, downstream</i>),</p> <p>dARO8 sekwencja za genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (ang. <i>downstream</i>).</p> <p>Plazmid do komplementacji usuniętego genu <i>ARO8</i>.</p> <p>Pozostałe plazmidy do komplementacji skonstruowane analogicznie, w miejscu up-ARO8-d i dARO8 znajdują się fragmenty:</p> <p>up-YER152C-d, dYER152C</p> <p>up-ARO9-d, dARO9</p> <p>up-BNA31-d, dBNA31</p> <p>up-BNA32-d, dBNA32</p> <p>Źródło: konstrukcja własna</p>	

* Joachim Morschhäuser, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Niemcy

Oligonukleotydy

Tab. 7 Oligonukleotydy stosowane w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie
Startery wykorzystywane do amplifikacji genu *YER152C* (klonowanie do plazmidu pET101/D-TOPO)

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
YER152C_f	28 pz	<p>5'CACCATGAATAACTTCTTCAAGGCCACC 3'</p> <p>Starter lewy,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 5' genu <i>YER152C C. albicans</i> (pozycja od +4 do +25), ■ sekwencja umożliwiająca kierunkowe klonowanie do plazmidu pET101/D-TOPO, ■ kodon start.
YER152C_r	31 pz	<p>5'TAAGTATTCCTAAAAGTTCTCCCAAATCTTG3'</p> <p>Starter prawy,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' genu <i>YER152C C. albicans</i> (pozycja od +1221 do +1245),

		<ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' flankujących gen <i>YER152C</i>, ■ kodon stop.
YER152CH_r	43 pz	<p>5'CTAATGATGATGATGATGATGTTCTAAAAGTTCTCCCCAAATC3' Starter prawy wprowadzający domenę HisTag na C końcu białka CaYer152CHp,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' genu <i>YER152C C. albicans</i> (pozycja od +1219 do +1245), ■ sekwencja kodująca domenę fuzyjną HisTag, ■ kodon stop.

Startery wykorzystywane do amplifikacji genu *ARO9* (klonowanie do plazmidu pET101/D-TOPO).

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
ARO9_f	34 pz	<p>5'CACCATGCTCTGATCCTACTCATTTAATTTCTAAG3' Starter lewy,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 5' genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +4 do +27), ■ sekwencja umożliwiająca kierunkowe klonowanie do plazmidu pET101/D-TOPO, ■ kodon start.
ARO9_r	34 pz	<p>5'CTTAGGCTAGCTTTTAAACTCTAACCATTAC3' Starter prawy,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +1553 do +1569), ■ część komplementarna do sekwencji 3' flankujących gen <i>ARO9</i>, ■ kodon stop.
ARO9CH_r	37 pz	<p>5'CTTTTAAATGATGATGATGATGATGAAACTCTAACCC3' Starter prawy wprowadzający domenę HisTag na C końcu białka CaAro9CHp,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +1558 do +1569), ■ sekwencja kodująca domenę fuzyjną HisTag, ■ część komplementarna do sekwencji 3' flankujących gen <i>ARO9</i>, ■ kodon stop.

Startery wykorzystywane do amplifikacji genu *BNA3* (klonowanie do plazmidu pET101/D-TOPO).

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
BNA3_f	29 pz	<p>5'CACCATGTTAAGACGGCTCTTTCCAATAC3' Starter lewy,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 5' genu <i>BNA3 C. albicans</i> (pozycja od +4 do +26), ■ sekwencja umożliwiająca kierunkowe klonowanie do plazmidu pET101/D-TOPO, ■ kodon start.
BNA3_r	31 pz	<p>5'CTCTGACAACGGTCCGGTTTATAAATAATC3' Starter prawy,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' genu <i>BNA3 C. albicans</i> (pozycja od +1350 do +1358), ■ część komplementarna do sekwencji 3' flankujących gen <i>BNA3</i> (pozycja od +1362 do +1380), ■ kodon stop.
BNA3CH_r3	52 pz	<p>5'GTTTAAATGTGATGATGATGATGTAATAATCTTTTAAATTTT CAATCTC3' Starter prawy wprowadzający domenę HisTag na C końcu białka CaBna3CHp,</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji 3' genu <i>BNA3 C. albicans</i> (pozycja od +1332 do +1358), ■ sekwencja kodująca domenę fuzyjną HisTag, ■ część komplementarna do sekwencji 3' flankujących gen <i>BNA3</i>, ■ kodon stop.

Startery wykorzystywane do mutagenyzy ukierunkowanej zaprojektowanych plazmidów ekspresyjnych.

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
ARO9_mutf1	33 pz	<p>5'P – GTCCATTTTTAAGATTTTGGGATAATGCTGGTG3' Starter lewy, do mutagenyzy ukierunkowanej, ufosforylowany N' koniec</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ część komplementarna do sekwencji genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +575 do +608), ■ miejsce wprowadzenia mutacji.

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
ARO9_mutr1	37 pz	5'P - TAAATGTA AATTCCTCAACTAAGATAACATCACCATC3' Starter prawy, do mutagenazy ukierunkowanej, ufosforylowany N' koniec, ■ część komplementarna do sekwencji genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +538 do +574).
ARO9_mutf2	32 pz	5'P - GTTAATCGAGGTGCTT CGGGTTTAACACAAAC3' Starter lewy, do mutagenazy ukierunkowanej, ufosforylowany N' koniec ■ część komplementarna do sekwencji genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +1105 do +1138), ■ miejsce wprowadzenia mutacji.
ARO9_mutr2	33 pz	5'P – AACGTCACTATAATTC TAACTGCGTCAATGAC3' Starter prawy, do mutagenazy ukierunkowanej, ufosforylowany N' koniec, ■ część komplementarna do sekwencji genu <i>ARO9 C. albicans</i> (pozycja od +1072 do +1104).
BNA3_mutf	32 pz	5'P - TGTTGGTGA ACTTGT CGAAAGTTA AGATACCC3' Starter lewy, do mutagenazy ukierunkowanej, ufosforylowany N' koniec ■ część komplementarna do sekwencji genu <i>BNA3C. albicans</i> (pozycja od +1097 do +1129), ■ miejsce wprowadzenia mutacji.
BNA3_mutr	26 pz	5'P - CAAAGTATCCTCCTTC GGCAACGGTG3' Starter prawy, do mutagenazy ukierunkowanej, ufosforylowany N' koniec, ■ część komplementarna do sekwencji genu <i>BNA3 C. albicans</i> (pozycja od +1071 do +1096).

Startery wykorzystywane do amplifikacji fragmentu DNA stosowanego do usuwania genów z genomu *C. albicans* oraz do weryfikacji poprawności konstrukcji mutantów.

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
ARO8.01	33 pz	5' TTTGAGCTC CACTTAAAACTGATAAGAAA3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji poprzedzającej gen <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -451 do -418), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream ARO8</i> .
ARO8.02	28 pz	5' GTATCCGCGG T ATTATGGCAGTAGAAA 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach 5' genu <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -14 do +14), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacII</i> , ■ kodon start. Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream ARO8</i> .
ARO8.03	29 pz	5' GTA ACTCGAGCTT GTGTGTGTCAACAAGT 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach końca 3' <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1473 do +1502), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>XhoI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream ARO8</i> .
ARO8.04	28 pz	5' CAAAGGGCCCGT CGTAAAGATTTATCTG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się za genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1924 do +1952), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>Apal</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream ARO8</i> .
ARO8.05	29 pz	5' TGGACCGCGG AAAGATTTATCTGGTAATG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji za genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1928 do +1957), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacII</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji genu <i>ARO8</i> wraz z sekwencjami <i>upstream</i> i <i>downstream</i> .
ARO9.01	32 pz	5' TAAAGAGCTC ACCTATTTAGATGATGATGATG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji poprzedzającej gen <i>ARO9</i>

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
		w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -509 do -477), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream ARO9</i> .
ARO9.02	30 pz	5' ATATCCGCGGTGTAACAAAGTTTCCTAAGT 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach 5' genu <i>ARO9</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -28 do +2), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream ARO9</i> .
ARO9.03	26 pz	5' TGGGCTCGAGTTTTAAAAAGCTAGCC 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach końca 3' <i>ARO9</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1557 do +1583), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>XhoI</i> , ■ kodon stop. Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream ARO9</i> .
ARO9.07	30 pz	5' CTTATTGAATTCAGTAGGGCCCTTATCACC 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się za genem <i>ARO9</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +2065 do +2095), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>Apal</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream ARO9</i> .
ARO9.11	31 pz	5' AATGGAGCTCTTTAATGAATCTCGTGAAGT 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji przed genem <i>ARO9</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -572 do -541), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji genu <i>ARO9</i> wraz z sekwencjami <i>upstream</i> i <i>downstream</i> .
ARO9.09	30 pz	5' GTAACCGCGGAGAAATTGAATGACATTGGA 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji za genem <i>ARO9</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +2016 do +2046), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji genu <i>ARO9</i> wraz z sekwencjami <i>upstream</i> i <i>downstream</i> .
YER.01	30 pz	5' AATGGAGCTCTTTTATATGGATGTTGTTTT 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji poprzedzającej gen <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -481 do -451), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream YER152C</i> .
YER.02	27 pz	5' TTTACCGCGGAGTAAAAAGTTCATTTTC 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach 5' genu <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -19 do +8), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream YER152C</i> .
YER.03	30 pz	5' ACTTCTCGAGTAGTTAGTAAACAGTTTTTA 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach końca 3' <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1236 do +1266), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>XhoI</i> , ■ kodon stop. Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream YER152C</i> .
YER.04	28 pz	5' AATAGGGCCCCAAAAATATATGATATGG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się za genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja +1607 do +1616), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
		enzym <i>Apal</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream</i> <i>YER152C</i> .
YER.05	28 pz	5' AATACCGCGGC AAAAATATATGATATGG3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji za genem <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1607 do +1616), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter wykorzystywany do amplifikacji sekwencji genu <i>YER152C</i> wraz z sekwencjami <i>upstream</i> i <i>downstream</i> .
BNA31.01	29 pz	5' CCTTGAGCTCTGGAAGAAGGTTGTAATTC 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji poprzedzającej gen <i>ARO8</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -459 do -430), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream</i> <i>BNA31</i> .
BNA31.02	31 pz	5' GGAAACCGCGGTC TTAACATAAAAGTGTAAAG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach 5' genu <i>BNA31</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -11 do +20), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream</i> <i>BNA31</i> .
BNA31.03	30 pz	5' TAAAACTCGAGCGTTGTCAGAGTAGTCG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach końca 3' <i>BNA31</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1360 do +1388), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>XhoI</i> , ■ kodon stop. Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream</i> <i>BNA31</i> .
BNA31.04	28 pz	5' CTAGGGCCCGAGTTTTAGTACAAATACC 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się za genem <i>BNA31</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1813 do +1841), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>Apal</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream</i> <i>BNA31</i> .
BNA31.05	28 pz	5' CTACCGCGGGAGTTTTAGTACAAATACC 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji za genem <i>BNA31</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1813 do +1841), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter wykorzystywany do amplifikacji sekwencji genu <i>BNA31</i> wraz z sekwencjami <i>upstream</i> i <i>downstream</i> .
BNA32.01	28 pz	5' AATTCCGCGGATGATGGTGAGTTGAAGA 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach 5' genu <i>BNA32</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od -462 do -434), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>upstream</i> <i>BNA32</i> .
BNA32.03	27 pz	5' GTTGTCAGAGTAGTCGCTCGAGCATAT 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się w okolicach końca 3' <i>BNA32</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1372 do +1399), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>XhoI</i> , ■ kodon stop. Starter lewy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream</i> <i>BNA32</i> .
BNA32.04	32 pz	5' TTACATGGGCCATTGAAATAACCAACTCTG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się za genem <i>BNA32</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1839 do +1871), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>Apal</i> . Starter prawy wykorzystywany do amplifikacji sekwencji <i>downstream</i> <i>BNA32</i> .

Nazwa	Wielkość	Sekwencja
BNA32.05	28 pz	5' TTACATCCGCGGATTGAAATAAACCAACTCTG 3' ■ sekwencje komplementarne do sekwencji znajdującej się za genem <i>BNA32</i> w genomie <i>C. albicans</i> (pozycja od +1839 do +1871), ■ sekwencja wprowadzająca miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym <i>SacI</i> . Starter wykorzystywany do amplifikacji sekwencji genu <i>BNA32</i> wraz z sekwencjami <i>upstream</i> i <i>downstream</i> .

3.1.6 Enzymy restrykcyjne

Tab. 8 Enzymy restrykcyjne stosowane podczas badań

Nazwa	Pochodzenie	Miejsce cięcia
<i>Apal</i>	New England BioLabs	5'...G GGCC [^] C...3' 3'...C [^] CCGG G...5'
<i>BamHI</i>	Fermentas	5'...G [^] GATC C...3' 3'...C CTAG [^] G...5'
<i>DpnI</i>	Fermentas	5'...GA(-CH ₃) [^] T C...3' 3'...CT [^] A(-CH ₃)G...5'
<i>EcoRI</i>	Fermentas	5'...G [^] AATT C...3' 3'...C TTAA [^] G...5'
<i>HindIII</i>	New England BioLabs	5'...A [^] AGCT T...3' 3'...T TCGA [^] A...5'
<i>MlyI</i>	New England BioLabs	5'...GAGTC(N) ₅ [^] ...3' 3'...CTCAG(N) ₅ [^] ...5'
<i>NdeI</i>	New England BioLabs	5'...CA [^] TA TG...3' 3'...GT AT [^] AC...5'
<i>PvuI</i>	New England BioLabs	5'...CG AT [^] CG...3' 3'...GC [^] TA GC...5'
<i>SacI</i>	New England BioLabs	5'...G AGCT [^] C...3' 3'...C [^] TCGA G...5'
<i>SacII</i>	New England BioLabs	5'...CC GC [^] GG...3' 3'...GG [^] CG CC...5'
<i>StyI</i>	New England BioLabs	5'...C [^] CWWG C...3' 3'...G GWWC [^] C...5'
<i>XhoI</i>	New England BioLabs	5'...C [^] TCGA G...3' 3'...G AGCT [^] C...5'

3.1.7 Oprogramowanie

Tab. 9 Oprogramowanie stosowane podczas badań

Clustal Omega	[Sievers i in. 2011]
ESPrIt	[Robert i Gouet 2014]
GelAnalyzer	2010a
GraphPad Prism	Wersja 5
InterPro Scan	[Jones i in. 2014]
MitoProt II	[Claros i Vincens 1996]
NCBI BLAST alignment	[Altschul i in. 1990]
Phylogeny.fr	[Dereeper i in. 2008; Dereeper i in. 2010]
ProtParam	[Artimo i in. 2012]
SnapGene Viewer	Wersja 2.0
ToolLab Quant	Wersja 11.5
Translate	[Artimo i in. 2012]
Vector NTI	Wersja 3.1 1994, 1995 informax, inc
XtalPred	[Slabinski i in. 2007a]

3.2 Metody

3.2.1 Warunki hodowli drobnoustrojów

a) hodowla bakteryjna

Hodowle bakteryjne prowadzono na podłożu płynnym LB (Roz. 3.1.3) w inkubatorze powietrznym z wytrząsaniem 180 obr. min⁻¹ przez 18 h w 30-37°C. Hodowle na podłożu stałym

LA (Roz. 3.1.3) prowadzono przez 24 h w 37°C. W zależności od hodowanego szczepu bakteryjnego do pożywki dodawano odpowiednie antybiotyki i związki.

b) hodowla grzybowa

Hodowle grzybowe prowadzono na podłożu stałym bądź płynnym (Roz. 3.1.3). Hodowle na podłożu płynnym prowadzono w inkubatorze powietrznym z wytrząsaniem 180 obr. min⁻¹ przez 16 h w 30°C, hodowle na podłożu stałym inkubowano przez 48 h w 30°C. W miarę potrzeby do pożywki dodawano odpowiedni antybiotyk lub inne związki.

3.2.2 Przygotowanie komórek kompetentnych

Do 150 mL podłoża LB z odpowiednim antybiotykiem (Roz. 3.1.3) dodawano 6 mL osiemnastogodzinnej odpowiedniej hodowli bakteryjnej. Zawiesinę bakteryjną inkubowano w inkubatorze powietrznym z wytrząsaniem 180 obr. min⁻¹ w 37°C do uzyskania gęstości optycznej zawiesiny komórek OD₆₀₀ ok. 0,4. Następnie hodowlę inkubowano 30 min w lodzie i odwirowywano przez 10 min przy 4000 obr. min⁻¹ w 4°C. Powstały osad zawieszano w 25 mL schłodzonego, sterylnego buforu K i ponownie inkubowano przez 30 min w lodzie. Zawiesinę komórek odwirowywano przez 10 min przy 4000 obr. min⁻¹ w 4°C i zawieszano w 5 mL buforu. Tak przygotowane komórki kompetentne używano do transformacji lub porcjowano po 100 µL i przechowywano przez 2 miesiące w -80°C.

Odczynniki: Bufor K: CaCl₂ 60 mM, PIPES 10 mM, glicerol 15%.

3.2.3 Transformacja do komórek kompetentnych E. coli

Do 100 µL komórek kompetentnych dodawano 1 µL odpowiedniego plazmidu lub 10 µL mieszaniny ligacyjnej. Tak przygotowaną mieszaninę pozostawiano w lodzie na 30 min (plazmid) – 2 h (mieszanina ligacyjna). Po upływie danego czasu probówkę z mieszaniną do transformacji umieszczano na 1,5 min w 42°C, następnie inkubowano 2 min w lodzie. Dodawano 0,5 mL LB (Roz. 3.1.3). Następnie w przypadku mieszaniny ligacyjnej, próbę inkubowano 1 h 37°C. W kolejnym kroku, niezależnie od transformowanego materiału genetycznego, pobierano 100 µL mieszaniny i wykonywano posiew na podłożu stałe LA z odpowiednim antybiotykiem (Roz. 3.1.3). Przygotowane płytki umieszczano w cieplarni 37°C na 24 h. Płytki z transformantami przechowywano w 4°C.

3.2.4 Oczyszczanie DNA

a) izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA wykonywano przy pomocy zestawu GenElute™ Plasmid Miniprep Kit firmy Sigma-Aldrich. Elucję DNA plazmidowego przeprowadzano przy pomocy 50 µL wody destylowanej. Wyizolowane DNA przechowywano w -20°C.

b) izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego (gel-out)

Przygotowywano 1% żel agarozowy. Przeprowadzano rozdział elektroforetyczny (Roz. 3.2.5) prób DNA przy napięciu 6 V cm⁻¹ długości żelu przez 60 min. Następnie wycinano część żelu zawierającą określony fragment DNA. Oczyszczanie DNA z żelu agarozowego przeprowadzano z użyciem zestawu GenElute™ Gel Extraction Kit firmy Sigma-Aldrich. Elucję

DNA plazmidowego przeprowadzano przy pomocy 30 μL wody destylowanej. Oczyszczoną próbę DNA przechowywano w -20°C .

c) izolacja genomowego DNA z komórek grzybowych

Z wykorzystaniem gotowego zestawu:

Genematrix bacterial & yeast genomic DNA purification kit firmy EURX. Wyizolowane DNA przechowywano w -20°C .

Z wykorzystaniem metody ekstrakcji organicznej:

Odwirowywano 1,5 mL hodowli nocnej *C. albicans* przy 5000 x g przez 5 min, wylewano supernatant. Zawieszano komórki w 200 μL buforu T. Dodawano 200 μL szklanych kulek (0,25-0,5 mm) oraz 200 μL mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1). Intensywnie mieszano przez 10 min. Dodawano 200 μL buforu 1xTE pH 8 i ponownie mieszano. Odwirowywano przy 14 000 x g przez 5 min. Supernatant przenoszono do nowej probówki Eppendorf. Dodawano 200 μL mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1) i mieszano 1 min. Odwirowywano przy 14 000 x g przez 5 min. Przenoszono górną warstwę (faza wodna) do nowej probówki Eppendorf. Dodawano jedną objętość zimnego izopropanolu. Mieszano i inkubowano 30 min w -20°C . Odwirowywano przez 5 min przy 14 000 x g. Osad przemywano 500 μL zimnego 70% etanolu. Następnie odwirowywano etanol przez 5 min przy 14 000 x g. Uzyskany osad suszono przez 15 min w wirówce próżniowej. Rozpuszczano DNA w 50 μL wody MQ. DNA przechowywano w -20°C . Tak izolowane DNA wykorzystywano do procedury Southern Blotting.

Odczynniki: Bufor T: 0,04% (v/v) TritonX-100, 0,1% (v/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8; 1xTE: 1 mM Tris, 0,01 mM EDTA pH 8,0.

3.2.5 Elektroforeza agarozowa

Próbki DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1-1,5% żelu agarozowym, w buforze do elektroforezy 1xTAE, przy napięciu 10 V cm^{-1} długości żelu, przez 30-60 min. Wyniki obserwowano przy pomocy lampy UV transluminatora ($\lambda = 312 \text{ nm}$).

Odczynniki: 1% Żel agarozowy: agaroz 0,5 g, TAE x1 50 mL, bromek etydyny lub Midori Green DNA Stain firmy Abo 4 μL ; Bufor TAE x 50: Tris 0,5 M, EDTA 0,5 M, lodowaty kwas octowy do uzyskania pH 7,5, woda destylowana 500 mL.

3.2.6 Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE

Próby białkowe rozdzielano elektroforetycznie w warunkach denaturujących według metody Laemmli [Laemmli 1970] w 5% żelu zagęszczającym i 15% żelu rozdzielającym. Elektroforezę przeprowadzano przy napięciu 20 V cm^{-1} długości żelu, przez 60 min, w buforze Tris-glicynowym (pH 8,3). Żel umieszczano w buforze barwiącym i pozostawiano na 15 min na kołyszce laboratoryjnej. Żel barwiono błękitem kumazyny. Usuwno bufor barwiący i umieszczano w buforze odbarwiającym na 4- 8 h.

Odczynniki: Do przygotowania żelu poliakrylamidowego: Bufor A: akrylamid 26,2 g, bisakrylamid 0,8 g, woda destylowana 100 mL; Bufor B: pH 8,8 Tris-HCl 2M 75 mL, 10% SDS 4 mL, woda destylowana 21 mL; Bufor C pH 6,8 Tris HCl 1M 50 mL, 10% SDS 4 mL, woda destylowana 46 mL; do przygotowania próby białkowej: Bufor lizujący: pH 6,8 Tris HCl 1M 1,2 mL, glicerol 50% 10 mL, SDS 10% 4 mL, β -merkaptioetanol 1 mL, niebieski bromofenol 1% 2 mL, woda destylowana 1,8 mL; do barwienia i odbarwiania żelu: Bufor barwiący: metanol 112,5 mL, lodowaty kwas octowy 25 mL, woda destylowana 112,5 mL, Comassie Blue R-2500 25 g, Bufor odbarwiający: metanol 20 mL, woda destylowana 160 mL,

Iodowaty kwas octowy 20 mL; do przeprowadzenia elektroforezy: Bufor do elektroforezy SDS- PAGE: pH 8,3 Tris 3 g, glicyna 14,4 g, SDS 1 g, woda destylowana 1 L.

3.2.7 Analiza restrykcyjna DNA

Reakcje trawienia endonukleazami restrykcyjnymi prowadzono w buforze optymalnym dla działania enzymu (lub dobierano optymalne warunki w przypadku trawienia dwoma endonukleazami), przez 15-30 min dla plazmidowego DNA i 18 h dla genomowego DNA w 37°C. Skład mieszaniny reakcyjnej:

Tab. 10 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia DNA. Czas trwania reakcji zależny od zastosowanego DNA

Bufor	2 μ L
Enzym restrykcyjny	0,5 μ L
DNA	10 μ L
Woda jałowa	7,5 μ L
Razem	20 μ L

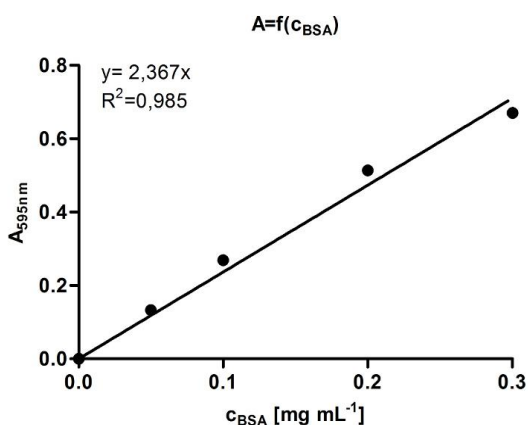
Następnie przeprowadzano rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów (Roz. 3.2.5). Wyniki obserwowano w świetle lampy UV na translaminatorze.

Odczynniki: Enzymy restrykcyjne (Roz. 3.1.6), bufony: FastDigest Green Buffer ThermoScientific, CutSmart New England BioLabs.

3.2.8 Oznaczenie stężenia białka metodą Bradford

Do 100 μ L badanej próby białkowej dodawano 1 mL odczynnika Bradford. Po upływie 5 min mierzono absorpcję roztworu przy 595 nm [Bradford 1976]. Sporządzano krzywą kalibracyjną (Rys. 15) dla wzorcowego białka albuminy wołowej, BSA (0-300 μ g mL⁻¹).

W celu sprawdzenia stężenia białka w badanej próbce mierzono absorpcję roztworu białka z odczynnikiem Bradford i porównywano wynik do uzyskanych wartości krzywej kalibracyjnej. Pomiary wykonywano co najmniej trzykrotnie a uzyskane wyniki uśredniano.



Rys. 15 Krzywa wzorcowa $A_{595} = f(C_{BSA})$ dla albuminy wołowej, BSA

Odczynniki: Odczynnik Bradford firmy Sigma-Aldrich.

3.2.9 Analiza bioinformatyczna

Korzystając z sekwencji nukleotydowej (pozyskanej z Candida Genome Database <http://www.candidagenome.org/> [Skrzypek i in. 2011]) badanego genu, przy pomocy odpowiednich programów, określano i analizowano sekwencję aminokwasową badanego białka.

Posługiwano się następującymi programami udostępnionymi na stronie www.expasy.org/tools:

Tab. 11 Wykaz programów służących do analizy sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej badanych genów/białek

Program	Zastosowanie
InterPro Scan	Poszukiwanie charakterystycznych domen
ProtParam	Analiza struktury pierwszorzędowej
T-Coffee (MyHits)	Porównywanie sekwencji (ang. <i>multiple sequence alignment</i>)
Translate	Określanie struktury pierwszorzędowej

3.2.10 Amplifikacja badanych genów

W celu amplifikacji badanych genów projektowano startery z wykorzystaniem znanej sekwencji z Candida Genome Database <http://www.candidagenome.org/> [Skrzypek i in. 2011]. Do sekwencji starterów wprowadzono fragment CACC umożliwiający kierunkowe klonowanie do wektora pET101/D-TOPO[®] oraz, w przypadku białek zawierających domenę hekshaHis, fragment kodujący ogon polihistydynowy. Amplifikacja przebiegała według następującej procedury:

Tab. 12 Skład mieszaniny do amplifikacji badanych genów. Wykaz starterów stosowanych w amplifikacji

Woda jałowa miliQ	6,36 μ L	Gen	Startery do amplifikacji
DNA <i>Candida albicans</i> SC5314	0,4 μ L	<i>YER152C</i>	<i>YER152C_f</i> , <i>YER152C_r</i>
Starter lewy	0,4 μ L	<i>YER152CH</i>	<i>YER152C_f</i> , <i>YER152CH_r</i>
Starter prawy	0,4 μ L	<i>BNA3</i>	<i>BNA3_f</i> , <i>BNA3CH_r3</i>
dNTP 10 mM	1 μ L	<i>BNA3CH</i>	<i>BNA3_f</i> , <i>BNA3CH_r3</i>
Bufor polimerazy HYPERNOVA 10x	1 μ L	<i>ARO9</i>	<i>ARO9_f</i> , <i>ARO9_r</i>
MgCl ₂ 50 mM	0,34 μ L	<i>ARO9CH</i>	<i>ARO9_f</i> , <i>ARO9CH_r</i>
Polimeraza HYPERNOVA 2 U ml ⁻¹	0,1 μ L		
Razem	10 μ L		

Tab. 13 Profil temperaturowo czasowy reakcji amplifikacji badanych genów

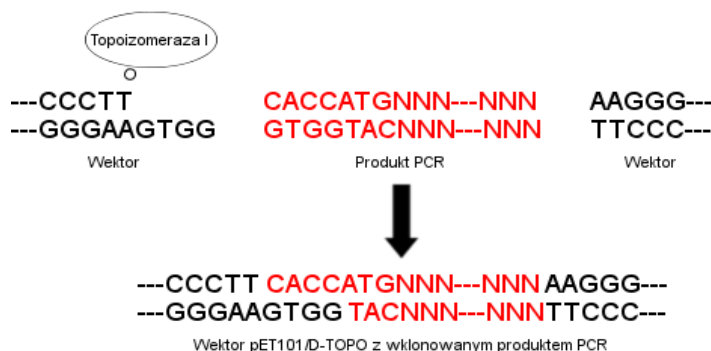
YER152C			YER152CH		
Denaturacja wstępna	94 °C	120 s	Denaturacja wstępna	94 °C	120 s
Denaturacja	94 °C	60 s	Denaturacja	94 °C	60 s
Przyłączenie starterów	58,5 °C	90 s	Przyłączenie starterów	58,5 °C	90 s
Elongacja	72 °C	120 s	Elongacja	72 °C	120 s
Elongacja	72 °C	600 s	Elongacja	72 °C	600 s
Chłodzenie	4 °C	∞	Chłodzenie	4 °C	∞
BNA3			BNA3CH		
Denaturacja wstępna	94 °C	180 s	Denaturacja wstępna	94 °C	120 s
Denaturacja	94 °C	30 s	Denaturacja	94 °C	60 s
Przyłączenie starterów	55 °C	30 s	Przyłączenie starterów	56 °C	90 s
Elongacja	72 °C	120 s	Elongacja	72 °C	120 s
Elongacja	72 °C	600 s	Elongacja	72 °C	600 s
Chłodzenie	4 °C	∞	Chłodzenie	4 °C	∞
ARO9			ARO9CH		
Denaturacja wstępna	94 °C	180 s	Denaturacja wstępna	94 °C	180 s
Denaturacja	94 °C	30 s	Denaturacja	94 °C	30 s
Przyłączenie starterów	55 °C	30 s	Przyłączenie starterów	54 °C	30 s
Elongacja	72 °C	120 s	Elongacja	72 °C	120 s
Elongacja	72 °C	600 s	Elongacja	72 °C	600 s
Chłodzenie	4 °C	∞	Chłodzenie	4 °C	∞

Następnie tak otrzymane próbki poddawano rozdzielni elektroforetycznemu (Roz. 3.2.5) i wykorzystywano do klonowania do wektora pET101/D-TOPO[®].

3.2.11 Wprowadzenie produktu PCR do wektora pET101/D-TOPO[®]

Produkt PCR wprowadzono do plazmidu pET101/D-TOPO[®] według procedury opisanej w zestawie Champion™ pET Directional TOPO[®] Expression Kits. Specjalna budowa wektora umożliwia wydajne i kierunkowe wklonowanie produktu reakcji PCR bez użycia ligazy i bez stosowania dodatkowej procedury oczyszczania gel-out, umożliwia również pominięcie etapu klonowania do plazmidu wysokokopijnego. Dodatkowo pET101/D-TOPO[®] zawiera gen oporności na ampicylinę umożliwiający selekcję rekombinantów, gen wprowadzający sekwencję domeny HisTag ułatwiającą oczyszczanie białka fuzyjnego i jego detekcję za pomocą specyficznych przeciwciał, promotor ϕ 10 faga T7 i inne geny umożliwiające wykorzystanie systemu ekspresyjnego Tabora-Studiera. Plazmid pET101/D-TOPO[®] jest zlinearyzowany, na obu końcach 3' do reszty fosforanowej tymidynomonofosforanu ma dołączoną topoizomerazę I pochodzącą z wirusa ospy krowiej VACV, która umożliwia pominięcie etapu ligacji po klonowaniu. W warunkach fizjologicznych enzym ten nacina oraz ponownie łączy DNA podczas procesu replikacji. Rozpoznaje specyficzną sekwencję 5'- (C/T)CCTT - 3' i tworzy wiązanie kowalencyjne pomiędzy grupami fosforanowymi 3' tymidynomonofosforanu i resztą tyrozyny-274 z topoizomerazy I. Wiązanie to może zostać rozerwane poprzez atak nukleofilowy reszty hydroksylowej 5' drugiej nici DNA, uwalniając topoizomerazę.

Aby kierunkowo wklonować do wektora produkt reakcji PCR zaprojektowano startery do reakcji tak, aby uzyskany produkt zawierał dodatkowo sekwencję CACC na końcu 5', komplementarną do wiszących końców zastosowanego wektora (Rys. 16).



Rys. 16 Schemat klonowania produktu PCR do plazmidu pET101/D-TOPO[®]

W celu wklonowania produktu PCR do wektora pET101/D-TOPO[®] przygotowano mieszaninę do klonowania o następującym składzie:

Tab. 14 Skład mieszaniny reakcyjnej klonowania produktu PCR do plazmidu pET101/D-TOPO[®]

Produkt reakcji PCR	2,5 μ L
Salt Solution	1 μ L
Woda jałowa	1,5 μ L
pet101/D-TOPO [®]	1 μ L
Razem	6 μ L

Tak otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 15 min w 37°C. Uzyskany produkt używano do transformacji do odpowiednich komórek *E. coli* (Roz. 3.1.4) wg procedury opisanej w punkcie (Roz. 3.2.3). Następnie poprawność klonowania analizowano z użyciem enzymów restrykcyjnych i wysyłano do sekwencjonowania do firmy zewnętrznej.

Odczynniki: Roztwór Salt Solution z zestawu Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits, firmy Invitrogen. Procedura oparta na instrukcji do zestawu.

3.2.12 Mutagenеза ukierunkowana plazmidowego DNA

Amplifikowane geny *ARO9* i *BNA3* zawierają kodony, których translacja jest odmienna w komórkach grzybowych i bakteryjnych. Trójka CTG w pozycjach od +1111 do +1113 dla *BNA3* oraz od +592 do +595 i od +1120 do 1122 dla *ARO9* w komórce *E. coli* odczytywana jest jako leucyna natomiast w *C. albicans* jako seryna. W związku z tym, wykorzystując skonstruowane plazmidy pET101/D-TOPO+*ARO9*, pET101/D-TOPO+*ARO9CH*, pET101/D-TOPO+*BNA3*, oraz pET101/D-TOPO+*BNA3CH*, wprowadzano mutacje do amplifikowanych genów zamieniając trójki CTG na TCG kodujące serynę w komórkach *E. coli*. W celu wprowadzenia mutacji do skonstruowanych plazmidów przeprowadzano reakcję PCR z wykorzystaniem specjalnie zaprojektowanych starterów. Startery posiadają dodatkowo ufosforylowane 5' końce umożliwiające przeprowadzenie reakcji ligacji uzyskanych produktów. Przygotowywano mieszaninę reakcji PCR o następującym składzie:

Tab. 15 Skład mieszaniny reakcyjnej do mutagenезы ukierunkowanej

Woda jałowa MilliQ	6,36 µL	Plazmid	Startery do mutagenезы
DNA <i>Candida albicans</i> SC5314	0,4 µL		
Starter lewy	0,4 µL	pET101/D-TOPO+ <i>ARO9</i>	ARO9_mutf1,2, ARO9_mutr1,2
Starter prawy	0,4 µL	pET101/D-TOPO+ <i>ARO9CH</i>	ARO9_mutf1,2, ARO9_mutr1,2
dNTP 10 mm	1 µL	pET101/D-TOPO+ <i>BNA3</i>	BNA3_mutf1, BNA3_mutr1
Bufor polimerazy HYPERNOVA 10x	1 µL	pET101/D-TOPO+ <i>BNA3CH</i>	BNA3_mutf1, BNA3_mutr1
MgCl ₂ 50 mm	0,34 µL		
Polimeraza HYPERNOVA 2 U ml ⁻¹	0,1 µL		
Razem	10 µL		

Profil temperaturowo-czasowy:

Tab. 16 Profil temperaturowo-czasowy reakcji amplifikacji skonstruowanych plazmidów wprowadzającej mutacje punktowe

pET101/D-TOPO+*ARO9*, *ARO9CH* Mutagenеза ukierunkowana 1

Denaturacja wstępna	96 °C	240 s	x 9
Denaturacja	96 °C	120 s	
Przyłączenie starterów	65 °C	90 s	
Elongacja	72 °C	420 s	x 30
Denaturacja	96°C	120 s	
Przyłączenie starterów	57°C	90 s	
Elongacja	72 °C	420 s	
Elongacja	72 °C	600 s	
Chłodzenie	4 °C	∞	

pET101/D-TOPO+*ARO9*, *ARO9CH* Mutagenеза ukierunkowana 2

Denaturacja wstępna	96 °C	240 s	x 9
Denaturacja	96 °C	120 s	
Przyłączenie starterów	60 °C	90 s	
Elongacja	72 °C	420 s	x 30
Denaturacja	96°C	120 s	
Przyłączenie starterów	56°C	90 s	
Elongacja	72 °C	420 s	
Elongacja	72 °C	600 s	
Chłodzenie	4 °C	∞	

pET101/D-TOPO+BNA3, BNA3CH
Mutageniza ukierunkowana

Denaturacja wstępna	96 °C	240 s	
Denaturacja	96 °C	120 s	x 9
Przyłączenie starterów	65 °C	90 s	
Elongacja	72 °C	420 s	
Denaturacja	96°C	120 s	x 30
Przyłączenie starterów	57°C	90 s	
Elongacja	72 °C	420 s	
Elongacja	72 °C	600 s	
Chłodzenie	4 °C	∞	

W wyniku reakcji PCR amplifikowano plazmidy z równoczesnym wprowadzaniem mutacji punktowej. Uzyskane produkty trawiono enzymem restrykcyjnym *DpnI*, przeprowadzając reakcję w 37°C przez 30 min. Umożliwiło to oddzielenie plazmidów z wprowadzoną mutacją (powstałych podczas reakcji PCR) od tych bez mutacji (zmetylowanych, wyizolowanych z komórki *E. coli*, ulegających trawieniu restrykcyjnemu).

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Tab. 17 Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia restrykcyjnego zmetylowanego plazmidu

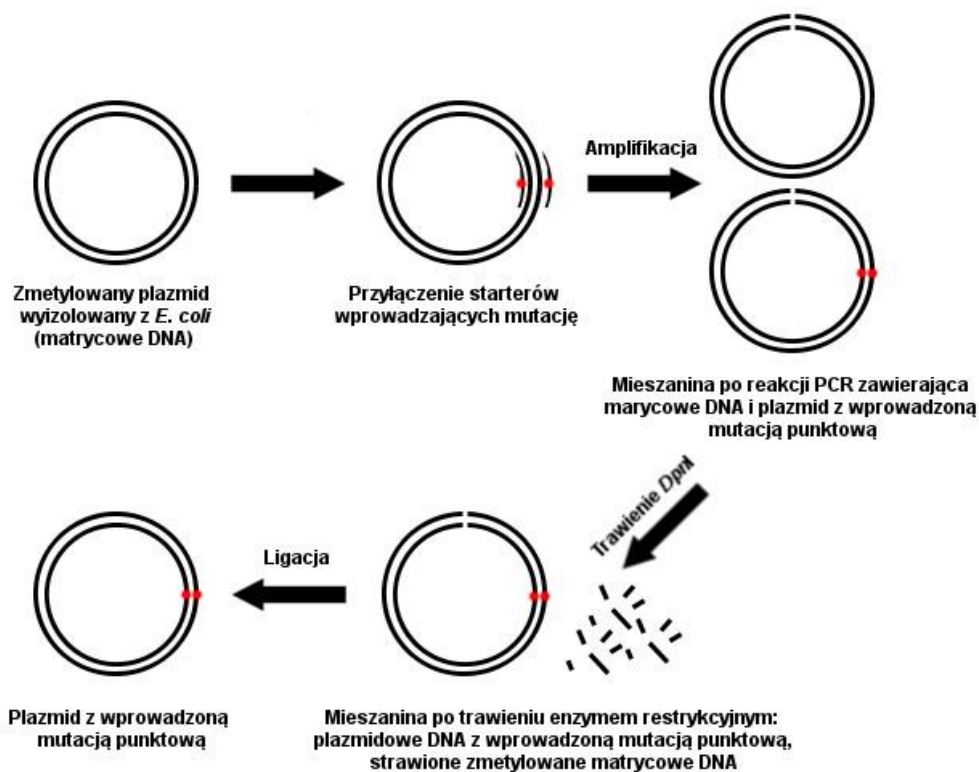
Bufor fast (10x)	5 µL
<i>DpnI</i>	1 µL
Produkt PCR	40 µL
Woda jałowa	4 µL
Razem	50 µL

Następnie przeprowadzano rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów (Roz. 3.2.5), wycinano produkty o odpowiedniej wielkości z żelu agarozowego (niestrawione) i przeprowadzano procedurę gel-out (Roz. 3.2.4). W kolejnym kroku przeprowadzano ligację uzyskanych zmutowanych plazmidów przez 12 h w 16°C:

Tab. 18 Mieszanina ligacyjna. Ligację przeprowadzano przez 12 h w 16°C

Bufor ligazy faga T4 (10x)	2 µL
ATP 10 mM	0,8 µL
DNA	15 µL
Woda jałowa	1,2 µL
DNA ligaza faga T4 5 U µl ⁻¹	1 µL
Razem	20 µL

Następnie uzyskane plazmidy transformowano do komórek *E. coli* TOP10F['] według procedury (Roz. 3.2.3), po czym izolowano z komórek *E. coli* (Roz. 3.2.4) i wysyłano do sekwencjonowania do firmy zewnętrznej. Całą procedurę przeprowadzanej mutagenyzy ukierunkowanej przedstawia Rys. 17.



Rys. 17 Schemat przeprowadzanej mutagenazy ukierunkowanej

Odczynniki: Bufor Fast (10x): FastDigest Green Buffer Thermo Scientific, bufor ligazy faga T4 Thermo Scientific, DNA ligaza faga T4 5 U μL^{-1} Thermo Scientific, ATP 10 mM Thermo Scientific.

3.2.13 Nadprodukcja rekombinantowego białka w systemie Tabora - Studiera

Pożywkę LB (20 mL) z dodatkiem ampicyliny 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Roz. 3.1.3) zaszczepiano komórkami szczepu ekspresyjnego transformowanymi skonstruowanym wcześniej plazmidem. Hodowlę inkubowano w inkubatorze powietrznym z wytrząsaniem 180 obr. min^{-1} przez 12 godzin w 37°C. Następnie do 800 mL sterylnej pożywki LB z dodatkiem ampicyliny 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Roz. 3.1.3) dodawano 10 mL przygotowanej wcześniej nocnej hodowli bakteryjnej i inkubowano w inkubatorze powietrznym z wytrząsaniem w 37°C. Po osiągnięciu gęstości optycznej $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,4 - 0,8 dodawano do hodowli 400 lub 800 mL roztworu 0,05 M - 1 M IPTG i inkubowano w wytrząsarce w 20-37°C przez 5-15 godzin. Następnie pobierano 1 mL z hodowli i przygotowywano próbkę do elektroforezy poliakrylamidowej SDS-PAGE (Roz. 3.2.6). Hodowlę bakteryjną (400-800 mL) przelewano do 200 mL probówek wirówkowych i odwirowywano przez 20 min przy 4 000 obr. min^{-1} . Powstały osad przechowywano w -20 °C.

Warunki nadprodukcji badanych białek optymalizowano w zakresie następujących czynników:

- szczep producencki (*Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS, *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLacI, *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, *Escherichia coli* BL21 Star(DE3)TM, *Escherichia coli* Origami 2 (DE3) pLysS). Wykorzystane szczepy producenckie posiadają delecję genów *lon* i *ompT*. Nie produkują zewnątrzkomórkowej proteazy *ompT* i wewnątrzkomórkowej proteazy *lon*, dzięki czemu produkowane przez nie białka rekombinantowe są mniej narażone na proteolityczną degradację [Gottesman 1996; Grodberg i Dunn 1988]. W szczepach DE3, genom profaga λDE3 został zintegrowany z chromosomem bakterii

wprowadzając tym samym gen polimerazy RNA faga T7 pod kontrolą negatywną promotora lacUV5 z operatorem wiążącym represor laktozowy, niezbędny do ekspresji genów wprowadzonych pod kontrolą promotora dla polimerazy RNA z faga T7 (np. plazmidy pET) [Studier i Moffatt 1986]. Szczepy BL21 posiadają ponadto mutację *hsdSB*, która zapobiega metylacji, degradacji i utracie wprowadzonych plazmidów. Komórki Rosetta posiadają delecję genu *lacY*. Nie produkują permeazylaktozowej, umożliwiając precyzyjne sterowanie poziomem ekspresji spodromotora T7 przy pomocy regulowanego stężenia IPTG [Rosano i Ceccarelli 2014]. Szczepy posiadają plazmidy pLysS bądź pLacI z serii pRARE, które zawierają różną pulę tRNA umożliwiającą wydajną ekspresję genów heterologicznych kodowanych przez rzadkie kodony u *E. coli*. Niosą one również oporność na chloramfenikol oraz zawierają pulę genów umożliwiającą ekspresję genów wykorzystując system Tabora-Studiera. Plazmid pLysS zawiera gen kodujący lizozym faga T7, którego produkt hamuje polimerazę RNA T7 zapobiegając śladowej ekspresji wynikającej z nieszczelności układu ekspresyjnego (ang. *leaky expression*),

- temperatura i czas nadprodukcji (6-48 h, 20-37°C),
- skład pożywki (LB z 1 % glukozą, 3% etanolem, 4% glicerolem bądź 0,5 M sorbitolem),
- stężenie induktora (0,05 mM – 1 mM),
- rodzaj induktora (laktoza, IPTG),
- ilość pożywki (200-800 mL),
- gęstości optycznej komórek w chwili dodawania induktora do hodowli (OD_{600nm} 0,3-0,8).

3.2.14 Przygotowanie ekstraktu bezkomórkowego

Osad z 400 mL hodowli poekspresyjnej (Roz. 3.2.13) zawieszano w 10 mL buforu odpowiedniego dla oczyszczanego białka i dodawano 50 μ L 100 mM roztworu PMSF. Następnie mieszaninę poddawano sonifikacji (amplituda drgań znamionowej końcówki 30%, 4 razy po 30 s w odstępach 30 s w temperaturze 4°C). Uzyskany lizat komórkowy przenoszono do probówki wirówkowej (50 mL) i odwirowywano przez 20 min przy 10 000 obr. min^{-1} w 4°C. Tak otrzymany ekstrakt bezkomórkowy wykorzystywano do dalszych analiz.

Odczynniki: Białka CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp: bufor fosforanowy 20 mM pH 7, białka CaAro8CHp, CaYer152CHp: bufor W5_{ARO8} Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM; białko CaAro9CHp: bufor W5_{ARO9}Tris-HCl 20 mM pH 8,5, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM; roztwór PMSF 100 mM w izopropanolu.

3.2.15 Oczyszczanie rekombinantowego białka przy pomocy chromatografii metalopowinowactwa na kolumnie HisTrap

W celu oczyszczenia białka rekombinantowego z domeną polihistydynową wykorzystano kolumnę HisTrapFF zawierającą złożę Sepharose z chelatowanymi jonami niklu Ni^{2+} . Kolumna ta umożliwia preparatywne oczyszczanie białek fuzyjnych z domeną oligoHis, które selektywnie wiążą się ze złożem. Elucja następuje dzięki zastosowaniu buforów o zwiększającym się stężeniu imidazolu, który konkurencyjnie oddziałuje ze złożem. Białka nie zawierające domeny fuzyjnej HisTag słabiej oddziałują ze złożem i zostają wymyte przy mniejszym stężeniu imidazolu. Uzyskuje się tym samym preparat białka rekombinantowego o bardzo wysokiej czystości. Separację wykonuje się w krótkim czasie (ok. 15 min)

wykorzystując zestaw do FPLC AKTA. Dozowano do kolumny 10 mL ekstraktu bezkomórkowego (Roz. 3.2.14). Białka wmywano z kolumny buforem o wzrastającym stężeniu imidazolu (gradient 5-500 mM w 15 objętościach kolumny, 4-5 mL min⁻¹). Uzyskaną frakcję białkową przechowywano w optymalnych warunkach dla badanego białka. Wszystkie uzyskane z kolumny frakcje poddawano analizie elektroforetycznej SDS-PAGE (Roz. 3.2.6). Po każdorazowym oczyszczaniu różnych białek złożę kolumny poddawano regeneracji zgodnie z procedurą opisaną w specyfikacji kolumny HisTrapFF 5 mL (GE Healthcare). Po zakończonym procesie oczyszczania do kolumny dozowano 20% EtOH.

Odczynniki: Białka CaAro8CHp, CaYer152CHp: bufor W5_{ARO8}Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, bufor W500_{ARO8} Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM; białko CaAro9CHp bufor W5_{ARO9} Tris-HCl 20 mM pH 8,5, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM, bufor W500_{ARO9} Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM.

Wykorzystywano zestaw do kolumnowej średniociśnieniowej chromatografii cieczowej (FPLC) AKTA sprzężony z detektorem UPC-900 UV ($\lambda = 254, 280$ nm) i kolektorem frakcji, będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw.

3.2.16 Oczyszczanie białka rekombinantowego bez domeny oligoHis przy pomocy chromatografii jonowymiennej na kolumnie ResourceQ

Do uzyskanego ekstraktu bezkomórkowego (Roz. 3.2.14) dodawano siarczan streptomycyny do uzyskania końcowego stężenia 1,1%. Podczas tego etapu wytrącano DNA z ekstraktu bezkomórkowego. Siarczan streptomycyny dodawano przez 20 minut, ciągle mieszając preparat białkowy i chłodząc do 4°C. Następnie wirowano przy 12 000 obr. min⁻¹ przez 20 minut w 4°C. Do supernatantu dodawano roztwory soli MgCl₂ (do stężenia końcowego 10 mM mL⁻¹) i NaCl (do stężenia końcowego 40 mM mL⁻¹) a następnie nasycony roztwór siarczanu amonu do uzyskania stężenia 45%. Mieszano przez 20 min w 4°C. Podczas tego etapu podczyszczano badane białka. Część białek, w tym badane, ulegały wytrąceniu, resztę odrzucano. Całość ponownie wirowano w 4°C przy 12 000 obr. min⁻¹ przez 20 minut. Osad z badanym białkiem, rozpuszczano w buforze 1, supernatant odrzucano. Po rozpuszczeniu osadu roztwór ponownie wirowano w 4°C przy 12 000 obr. min⁻¹ przez 20 minut. Aby usunąć nadmiar soli, która zaburzałaby przebieg chromatografii jonowymiennej, wymieniano bufor na bufor 1 (bez dodatku soli) przy pomocy procedury 3.2.20. Dozowano ok. 3-10 mL uzyskanego eluatu do kolumny ResourceQ. Białka wmywano z kolumny przy pomocy buforu o zwiększającym stężeniu soli (bufor fosforanowy 20 mM pH 7, 0-500 mM NaCl, w 10 objętościach kolumny, przy przepływie 1 mL min⁻¹). Zbierano frakcje o objętości 2 mL. Uzyskaną frakcję białkową przechowywano w warunkach optymalnych dla określonego białka. Wszystkie uzyskane z kolumny frakcje poddawano rozdzielni elektroforetycznej SDS-PAGE (Roz. 3.2.6). Po każdorazowym oczyszczaniu różnych białek złożę kolumny poddawano regeneracji zgodnie z procedurą opisaną w specyfikacji kolumny ResourceQ (GE Healthcare). Po zakończonym procesie oczyszczania do kolumny dozowano 20% EtOH.

Odczynniki: Bufor 1: bufor fosforanowy 20 mM, pH 7, EDTA 1 mM.

Wykorzystywano zestaw do kolumnowej średniociśnieniowej chromatografii cieczowej (FPLC) AKTA sprzężony z detektorem UPC-900 UV ($\lambda = 254, 280$ nm) i kolektorem frakcji, będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw.

3.2.17 Oczyszczanie preparatów białkowych przy pomocy chromatografii rozmiarów wykluczających

Zagęszczone preparaty białkowe do objętości 5 mL nakładano na kolumnę do filtracji żelowej Superdex 200 16/600. Prowadzono rozdział chromatograficzny przy pomocy buforu odpowiedniego dla określonego białka, przy 1 mL min⁻¹, w dwóch objętościach kolumny. Zbierano frakcje o objętości 5 mL. Uzyskaną frakcję białkową przechowywano w warunkach optymalnych dla określonego białka. Wszystkie uzyskane z kolumny frakcje poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu SDS-PAGE (Roz. 3.2.6).

Odczynniki: Bufor do filtracji żelowej: bufor fosforanowy 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, bufony do oczyszczania białek: CaAro8p i CaAro8CHp 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl; CaAro9p, CaAro9CHp 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl.

Wykorzystywano zestaw do kolumnowej średniociśnieniowej chromatografii cieczowej (FPLC) AKTA sprzężony z detektorem UPC-900 UV (λ = 254, 280 nm) i kolektorem frakcji, będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw.

3.2.18 Wyznaczanie masy cząsteczkowej białka i struktury oligomerycznej

a) elektroforeza SDS-PAGE

Na podstawie uzyskanych elektroforegramów wyznaczono krzywą wzorcową $\log MW = f(R_f)$ dla pasm białkowych wzorca masowego. Krzywa kalibracyjna wyznaczana była dla każdego rozdziału z osobna. Korzystając ze wzoru wyznaczanego na podstawie krzywej kalibracyjnej:

$$\log MW = a * R_f + b$$

MW- masa cząsteczkowa białka [kDa],

R_f- ruchliwość elektroforetyczna - stosunek długości drogi migracji białka w żelu do drogi migracji czoła elektroforezy [-],

a, b- współczynniki kierunkowe krzywej kalibracyjnej,

wyliczano masę cząsteczkową badanego białka fuzyjnego [kDa].

b) analiza bioinformatyczna

Wykorzystując program ProtParam i Translate (Roz. 3.1.7) na podstawie znanej sekwencji nukleotydowej białka (Candida Genome Database <http://www.candidagenome.org/> [Skrzypek i in. 2011]) wyznaczano sekwencję aminokwasową a następnie teoretyczną masę cząsteczkową białka fuzyjnego.

c) elektroforeza w warunkach natywnych

Elektroforezę w warunkach natywnych wykonywano zgodnie z procedurą zestawu NativePAGE™ Novex Bis-Tris Gel System Invotrogen. Żele wybarwiano metodą Comassie Staining of NativePAGE™ Gels, Life Technologies, zgodnie z procedurą producenta. Na podstawie rozdziału wzorca masowego wyznaczono krzywą wzorcową dla mas poszczególnych białek. Krzywa kalibracyjna wykonywana była dla każdego rozdziału elektroforetycznego z osobna. Korzystając ze wzoru wyznaczanego na podstawie krzywej kalibracyjnej:

$$\log MW = a * R_f + b$$

MW- masa cząsteczkowa białka [kDa],

Rf- ruchliwość elektroforetyczna - stosunek długości drogi migracji białka w żelu do drogi migracji czoła elektroforezy [-],

a, b- współczynniki kierunkowe krzywej kalibracyjnej,

wyliczano masę cząsteczkową badanego białka fuzyjnego [kDa]. Znając masę pojedynczej podjednostki białka wyznaczano strukturę oligomeryczną.

d) filtracja żelowa

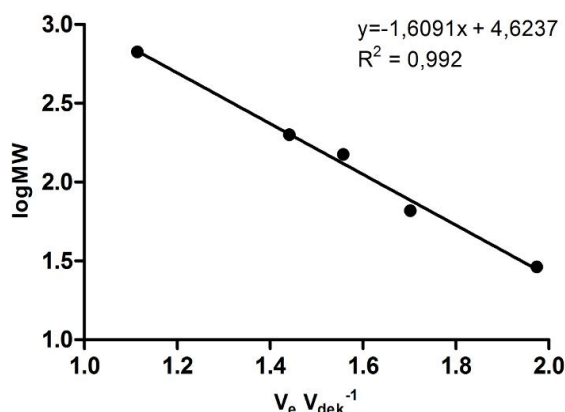
Na podstawie wyznaczonej krzywej wzorcowej zależności mas molekularnych białka od objętości elucji z kolumny, wyliczano masy molekularne rozdzielanych białek. Zagęszczone preparaty białkowe do objętości 0,5 mL o stężeniu ok. 1 mg mL⁻¹ dozowano do kolumny do filtracji żelowej Superdex 200 10/300. Przeprowadzono rozdział chromatograficzny przy pomocy buforu fosforanowego 50 mM pH 7, NaCl 150 mM przy 0,5 mL min⁻¹ przez dwie objętości kolumny. Zbierano frakcje o objętości 0,5 mL. Wszystkie uzyskane z kolumny frakcje poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu SDS-PAGE (Roz. 3.2.6).

Krzywą kalibracyjną dla kolumny Superdex 200 10/300 do filtracji żelowej wyznaczano prowadząc rozdział chromatograficzny pojedynczych preparatów białkowych (Tab. 19), przygotowanych zgodnie z zaleceniem producenta zestawu Sigma Markers for isoelectric focusing IEF-M2. Elucję przeprowadzano w warunkach podanych powyżej z zastosowaniem tego samego buforu.

Tab. 19 Wykaz białek wykorzystywanych do wyznaczania krzywej kalibracyjnej kolumny Superdex 200 10/300 do filtracji żelowej

Nazwa białka	Masa cząsteczkowa	Objętość elucji	
Tryglobulina	669 kDa	9,57 mL	V _e
Amylaza	200 kDa	12,38 mL	
Dehydrogenaza alkoholowa	150 kDa	13,38 mL	
Bsa	66 kDa	14,62 mL	
Anhydroza węglanowa	29 kDa	16,96 mL	
Dekstran	-	8,59 mL	V _{dek}

Odczytując objętość elucji (V_e) poszczególnych białek wyznaczano wartość V_e V_{dek}⁻¹, (gdzie V_{dek} jest objętością swobodną kolumny) i sporządzano krzywą kalibracyjną (Rys. 18):



Rys. 18 Krzywa wzorcowa kolumny Superdex 200 10/300 do filtracji żelowej $\log MW = f(V_e V_{dek}^{-1})$

Wykorzystywano zestaw do kolumnowej średniociśnieniowej chromatografii cieczowej (FPLC) AKTA sprzężony z detektorem UV (λ = 254, 280 nm) i kolektorem frakcji, będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo

sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw.

3.2.19 Zateżnianie preparatów białkowych przez ultrafiltrację

Zateżnianie preparatów oczyszczonych białek przeprowadzano przy użyciu filtrów Amicon® Ultra-15 (Millipore) z progiem odcięcia 10-30 kDa w zależności od wielkości białka. Preparat białkowy umieszczano w filtrze po czym wirowano przy 4,5 tys. obr. min⁻¹, w temp. 4°C, aż do uzyskania właściwego stężenia białka.

3.2.20 Wymiana buforu preparatu białkowego

Wymianę buforów w preparatach białkowych przeprowadzano korzystając z kolumny HiTrap Desalting (GE Healthcare) zgodnie z procedurą producenta.

3.2.21 Immunodetekcja białek rekombinantowych techniką Western Blotting

W celu potwierdzenia obecności domeny fuzyjnej hekshaHis w badanych białkach wykonywano procedurę immunodetekcji Western Blotting. Preparaty białkowe rozdzielone w żelu poliakrylamidowym przenoszono na membranę nitrocelulozową z porami o średnicy 0,45 µm metodą blotting pól suchego (elektrotransfer). Trzy warstwy bibuły Whatmann nasączone buforem do transferu układano na płycie anodowej aparatu, następnie umieszczano błonę nitrocelulozową, żel poliakrylamidowy i kolejne trzy warstwy bibuły, a całość dociskano płytą katodową. Procedurę transferu białek prowadzono przez godzinę przy 40 mA. Następnie umieszczano membranę nitrocelulozową w 3% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze płuczającym. Po upływie 18 godzin membranę płukano trzykrotnie przez 10 min buforem płuczającym. Następnie membranę przenoszono do buforu zawierającego mysie monoklonalne przeciwciała wyznakowane peroksydazą chrzanową i umieszczano na kołyszce laboratoryjnej na 1 godzinę. Niezwiązane przeciwciała odmywano poprzez pięciokrotne 30 min płukanie buforem płuczającym. Po wykonaniu tej czynności, na membranę наносzono około 1 mL roztworu zawierającego 3, 3', 5, 5'- tetrametylobenzodynę. W wyniku działania enzymu substrat ulegał przekształceniu w barwny produkt obserwowany jako prążek na powierzchni membrany w miejscu obecności kompleksu białka z domeną oligohistydynową z przeciwciałem z peroksydazą chrzanową.

Odczynniki: Bufor do transferu: pH 8,3, metanol 20%, glicyna 192 mM, Tris-HCl 25 mM; bufor płuczający: pH 8,0, NaCl 30 mM, Tris-HCl 10 mM; bufor zawierający przeciwciała: pH 8,0, Tris-HCl 10 mM, NaCl 30 mM, BSA 1% , Tween20 0,05%, przeciwciała antyHis6 połączone z peroksydazą chrzanową Monoclonal AntipokyHistydyne-Peroxidase antibody A7 058-1VL Sigma 1:3000; 3, 3', 5, 5' - tetrametylobenzodyna Sigma - Aldrich T0565.

3.2.22 Krystalizacja białka rekombinantowego

Do krystalizacji białek rekombinantowych stosowano metodę kropli siedzącej. Krystalizacji poddawano preparaty białek o czystości powyżej 95% i stężeniu 10 - 30 mg mL⁻¹. Optymalizację krystalizacji białek przeprowadzano na płytkach zawierających 96 studzienek o pojemności 200 µL. Krystalizację przeprowadzano uwzględniając różne stężenie białka w kropli krystalizacyjnej, różne warunki buforowe, tj. rodzaj buforu, soli i innych dodatków oraz pH (zestawy do krystalizacji firmy Hampton oraz Molecular Dimensions). Zmiany zachodzące

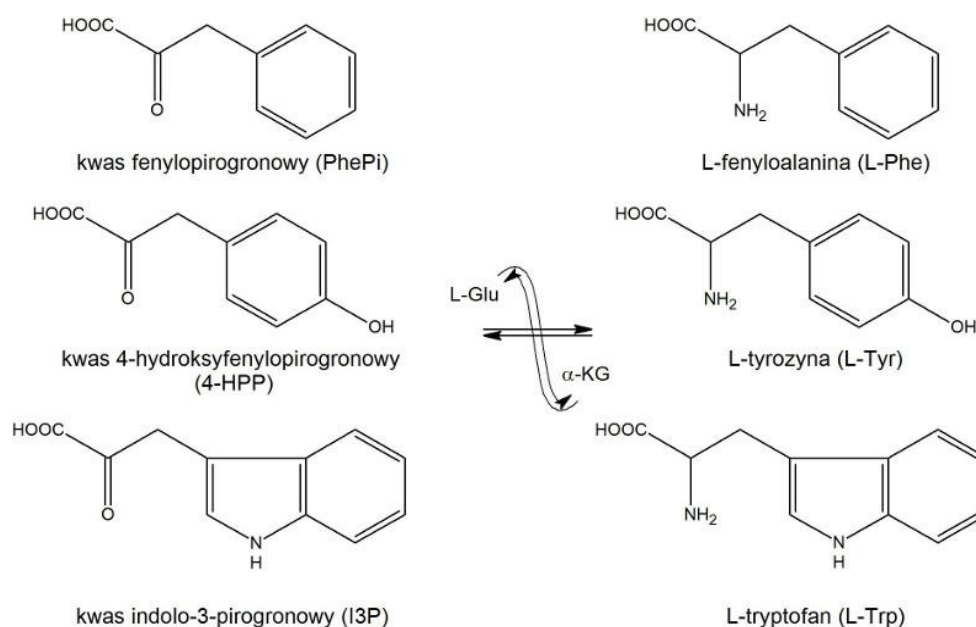
w kroplach obserwowano za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego. Część testów krystalizacyjnych przeprowadzano w Pracowni Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu z wykorzystaniem robota do krystalizacji typu Gryphon Art. Robinson.

Do prób krystalizacyjnych dodawano substraty: fenylopirogronian, kwas L- α -aminoadypinowy, L-feniloalaninę, kwas L-glutaminowy, kwas α -ketoglutarowy, kwas α -ketoadypinowy i kofaktor PLP w stężeniu 1:1, 2:1 (kokrystalizacja). Wymienione substancje dodawano również do prób z już wykryszalowanymi białkami (nasączenie kryształów).

3.2.23 Oznaczenie aktywności aminotransferazowej

a) aktywność aromatycznej aminotransferazy

W celu oznaczenia aktywności aromatycznej aminotransferaz wykorzystano metodę opartą na opisanej przez Kradolfera [Kradolfer i in. 1982]. Przeprowadzano reakcję w kierunku rozkładu i biosyntezy aromatycznych aminokwasów (Rys. 19).



Rys. 19 Schemat reakcji katalizowanych przez aromatyczne aminotransferazy

Przygotowywano roztwory o następującym składzie:

Tab. 20 Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczania aktywności aromatycznej aminotransferazy

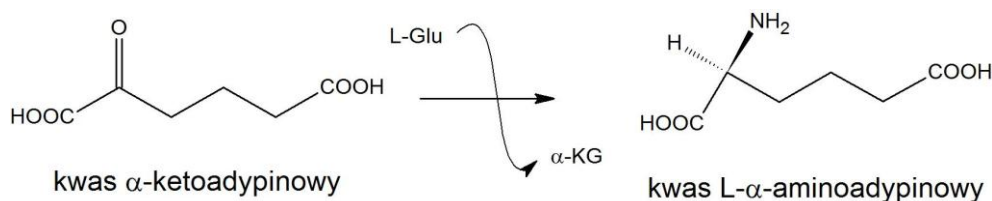
Rozkład aromatycznych aminokwasów		Synteza aromatycznych aminokwasów	
L-Phe, L-Tyr, L-Trp	0,001-10 mM	PhePi, 4-HPP	0,005-0,06 mM
α -Ketoglutaran	0,001-20 mM	Kwas L-glutaminowy	1,5- 40 mM
PLP	0,03 mM	PLP	0,03 mM
Enzym	0,026 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	Enzym	0,026 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
100 mM bufor Tris-HCl pH 6- 9	do 200 μL	100 mM bufor Tris-HCl pH 6- 9	do 200 μL

Przeprowadzano reakcję w ciągu 1-5 min (w zależności od zastosowanej reakcji i enzymu), a następnie zatrzymywano reakcję poprzez dodanie 800 μL 2,5 M NaOH. Wykonywano pomiar spektrofotometryczny uzyskanej mieszaniny przy 320 nm (dla L-Phe – PhePi), 331 nm (dla L-Tyr – 4-HPP) lub 338 nm (dla L-Trp) z użyciem spektrofotometru UV-Vis firmy PerkinElmer. Stężenie powstałego produktu wyliczano na podstawie współczynników

ekstynkcji $\epsilon_{(\text{PhePi})}=17,500 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [Dawson i in. 1970], $\epsilon_{(4\text{-HPP})}=19,900 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [Granner i Tomkins, 1970], $\epsilon_{(13\text{P})}=9,300 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [Brunke i in. 2010].

b) aktywność α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej

W celu oznaczenia aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej w kierunku biosyntezy kwasu L- α -aminoadypinowego wykorzystano metodę opartą na opisanej przez zespół Nakatani [Nakatani i in. 1970]. Jest to reakcja dwuetapowa, w której to w pierwszym etapie prowadzi się reakcję katalizowaną przez AmAA (Rys. 20). Powstaje wówczas kwas α -ketoadypinowy, który w drugim etapie reakcji jest przekształcany przez dehydrogenazę kwasu glutaminowego do kwasu glutaminowego przy udziale NADH (Rys. 21). Wykonuje się pomiar zmiany absorpcji przy 340 nm wynikający z przekształcenia NADH w NAD^+ i na jego podstawie oblicza ilość powstałego kwasu α -ketoadypinowego w pierwszym etapie reakcji.



Rys. 20 Schemat reakcji katalizowanej przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową. Biosynteza kwasu L- α -aminoadypinowego

Przygotowywano roztwory o następującym składzie:

Tab. 21 Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej w kierunku biosyntezy kwasu L- α -aminoadypinowego

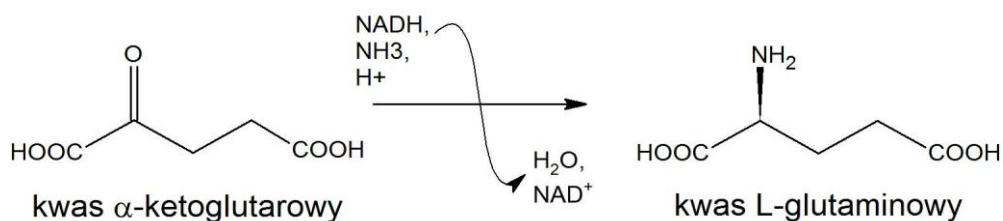
Biosynteza α -ketoadypinowego	
Kwas α -ketoadypinowy	0,05-1,5 mM
Kwas L-glutaminowy	2- 20 mM
PLP	0,03 mM
Enzym	0,013 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
100 mM bufor Tris-HCl pH 6- 9	do 200 μL

Przeprowadzano reakcję w ciągu 1-5 min (w zależności od zastosowanego enzymu), a następnie zatrzymywano reakcję poprzez dodanie 60 μL 1 M HCl i neutralizowano pH przy pomocy 60 μL 1 M NaOH. 200 μL tak uzyskanej mieszaniny dodawano do roztworu o następującym składzie:

Tab. 22 Skład mieszaniny reakcyjnej drugiego etapu reakcji oznaczania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Wykorzystanie dehydrogenazy kwasu glutaminowego do oznaczenia stężenia α -ketoadypinowego powstałego w pierwszym etapie

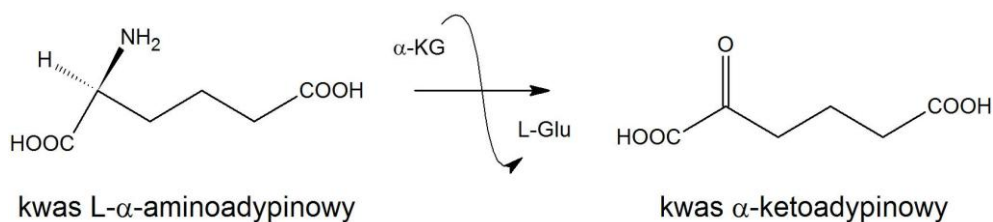
Biosynteza NAD^+	
NH_4Cl	0,05 M
NADH	0,1 mM
Dehydrogenaza kwasu glutaminowego	2,5 U
20 mM bufor fosforanowy pH 7	do 1000 μL

Reakcje przeprowadzano przez 30 min a następnie wykonywano pomiar spektrofotometryczny uzyskanej mieszaniny przy 340 nm z użyciem spektrofotometru UV-Vis firmy PerkinElmer. Stężenie powstałego produktu wyliczano na podstawie współczynnika ekstynkcji $\epsilon_{(\text{NAD}^+)} = 6,22 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [Vashishtha i in. 2008].



Rys. 21 Schemat drugiego etapu reakcji oznaczania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę kwasu glutaminowego

W celu oznaczenia aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej w kierunku rozkładu kwasu L- α -aminoadypinowego (Rys. 22) wykorzystano zestaw L-Glutamate Assay Kit firmy Sigma.



Rys. 22 Schemat reakcji katalizowanych przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową. Degradacja kwasu L- α -aminoadypinowego

Przygotowywano roztwory o następującym składzie:

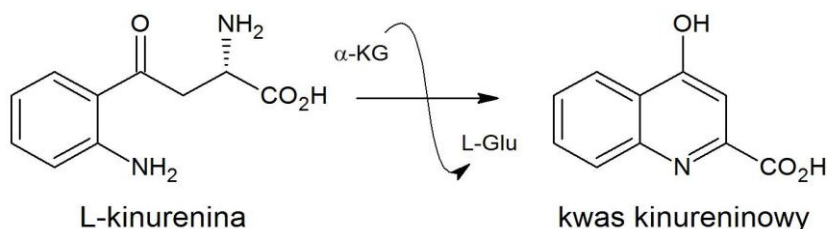
Tab. 23 Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej w kierunku rozkładu kwasu L- α -aminoadypinowego

Biosynteza kwasu L-glutaminowego	
Kwas L- α -aminoadypinowy	0,1-0,5 mM
α -Ketoglutaran	0,1- 10 mM
PLP	0,03 mM
Enzym	0,013 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$
100 mM bufor Tris-HCl pH 6- 9	do 200 μL

Reakcje przeprowadzano przez 5 min i zatrzymywano poprzez podgrzewanie prób w 80°C przez 5 min. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej, pobierano 20 μL i oznaczano stężenie substratu reakcji, kwasu L-glutaminowego, zgodnie z procedurą opisaną w instrukcji zestawu.

c) aktywność kinureninowej aminotransferazy

Oznaczanie aktywności kinureninowej aminotransferazy (Rys. 23) przeprowadzano według metody opisanej przez zespół Wonga [Wong i in. 2011].



Rys. 23 Schemat reakcji katalizowanej przez kinureninową aminotransferazę. Biosynteza kwasu kinureninowego

Na 96-dołkowych mikroplótkach przygotowywano roztwory o następującym składzie:

Tab. 24 Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności kinureninowej aminotransferazy, w kierunku biosyntezy kwasu kinurenowego

Biosynteza kwasu kinurenowego	
L-Kinurenina	0-0,6 mM
α -Ketoglutaran	0-20 mM
PLP	0,03 mM
Tween 20	0,01%
50 mM bufor Tris-HCl pH 6- 9	do 100 μ L

Po upływie 1 min, w celu zatrzymania reakcji, dodawano 100 μ L 50 mM buforu Tris o pH 5 zawierającego 50 mM octan sodu i 350 mM octan cynku i wykonywano pomiar fluorescencji kompleksów kwasu kinurenowego z jonami cynku przy długości fali wzbudzenia λ_{ex} = 344 nm i długości fali emisji λ_{em} = 398 nm. Ilość powstałego kwasu kinurenowego w reakcji obliczano na podstawie sporządzonej wcześniej krzywej wzorcowej. W pomiarach wykorzystywano czytnik mikroplótek TECAN Spark 20M.

Pomiary wykonywano co najmniej trzykrotnie a uzyskane wyniki uśredniano.

3.2.24 Oznaczenie stężenie inhibitora hamującego w 50 % aktywność enzymu (IC_{50})

Przygotowywano roztwory o następującym składzie:

Tab. 25 Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczenia wpływu związków potencjalnych inhibitorów na aktywności badanych enzymów

L-Phe	2,5 mM
α -Ketoglutaran	10 mM
PLP	0,03 mM
Enzym	0,013 μ g μ L ⁻¹
100 mM bufor Tris-HCl pH 6- 9	do 200 μ L

i przeprowadzano 2 min reakcje w obecności związków hamujących aktywność enzymów. Reakcje zatrzymywano poprzez dodanie 800 μ L 2,5 M NaOH i wykonywano pomiar spektrofotometryczny uzyskanej mieszaniny przy 320 nm (dla L-Phe – PhePi). Stężenie powstałego produktu wyliczano na podstawie współczynnika ekstynkcji $\epsilon_{(PhePi)}$ =17,500 cm² mol⁻¹ [Dawson i in. 1970]. Pomiary wykonywano co najmniej trzykrotnie a uzyskane wyniki uśredniano.

Zakres używanych stężeń związków hamujących aktywność enzymów:

Tab. 26 Wykaz zakresu stężeń związków hamujących aktywność enzymów. Aminooksyoctan (AOA), cykloseryna (CS), jodek 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP), sulfincysteina (SC), kwas 3-nitropropionowy (NPA), 3-fosfonoalanina (AP-3), o-fosfo-L-seryna (OPS)

AOA	0,01-10 mM
CS	1-10 mM
MPP	1,7-10 mM
SC	1-10 mM
NPA	1-20 mM
AP-3	0,5- 5 mM
OPS	0,5-87,5 mM
Kwas szczawiowy	1,25 – 19 mM
L-Norleucyna	2-15 mM

3.2.25 Wykonanie widm absorpcyjnych dla enzymów wykorzystujących PLP

100 μL mieszaniny zawierającej odpowiedni bufor, enzym wiążący PLP o stężeniu 1 mg mL^{-1} oraz 0,1 mM PLP poddawano pomiarowi spektrofotometrycznemu przy długości fali od $\lambda=300$ nm do $\lambda=500$ nm w czasie 10-60 min. Po badanym czasie dodawano 1,5 mM kwas L-glutaminowy, 1,5 mM kwas L- α -aminoadypinowy, 1,5 mM L-histydynę i/lub 0,1 mM AOA i ponownie wykonywano pomiar spektrofotometryczny. W pomiarach wykorzystywano czytnik mikroplitek TECAN Spark 20M.

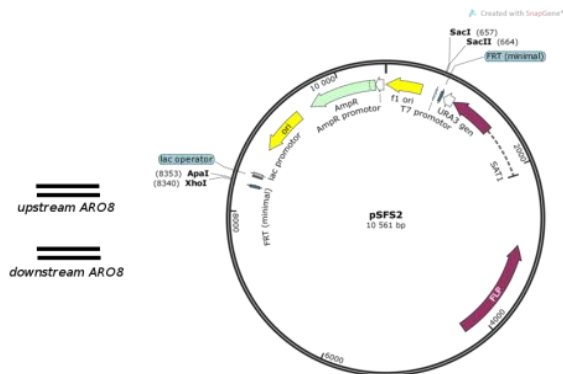
Odczynniki: Bufor fosforanowy 100 mM pH 7-8, Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 8.

3.2.26 Określenie optymalnego pH działania enzymów

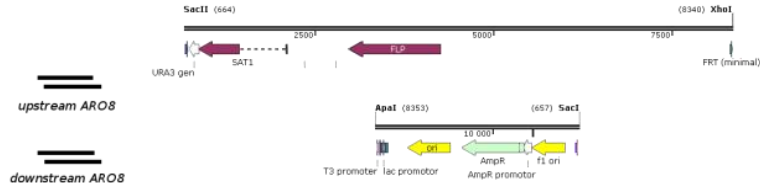
W celu określenia optymalnego pH działania enzymów oznaczano aktywność badanych enzymów według procedur opisanych powyżej (Roz. 3.2.23), w buforach o pH od 6 do 9.

3.2.27 Przygotowanie kasety do usunięcia genu z genomu *C. albicans*

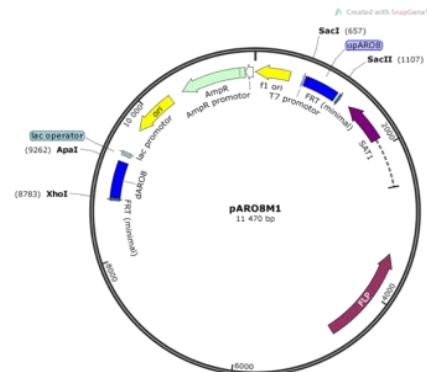
Do skonstruowania mutantów *C. albicans* pozbawionych genów kodujących aminotransferazy wykorzystywano metodę opracowaną przez zespół prof. Morschhäusera w 2004 r. [Reuss i in. 2004]. Usunięcie genów przeprowadzono podczas stażu u prof. Morschhäusera na Uniwersytecie w Würzburgu. W celu przygotowania kasety nokautującej otrzymywano plazmidy stosowane do usunięcia genów zawierające: kasetę nokautującą określony gen, gen *caFLP* kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP (będący pod kontrolą promotora *MAL2p*), gen oporności na nourseotrycynę (*SAT1*), sekwencję *FRT* czyli miejsce rozpoznania dla rekombinazy FLP (34 pz). Stosowano metodykę według schematu przedstawionego na Rys. 24.



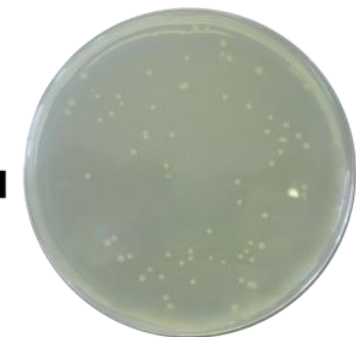
Trawienie restrykcyjne
SacI/SacII
ApaI/XhoI



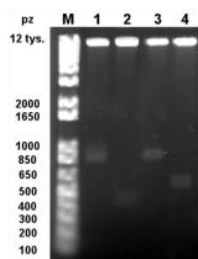
Ligacja



Transformacja do komórek
E. coli DH5 α ,
 namnożenie plazmidu

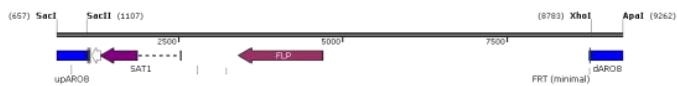


Kolonie *E. coli* z konstrukcjami plazmidu



Sprawdzenie poprawności
 konstruktów,
 sekwencjonowanie

Izolacja kasety
 nokautującej,
 trawienie
 restrykcyjne
ApaI/SacI



Kaseta nokautująca gen *ARO8*

Rys. 24 Schemat przygotowania kaset nokautującej według metody SAT1-flipper

a) przygotowanie insertów - amplifikacja regionów *upstream* i *downstream* genu

Fragmenty DNA występujące przed i za usuwanym genem w genomie *C. albicans* (ang. *upstream sequence*, *downstream sequence*) o wielkości ok. 500 pz, amplifikowano na matrycy genomowego DNA *C. albicans* SC5314. Do reakcji PCR używano odpowiedniej pary starterów (Roz. 3.1.5) w zależności od usuwanego genu. Do sekwencji starterów wprowadzano miejsca rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych *SacI*, *SacII* oraz *Apal*, *XhoI* (Roz. 3.1.6) niezbędne podczas klonowania do plazmidu pSFS2. Reakcje PCR przeprowadzano w następujący sposób:

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Tab. 27 Skład mieszaniny reakcyjnej amplifikacji regionów *upstream* i *downstream* badanych genów

Woda jałowa miliQ	34,5 μ L
DNA <i>Candida albicans</i> SC5314 1:10	1 μ L
Starter lewy	1 μ L
Starter prawy	1 μ L
Polimeraza Phusion DNA	0,5 μ L
dNTP 5 mM	2 μ L
Bufor 5x HF	10 μ L
Razem	50 μ L

Profil temperaturowo-czasowy:

Tab. 28 Profil temperaturowo czasowy reakcji amplifikacji *upstream* i *downstream* badanych genów

Denaturacja wstępna	98 °C	120 s	x 30
Denaturacja	98 °C	20 s	
Przyłączenie starterów	55 °C	20 s	
Elongacja	72 °C	45 s	
Elongacja	72 °C	300 s	
Chłodzenie	4 °C	∞	

Uzyskane produkty PCR rozdzielano na żelu agarozowym 1% i poddawano oczyszczaniu przy pomocy procedury z zestawu Macherey- Nagel Nucleo Spin Gel out and Clean up PCR kit.

b) przygotowanie plazmidu zawierającego kasetę nokautującą

Uzyskane fragmenty *upstream* i *downstream* oraz plazmid pSFS2 (Roz. 3.1.5) poddawano trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi:

Tab. 29 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego substratów do konstrukcji kasety nokautującej badane geny

	Para enzymów, 2 μ L	DNA (μ L)	Bufor NEB (μ L)	Woda (μ L)
<i>upstream</i>	<i>SacI</i> -HF/ <i>SacII</i>	43	5	0
<i>downstream</i>	<i>XhoI</i> / <i>Apal</i>	43	5	0
pSFS2 (fragment I, 7,5 kpz)	<i>SacII</i> / <i>XhoI</i>	15	5	28
pSFS2 (fragment II 2,9 kpz)	<i>SacI</i> -HF/ <i>Apal</i>	15	5	28

Trawienie przeprowadzano w ciągu 3 h w 37°C. Następnie rozdzielano uzyskane produkty przy pomocy elektroforezy agarozowej w 0,8% żelu (30 cm) przez noc przy 1,2 V cm^{-1} .

Wycinano uzyskane produkty z żelu i oczyszczano przy pomocy procedury z zestawu GeneClean III kit firmy MP Biomedicals.

Plazmid zawierający kasetę nokautującą konstruowano łącząc uzyskane fragmenty przy pomocy ligazy faga T4.

Skład mieszaniny ligacyjnej:

Tab. 30 Skład mieszaniny ligacyjnej do konstrukcji kasety nokautującej

Woda jałowa miliQ	2 μ L
Wektor	1 μ L
Kaseta	4 μ L
Fragment <i>upstream</i>	6 μ L
Fragment <i>downstream</i>	3 μ L
Bufor ligazy faga T4	2 μ L
ATP (10 mM)	1 μ L
Ligaza T4	1 μ L
Razem	20 μ L

Ligację przeprowadzano przez noc w 12°C.

Następnie przeprowadzano transformację mieszaniny ligacyjnej do komórek *E. coli* DH5 α (Roz. 3.2.3), izolowano uzyskane plazmidy (Roz. 3.2.4) i poddawano analizie restrykcyjnej (Roz. 3.2.7). Poprawność skonstruowanego plazmidu potwierdzano przy pomocy sekwencjonowania zleconego firmie zewnętrznej.

Prawidłowy plazmid nazywano według wzoru p[nazwa genu]M1 np. pARO8M1.

c) oczyszczanie kasety nokautującej

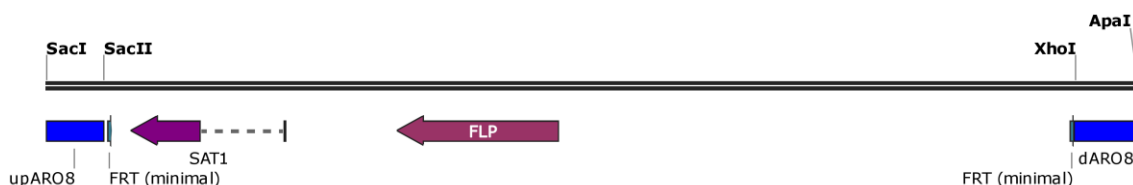
Plazmid zawierający kasetę nokautującą poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi przez 1 h w 37°C:

Tab. 31 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego skonstruowanych plazmidów w celu izolacji kasety nokautującej badane geny

Woda jałowa miliQ	28 μ L
Plazmid	15 μ L
<i>ApaI</i>	1 μ L
<i>SacI</i>	1 μ L
Bufor CutSmart	5 μ L
Razem	50 μ L

Uzyskane fragmenty DNA poddawano rozdzielni elektroforetycznej przez 3 h przy napięciu 6 V cm⁻¹. Wycinano z żelu uzyskany produkt o wielkości ok. 8,5 kbp i oczyszczano przy pomocy procedury z zestawu GeneClean III kit MP Biomedicals.

Tak uzyskaną kasetę nokautującą nazywano według wzoru [nazwa genu]M1 np. ARO8M1 (Rys. 25).



Rys. 25 Schemat kasety nokautującej stosowanej do usuwania genu *ARO8*. upAro8 – sekwencja przed genem *ARO8* (ang. *upstream*), dARO8 – sekwencja za genem *ARO8* (ang. *downstream*), *FLP* - gen kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę, *SAT1* - gen oporności na nourseotrycynę, *FTR* miejsce rozpoznania dla rekombinazy *FLP*

3.2.28 Usuwanie genu z genomu *C. albicans*

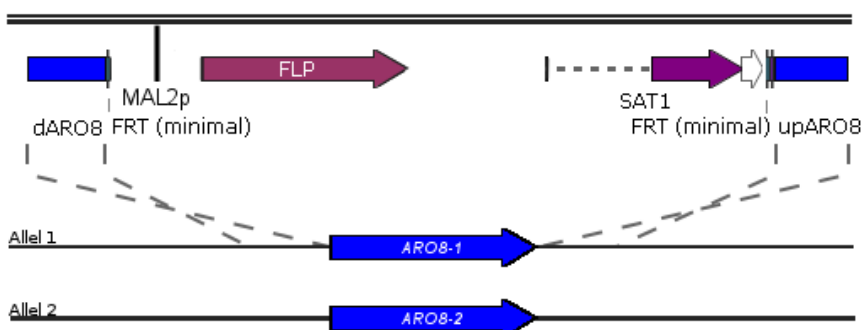
Uzyskaną kasetę nokautującą transformowano do elektrokompetentnych komórek *C. albicans* SC5314. W komórkach gospodarza dochodziło do spontanicznej rekombinacji homologicznej (podwójny crossing-over) między fragmentami *upstream* i *downstream*,

znajdującymi się w obrębie transformowanego fragmentu DNA, a komplementarnymi do nich sekwencjami w genomie *C. albicans* (Rys. 26). W wyniku rekombinacji następowała wymiana interesującego genu na odpowiednią kasetę nokautującą. Kasetę nokautującą zawiera gen *SAT1* oporności na nourseotrycynę (Nou), dzięki czemu możliwa była selekcja transformantów, u których zaszła integracja kasety nokautującej do jednego z alleli. Po transformacji mutanty wysiewano na podłoże stałe YEPG z nourseotrycyną ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Po 1 dniu hodowli w temp. 30°C obserwowano wzrost transformantów opornych na antybiotyk (NouR).

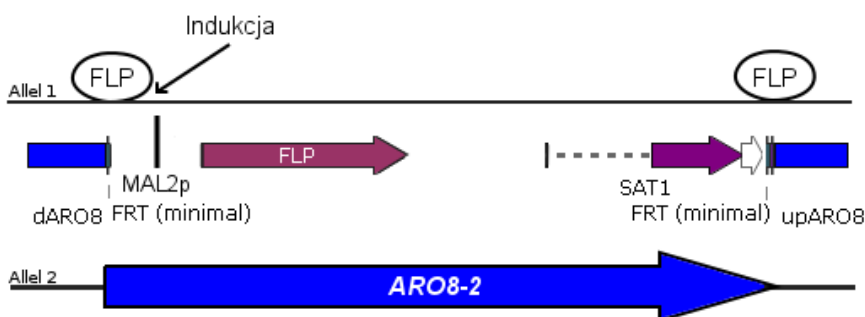
a) transformacja kasety nokautującej do komórek grzybowych

Zaszczepiano 50 mL pożywki YEPG (Roz. 3.1.3) 1 mL zawiesiny komórek hodowli nocnej *C. albicans* SC5314. Hodowano w wyrząsarce przy $200 \text{ obr. min}^{-1}$ przez 24 h w 30°C . Następnie komórki odwirowywano przy $3\ 500 \text{ obr. min}^{-1}$ przez 10 min w 4°C . Osad zawieszano w 8 mL zimnej, sterylnej wody, 1 mL 10xTE pH 8 i 1 mL 1M roztworu octanu litu pH 7,5. Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano w 30°C przez 1 h przy $200 \text{ obr. min}^{-1}$. Do zawiesiny dodawano $250 \mu\text{L}$ 1 M DTT i inkubowano przez kolejne 30 min w 30°C . Następnie dodawano 40 mL sterylnej wody i odwirowano przy $3\ 500 \text{ obr. min}^{-1}$, przez 5 min w 4°C . Powstały osad zawieszano w 25 mL wody i ponownie odwirowywano. Następnie do osadu dodawano 5 mL 1 M sorbitolu i odwirowywano. Usuwano supernatant, a osad zawieszano w pozostałej cieczy. Pobierano $60 \mu\text{L}$ tak przygotowanej zawiesiny komórek kompetentnych do schłodzonych kuwet elektroporacyjnych, dodawano $5 \mu\text{L}$ (20-200 ng) liniowego fragmentu DNA (oczyszczonego przy pomocy procedury gel-out Roz. 3.2.4). Próbkę kontrolną przygotowywano dodając do komórek kompetentnych $5 \mu\text{L}$ sterylnej wody. Przeprowadzano elektroporację przy napięciu 1800 V. Dodawano 1 mL pożywki YEPG do kuwet elektroporacyjnych. Tak uzyskaną zawiesinę komórek mutantów rozdzielano na dwie próbki A i B i inkubowano przez 4 h w 30°C . Wysiewano na podłoże stałe YEPG z dodatkiem nourseotrycyny $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Roz. 3.1.3). Płytki inkubowano w temp. 30°C przez 48 h.

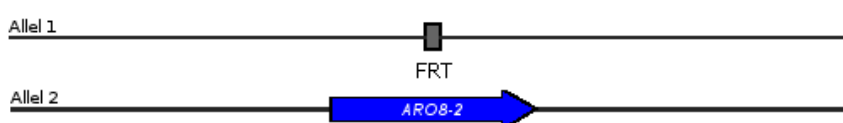
A) Rekombinacja homologiczna (integracja kasety w miejsce *ARO8-1*).



B) Indukcja promotora MAL2p. Ekspresja genu FLP.



C) Wycięcie kasety przez rekombinazę.



Rys. 26 Schemat przedstawiający kolejne etapy postępowania prowadzące do usunięcia genu *ARO8* z genomu *C. albicans* z wykorzystaniem metody *SAT1*-flipper. A) Rekombinacja homologiczna prowadząca do wymiany genu *ARO8* na kasetę nokautującą; B) Indukcja ekspresji genu kodującego miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP; C) Fragment genomu szczepu *CaARO8M2*, mutant heterozygotyczny (*aro8Δ-1::FTR/ARO8-2*). W celu usunięcia genu na drugim allelu, należy powtórzyć etapy od A do C uzyskując zmutowany szczep *CaARO8M4* (*aro8Δ -1::FTR/aro8Δ -2::FTR*)

Odczynniki: 10xTE: Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 0,1 mM.

b) analiza poprawności skonstruowanych mutantów

Z uzyskanych mutantów izolowano genomowe DNA według procedury 3.2.4. Następnie DNA poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi według następującej procedury:

Tab. 32 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego genomowego DNA

Woda jałowa miliQ	1,5 μL
Genomowe DNA	10 μL
Enzym I	1 μL
Enzym II	1 μL
Bufor CutSmart	1,5 μL

Trawienie przeprowadzano w 37°C przez 18 h. Uzyskane produkty rozdzielano przy pomocy elektroforezy agarozowej (0,8% żel, 30 cm, 4 V cm⁻¹, 3,5 h). Poprawność skonstruowanych mutantów oceniano przy pomocy procedury Southern Blotting (Roz. 3.2.29).

c) usunięcie kasety *SAT1*-FLP z poprawnie skonstruowanych mutantów

Poprawnie skonstruowane mutanty zawierające kasetę *SAT1*-FLP zaszczepiano na podłoże YCB z 0,4% BSA. Hodowlę inkubowano przez 18-24 h w 30°C, 200 obr. min⁻¹. Następnie wysiewano na stałe podłoże YEPG i inkubowano przez 18-24 h w 30°C. W celu identyfikacji mutantów z usuniętą kasetą *SAT1*-FLP (utrata oporności na nourseotrycynę) przeszczepiano pojedyncze kolonie na płytki YEPG i YEPG z dodatkiem 100 μg mL⁻¹ nourseotrycyny i inkubowano przez 18-24 h w 30°C. Uzyskane mutanty ponownie analizowano przy pomocy procedury Southern Blotting (Roz. 3.2.29).

3.2.29 Hybrydyzacja metodą Southern Blotting

Do hybrydyzacji i znakowania sond DNA używano zestawu ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System firmy Amersham Biosciences.

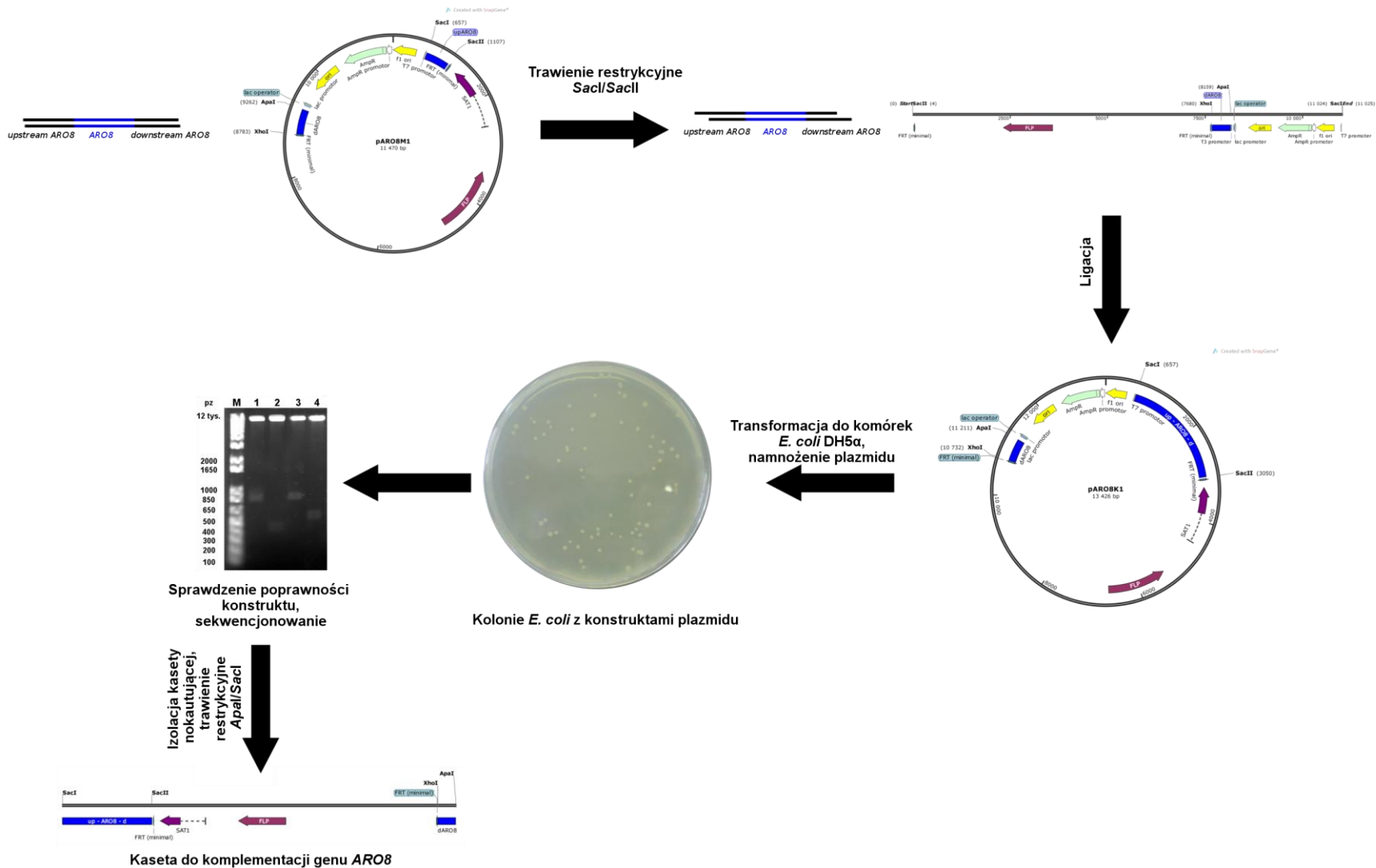
Nylonową membranę NYTRAN inkubowano 5 min w buforze SSCx20. Następnie umieszczano w aparacie do Southern Blottingu. Membranę przykrywano żelem agarozowym z rozdzielonym DNA. Żel agarozowy inkubowano przez 15 min kolejno w roztworze A zawierającym HCl (depurynacja), następnie w roztworze B zawierającym NaCl (denaturacja), i ostatecznie w roztworze C o pH 7,5 (neutralizacja). Transfer fragmentów DNA z żelu na membranę hybrydyzacyjną przeprowadzano przez 1,5 h przy podciśnieniu 60 mbar w buforze SSCx20. Związanie DNA z dodatnio-naładowaną błoną nylonową NYTRAN® poddawano immobilizacji przez naświetlanie promieniami UV (w aparacie do sieciowania DNA UV cross-linker). Następnie membranę umieszczano w tubie inkubacyjnej i dokonywano inkubacji błony w roztworze prehybrydyzacyjnym ECL (Amersham Biosciences; w piecu hybrydyzacyjnym, w temp. 42 °C przez 1h). Podczas inkubacji membrany przygotowywano sondy do znakowania. 10 µL produktu PCR (fragment *upstream* bądź *downstream* usuwanego genu (Roz. 3.2.28) wraz z 2 µL markera DNA (rozcieńczenie 1:800) poddawano denaturacji (5 min. w temp 100 °C). Następnie dodawano po 10 µL roztworów do znakowania sondy z zestawu ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling i inkubowano przez 10 min w 37°C. Tak przygotowaną sondę (30 µL) dodawano do tuby z membraną i ponownie inkubowano w piecu hybrydyzacyjnym, w temp. 42°C przez noc (hybrydyzacja). Następnego dnia przemywano membranę trzykrotnie przez 15 min buforem płuczącym w piecu hybrydyzacyjnym, w temp. 42°C, a następnie dwukrotnie roztworem 2xSSC w temp. pokojowej. Membranę inkubowano w roztworze do detekcji (Amersham Biosciences) przez 1 min, po czym w ciemni przykładano do niej kliszę fotograficzną i naświetlano przez 10-120 min. Film wywoływano w aparacie CAWOMAT 200 IR.

Odczynniki: SSC x 20: NaCl 3 M, cytrynian sodu 0,3 M; Roztwór A: HCl 0,25 M; Roztwór B: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5M; Roztwór C: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5M pH 8; Bufor płuczący: SSC x 20 0,5%, SDS 0,4%, mocznik 6M.

3.2.30 Przygotowanie kasety do komplementacji usuniętego genu

Komplementacje usuniętych genów przeprowadzano podczas stażu u prof. Morschhäusera na Uniwersytecie w Würzburgu.

Kasetę do komplementacji oczyszczano z otrzymanych plazmidów zawierających ponadto: gen *caFLP* kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP (będący pod kontrolą promotora *MAL2p*), gen oporności na nourseotrycynę (*SAT1*), sekwencję *FRT* czyli miejsce rozpoznania dla rekombinazy FLP (34 pz). Stosowano metodykę według schematu przedstawionego na Rys. 27.



Rys. 27 Schemat przygotowania kaset do komplementacji genów według metody SAT1-flipper



d) przygotowanie insertu - amplifikacja genu wraz z regionami *upstream* i *downstream* genu

Fragment DNA obejmujący gen wraz z regionami *upstream* i *downstream* (ok. 2,5 kbp), amplitowano na matrycy genomowego DNA *C. albicans* SC5314. Do reakcji PCR używano odpowiedniej pary starterów (Roz. 3.1.5) w zależności od usuwanego genu. Do sekwencji starterów wprowadzano miejsca rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych *SacI*, *SacII* niezbędne podczas klonowania do plazmidu p[nazwa genu]M1 np. pARO8M1. Reakcje PCR przeprowadzano w następujący sposób:

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Tab. 33 Skład mieszaniny reakcyjnej amplifikacji fragmentu DNA obejmującego gen wraz z regionami *upstream* i *downstream*

Woda jałowa miliQ	34,5 μ L
DNA <i>Candida albicans</i> SC5314 1:10	1 μ L
Starter lewy	1 μ L
Starter prawy	1 μ L
Polimeraza Phusion DNA	0,5 μ L
dNTP 5 mM	2 μ L
Bufor 5x HF	10 μ L
Razem	50 μ L

Profil temperaturowo-czasowy:

Tab. 34 Profil temperaturowo czasowy reakcji amplifikacji *upstream* i *downstream* badanych genów

Denaturacja wstępna	98 °C	120 s	x 30
Denaturacja	98 °C	20 s	
Przyłączenie starterów	55°C	20 s	
Elongacja	72 °C	120 s	
Elongacja	72 °C	300 s	
Chłodzenie	4 °C	∞	

Uzyskane produkty PCR rozdzielano na żelu agarozowym 1% i poddawano oczyszczaniu przy pomocy procedury z zestawu Macherey- Nagel Nucleo Spin Gel out and Clean up PCR kit.

e) przygotowanie plazmidu zawierającego kasetę do komplementacji

Uzyskany fragment obejmujący gen wraz z regionami *upstream* i *downstream* oraz odpowiedni plazmid p[nazwa genu]M1 poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi:

Tab. 35 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego substratów do konstrukcji kasety do komplementacji

	Para enzymów, 2 μ L	DNA (μ L)	Bufor NEB (μ L)	Woda (μ L)
PCR	<i>SacI</i> -HF/ <i>SacII</i>	43	5	0
p[nazwa genu]M1	<i>SacI</i> / <i>SacII</i>	15	5	28

Trawienie przeprowadzano w ciągu 3 h w 37°C. Następnie rozdzielano uzyskane produkty przy pomocy elektroforezy agarozowej w 0,8% żelu (30 cm) przez noc przy 1,2 V cm⁻¹.

Wycinano uzyskane produkty z żelu i oczyszczano przy pomocy procedury z zestawu GeneClean III kit firmy MP Biomedicals.

Plazmid zawierający kasetę do komplementacji konstruowano łącząc uzyskane fragmenty przy pomocy ligazy faga T4.

Skład mieszaniny ligacyjnej:

Tab. 36 Skład mieszaniny ligacyjnej do konstrukcji kasety do komplementacji

Woda jałowa miliQ	5 μ L
Plazmid	1 μ L
PCR	10 μ L
Bufor ligazy faga T4	2 μ L
ATP (10 mM)	1 μ L
Ligaza T4	1 μ L
Razem	20 μ L

Ligację przeprowadzano przez noc w 12°C.

Następnie przeprowadzano transformację mieszaniny ligacyjnej do komórek *E. coli* DH5 α (Roz. 3.2.3), izolowano uzyskane plazmidy (Roz. 3.2.4) i poddawano analizie restrykcyjnej (Roz. 3.2.7). Poprawność skonstruowanego plazmidu potwierdzano przy pomocy sekwencjonowania zleconego firmie zewnętrznej.

Prawidłowy plazmid nazywano według wzoru p[nazwa genu]K1 np. pARO8K1.

f) oczyszczanie kasety do komplementacji

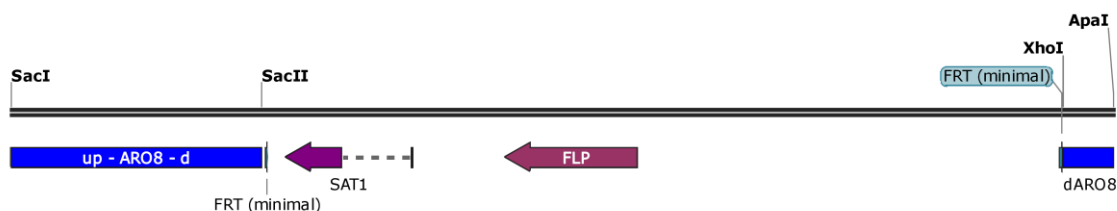
Plazmid zawierający kasetę do komplementacji poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi przez 1 h w 37°C:

Tab. 37 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego skonstruowanych plazmidów w celu izolacji do komplementacji

Woda jałowa miliQ	28 μ L
Plazmid	15 μ L
<i>Apa</i> I	1 μ L
<i>Sac</i> I	1 μ L
Bufor CutSmart	5 μ L
Razem	50 μ L

Uzyskane fragmenty DNA poddawano rozdzielni elektroforetycznej przez 3 h przy napięciu 6 V cm⁻¹. Wycinano z żelu uzyskany produkt i oczyszczano przy pomocy procedury z zestawu GeneClean III kit MP Biomedicals.

Tak uzyskaną kasetę nokautującą nazywano według wzoru [nazwa genu]K1 np. ARO8K1 (Rys. 28).



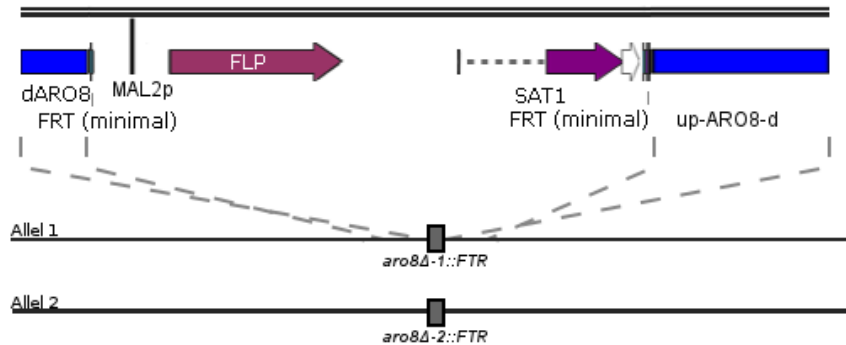
Rys. 28 Schemat kasety do komplementacji genu ARO8. *up-ARO8-d* – sekwencja przed genem ARO8 (ang. *upstream*), gen ARO8 i sekwencja za genem ARO8 (ang. *downstream*), *dARO8* – sekwencja za genem ARO8 (ang. *downstream*), *FLP* - gen kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę, *SAT1* - gen oporności na nourseotrycynę, *FTR* miejsce rozpoznania dla rekombinazy FLP

3.2.31 Komplementacja genu

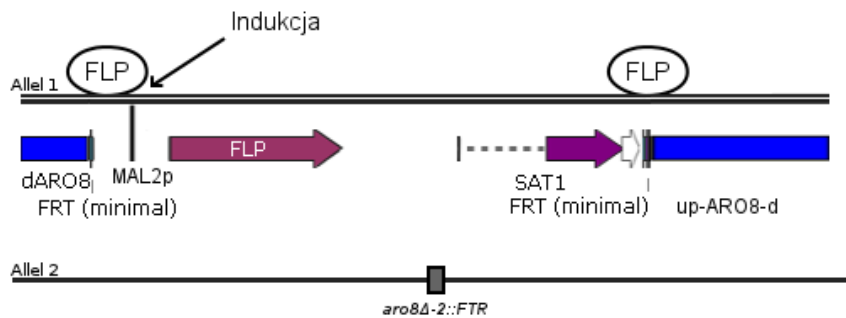
Uzyskaną kasetę do komplementacji (Roz. 3.2.30) transformowano do elektrokompetentnych zmutowanych komórek *C. albicans* SC5314 (z usuniętymi genami). W komórkach dochodziło do spontanicznej rekombinacji homologicznej (podwójny crossing-over) między fragmentami *upstream* i *downstream*, znajdującymi się w obrębie fragmentu *FTR*,

a komplementarnymi do nich sekwencjami w kasecie do komplementacji (Rys. 29). W wyniku rekombinacji następowała wymiana fragmentu *upstream* - *FTR* - *downstream* na odpowiednią kasetę do komplementacji. Kasetę do komplementacji zawiera gen *SAT1* oporności na nourseotrycynę (Nou), dzięki czemu możliwa była selekcja transformantów, u których zaszła integracja kasety do komplementacji w jednym z alleli. Po transformacji mutanty wysiewano na podłoże stałe YEPG z nourseotrycyną ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Po 1 dniu hodowli w temp. 30 C obserwowano wzrost transformantów opornych na antybiotyku (NouR).

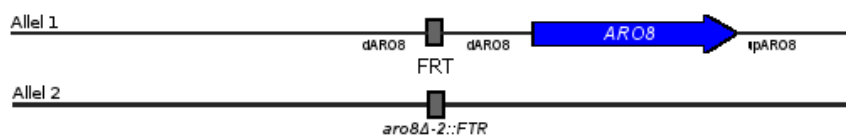
A) Rekombinacja homologiczna (integracja kasety w miejsce *aro8Δ-1::FTR*)



B) Indukcja promotora MAL2p. Ekspresja genu FLP.



C) Wycięcie kasety przez rekombinazę.



Rys. 29 Schemat przedstawiający kolejne etapy postępowania prowadzące do komplementacji genu *ARO8* w genomie zmutowanego szczepu *C. albicans Δaro8* z wykorzystaniem metody *SAT1*-flipper. A) Rekombinacja homologiczna prowadząca do fragmentów *upstream* i *downstream* genu *ARO8* na kasetę do komplementacji; B) Indukcja ekspresji genu kodującego miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP; C) Fragment genomu szczepu *CaARO8K2* z wprowadzonym ponownie genem *ARO8* na jednym allelu, mutant heterozygotyczny (*ARO8-1/aro8Δ-2::FTR*)

d) transformacja kasety do komplementacji do komórek grzybowych

Transformacja kasety do komplementacji przebiegała identycznie jak transformacja kasety nokautującej do komórek grzybowych (Roz. 3.2.28).

e) analiza poprawności skonstruowanych mutantów

Analiza poprawności skonstruowanych mutantów przebiegała identycznie jak dla mutantów z usuniętymi genami kodującymi α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowe.

f) usunięcie kasety SAT1-FLP kasety do komplementacji z poprawnie skonstruowanych mutantów

Usunięcie kasety SAT1-FLP z poprawnie skonstruowanych mutantów przebiegało identycznie jak dla kasety nokautującej.

3.2.32 Hodowla grzybowa w podłożu minimalnym z różnym źródłem azotu, z inhibitorami aminotransferaz oraz związkami wskazującymi na defekt komórek mutantów

a) podłoże płynne

Hodowlę grzybową (Roz. 3.2.1) przemywano dwukrotnie sterylną wodą destylowaną i zawieszano (uzyskując gęstość $2 \cdot 10^5$ komórek mL^{-1}) w pożywce minimalnej YNB z dodatkiem 10 mM aminokwasu lub 5 mM kwasu L- α -aminoadypinowego czy 0,25% siarczanu amonu. Badając wpływ inhibitorów aminotransferaz na szybkość wzrostu szczepów do podłoża dodawano dodatkowo inhibitor uzyskując stężenie 10 mM. Pomiar szybkość wzrostu wykonywano spektrofotometrycznie przy pomocy czytnika mikroplitek Victor³V PerkinElmer przy 531 nm w 30°C przez 48 h.

b) podłoże stałe

Hodowlę grzybową (Roz. 3.2.1) przemywano dwukrotnie sterylną wodą destylowaną i wykonywano seryjne 10-krotne rozcieńczenia zawiesiny komórek od gęstości 10^7 komórek mL^{-1} do 10^2 komórek mL^{-1} w wodzie w płytce 96 dołkowej. Zanurzano sterylny replikator w tak przygotowanych zawiesinach komórkowych i wykonywano posiew na płytkach z podłożem minimalnym YNB z różnym źródłem azotu (10 mM) oraz na podłożu YEPG z dodatkiem barwników anionowych (5 mg mL^{-1}). Płytki inkubowano w 30°C przez 48 h.

3.2.33 Badanie zdolności wytwarzania biofilmu

Do badania zdolności wytwarzania biofilmu wykorzystano metodę redukcji XTT (2, 3-bis [2-metoksy - 4 - nitro - 5 - sulfofenilo] - 5 - [(fenyloamino)karbonylo] - 2H -tetrazolo hydroksyd). Hodowlę grzybową (Roz. 3.2.1) rozcieńczano w sterylnej wodzie destylowanej do gęstości 10^6 komórek mL^{-1} i dodawano w stosunku 1:1 do podwójnie stężonego podłoża RPMI. Zawiesinę komórkową inkubowano na płytkach 96-dołkowych przez 24 h w 37°C. Wytworzony biofilm przemywano dwukrotnie buforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) w celu usunięcia komórek nie tworzących biofilmu. Dalej postępowano zgodnie z wytycznymi metody [Pierce i in. 2008]. Grubość utworzonego biofilmu oceniana była spektrofotometrycznie przy 490 nm z użyciem czytnika mikroplitek Victor³V PerkinElmer.

Odczynniki: PBS, tabletki do rozpuszczania w wodzie destylowanej firmy Sigma.

3.2.34 *Indukcja transformacji morfologicznej*

Hodowlę grzybową (Roz. 3.2.1) przemywano dwukrotnie sterylną wodą destylowaną i zawieszano w wodzie uzyskując gęstość 10^2 komórek mL^{-1} . Wysiewano po 100 μL tak przygotowanej zawiesiny komórkowej na podłoże stałe Spider, SLAD i YEPG z 10 % v/v płodową surowicą bydlęcą (FBS). Płytki inkubowano przez 7 dni w 37°C .

4 OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1 Identyfikacja genów kodujących białka o przypuszczalnej aktywności AmAA w genomie *C. albicans*

Przeprowadzono analizę bioinformatyczną genomu *Candida albicans*. Zidentyfikowano pięć genów: *ARO8 orf19.2098/orf19.9645*, *ARO9 orf19.1237/orf19.8822*, *YER152C orf19.1180/orf19.8771* oraz *BNA3* (występujący w dwóch kopiach: *BNA31 orf19.5809/orf19.13231* i *BNA32 orf19.1589.1*) (*Candida* Genome Database, <http://www.candidagenome.org/> [Skrzypek i in. 2011]), których sekwencje nukleotydowe wykazują wysokie podobieństwo do sekwencji nukleotydowej kodującej białko ScAro8p z *S. cerevisiae* o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej (Rys. 31, Tab. 39). Fakt, że istnieją dwie kopie genu kodujące białko Bna3p (CaBna3p) w genomie *C. albicans* może sugerować istotną rolę tego enzymu w komórce. Interesująca jest również informacja, że gen *BNA3* można odnaleźć w genomach drożdży, w których nie występują inne enzymy (Bna1p, Bna2p, Bna4p, Bna5p i Bna6p) ze szlaku kwasu kinurenowego [Li and Bao 2007]. Natomiast gen *YER152C* jest silnie zakonserwowany w genomach komórek drożdży, a w *K. thermotolerans* występuje aż w dwóch kopiach, co również sugeruje, że enzym ten pełni ważną rolę w metabolizmie komórki [Hébert i in. 2011].

Sekwencje aminokwasowe produktów zidentyfikowanych genów

Wykorzystując programy bioinformatyczne Szwedzkiego Instytutu Bioinformatyki [Artimo i in. 2012] oraz sekwencje nukleotydowe zidentyfikowanych genów, uzyskano sekwencje aminokwasowe oraz teoretyczne dane charakteryzujące kodowane białka (Tab. 38). Uzyskane dane (masa molekularna pojedynczej podjednostki) umożliwiły wstępną identyfikację pasm odpowiadających tym białkom w analizie SDS-PAGE.

Tab. 38 Zestawienie teoretycznych danych uzyskanych na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych badanych białek. Programy: Translate i ProtParam [Artimo i in. 2012]

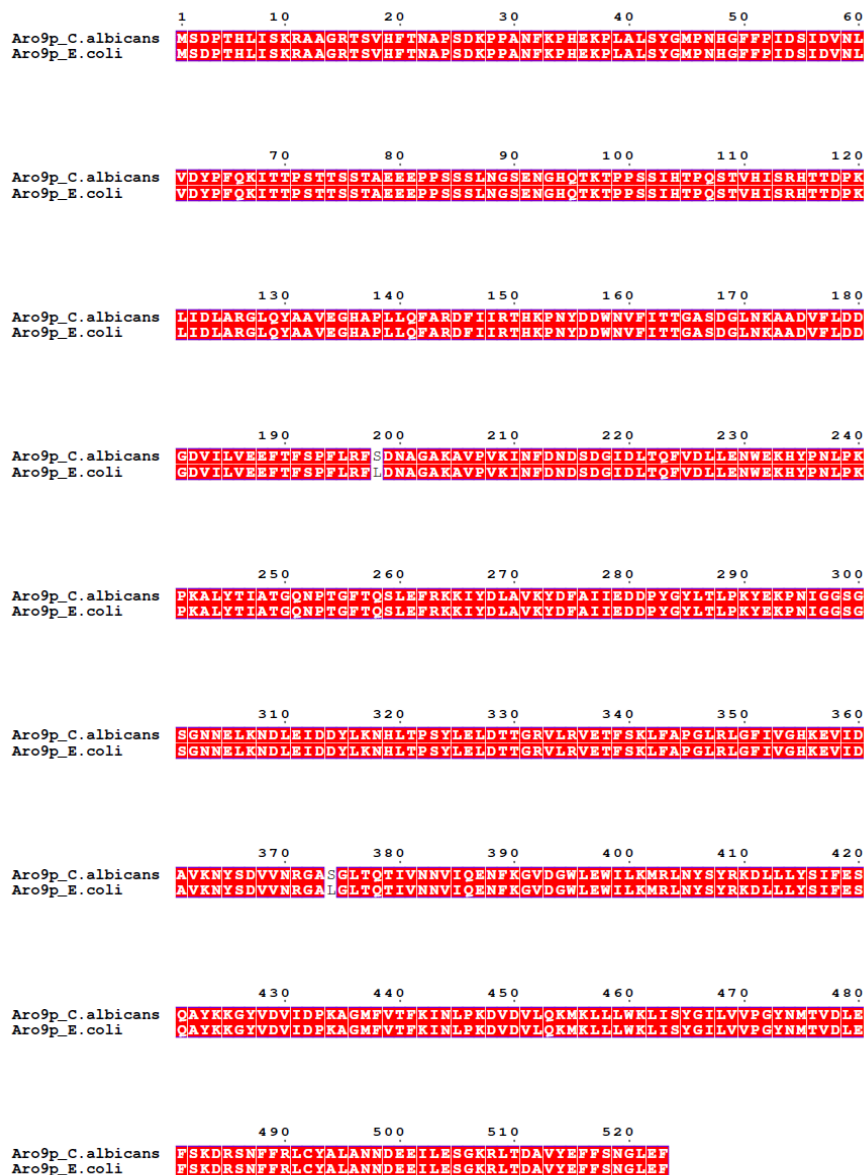
Nazwa białka	Liczba nukleotydów	Liczba aminokwasów	Punkt izoelektryczny	Masa molekularna
CaAro8p	1476 pz	491	5,34	54,7 kDa
CaAro9p	1572 pz	523	5,45	58,8 kDa
CaYer12Cp	1248 pz	415	5,4	46,5 kDa
CaBna3p	1362 pz	453	5,5	51,3 kDa

Porównano sekwencje aminokwasowe białek CaBna31p i CaBna32p. Wykazano, że sekwencje tych białek różnią się jedną resztą aminokwasową w pozycji 308 (Phe308 lub Trp308). Analiza bioinformatyczna porównania sekwencji aminokwasowej białek CaBna31p i CaBna32p do sekwencji AmAA z innych organizmów wykazała jednak, że reszta w pozycji 308 prawdopodobnie nie pełni ważnej roli w aktywności katalitycznej enzymu.

Jak wiadomo, kodon CUG, który w uniwersalnym kodzie genetycznym koduje leucynę, w komórkach praktycznie wszystkich gatunków *Candida* (za wyjątkiem *C. glabrata* i *C. krusei*) należących do tzw. kłady *Candida*, jest rozpoznawany przez unikalny tRNA_{CUG}^{SER} i w efekcie koduje serynę [Butler i in. 2009; Santos i Tuite 1995]. Biorąc pod uwagę fakt, że zakładano heterologiczną ekspresję zidentyfikowanych genów w komórkach *E. coli*, przeanalizowano sekwencje nukleotydowe genów w celu identyfikacji miejsc występowania kodonów CUG

i korekty sekwencji aminokwasowych ich produktów poprzez zamianę Ser na Leu (program Translate [Artimo i in. 2012]). Miejsca takie wykryto w sekwencjach CaAro9p i CaBna3p (Rys. 30).

A)



Rys. 30 Porównanie sekwencji aminokwasowej (aa) białek CaAro9p (A) i CaBna3p (B) po translacji w komórkach *E. coli* i *C. albicans*. Uwidoczniono różnice w sekwencji aa białka CaAro9p gdzie w miejscu Ser198 i Ser374 znajduje się Leu198 i Leu374, natomiast w sekwencji aa białka CaBna3p w miejscu Ser371 znajduje się Leu371. Programy: Translate [Artimo i in. 2012], Clustal Omega [Sievers i in. 2011] oraz ESPrit [Robert i Gouet 2014]

B)

	1	10	20	30	40	50	60
Bna3p_C.albicans	MLRRLLFPIRQLYTTTRAMASKSTDPTSLHNPYFYQKPGQKDIWSLINEATAAQAQQLSSEGP						
Bna3p_E.coli	MLRRLLFPIRQLYTTTRAMASKSTDPTSLHNPYFYQKPGQKDIWSLINEATAAQAQQLSSEGP						
	70	80	90	100	110	120	
Bna3p_C.albicans	IVNLGGGFFSYNPPEFAINAVEEALTKPQFNQYAHARGNPNLLKQVAEEHYSRSYGRAVGV						
Bna3p_E.coli	IVNLGGGFFSYNPPEFAINAVEEALTKPQFNQYAHARGNPNLLKQVAEEHYSRSYGRAVGV						
	130	140	150	160	170	180	
Bna3p_C.albicans	DEVQITTGANEGMFAIFFAFLTPGDEVIVFEPFFDQYIPNVEMTGAKIKYVEIKYPKKFD						
Bna3p_E.coli	DEVQITTGANEGMFAIFFAFLTPGDEVIVFEPFFDQYIPNVEMTGAKIKYVEIKYPKKFD						
	190	200	210	220	230	240	
Bna3p_C.albicans	NEVVTGQDWEIDWEGLNNAITDKTKIIVINTPHNPIGKVFTEELLYKIGKLAVEHNLILV						
Bna3p_E.coli	NEVVTGQDWEIDWEGLNNAITDKTKIIVINTPHNPIGKVFTEELLYKIGKLAVEHNLILV						
	250	260	270	280	290	300	
Bna3p_C.albicans	SDEVYENLYYTDKFFRPAALPQLPELAERTLTVGSAGKSFAATGWRVGYIQGPANLIKRFV						
Bna3p_E.coli	SDEVYENLYYTDKFFRPAALPQLPELAERTLTVGSAGKSFAATGWRVGYIQGPANLIKRFV						
	310	320	330	340	350	360	
Bna3p_C.albicans	TAAHTRICFSTPAPLQQAQVSGGFEOAEKSNYFENTRKEEYEHKYLIFTKVFDLGLPYTVA						
Bna3p_E.coli	TAAHTRICFSTPAPLQQAQVSGGFEOAEKSNYFENTRKEEYEHKYLIFTKVFDLGLPYTVA						
	370	380	390	400	410	420	
Bna3p_C.albicans	EGGYFVLVNLISKVKIPADYEFPGTISDRGTLDFKLAAYWLIKREIGVVGIPPTFPLTEWNRK						
Bna3p_E.coli	EGGYFVLVNLISKVKIPADYEFPGTISDRGTLDFKLAAYWLIKREIGVVGIPPTFPLTEWNRK						
	430	440	450				
Bna3p_C.albicans	GNLENCVRFVAVCKDDSVLEDAVERLKKLKDYL						
Bna3p_E.coli	GNLENCVRFVAVCKDDSVLEDAVERLKKLKDYL						

Porównanie sekwencji aa znanych α -aminotransferaz L- α -aminoadypinowych

Wykonano porównanie sekwencji aminokwasowych analizowanych białek (program: NCBI BLAST alignment [Altschul i in. 1990]), aby określić stopień podobieństwa do sekwencji białek o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej z innych organizmów (Tab. 39). Sekwencje białek CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp są homologiczne z sekwencjami większości analizowanych AmAA (identyczność $\geq 25\%$). Białko CaBna3p jest homologiczne z ScBna3p (54% identyczności) i ScAro9p 32%). Identyczność sekwencji CaBna3p wynosząca 23% w stosunku do ScAro8p i ScYer152Cp nie wskazuje jednoznacznie czy uzyskany wynik jest statystycznie istotny.

```

1          10          20          30          40          50
CaAro8p_C.albicans  MTSDTKPKQAKDLTHLLSNESKARQTSPLK...GIFKYYKOPGCTIFLGGGLPLGDFP
CaAro9p_C.albicans  ....MSDPTHLSKRAAGRTSVHFTNAPSDKFFANFKPHEKFLALSYGMPNIGFP
CaBna31p_C.albicans  ....MLRRLP
CaBna32p_C.albicans  ....MLRRLP
CaYer152p_C.albicans  ....MINFKGHPTRELE
ScAro8p_S.cerevisiae  ...MTLPESKDFSYLPSDFTNARKPSPLK...TCIHLFQDPNITFLGGGLPLGDFP

60          70
CaAro8p_C.albicans  FEKVTADI.....PTPSFGGIGIA....FI...EG
CaAro9p_C.albicans  IMAGARAVVVKINFDMSDGDIDLTQVDFLLEWNEK...HYFNLPK...STTSSTAE...PPSSSLNGSENC
CaBna31p_C.albicans  IRQLYTTTRAMASKSTDPTSLHNPYFYQKPGQKDIWLSLINETAAQAQOQESGEPVIVNLGGQ
CaBna32p_C.albicans  IRQLYTTTRAMASKSTDPTSLHNPYFYQKPGQKDIWLSLINETAAQAQOQESGEPVIVNLGGQ
CaYer152p_C.albicans  VNEIADSYKRVLL.....PQGGIGIA....FI...DE
ScAro8p_S.cerevisiae  WDNLSVDS.....PKPFPQGGIGIA....FI...DE

90          100         110         120
CaAro8p_C.albicans  .FNKT...TIEVFKK...AADNVFD...ELARS...GSTF...P...F...L...K...H...D...M...V...H...K...V
CaAro9p_C.albicans  HQKRTFP...HTFQSTVHISRHTTDFK...IDLRNG...Y...G...Y...A...R...G...F...L...Q...A...P...I...R...T...K...F
CaBna31p_C.albicans  FFSYNPPE...F...AINAVEEA...LTKPQFN...OYAHAR...NPN...L...K...Q...V...A...H...Y...S...R...S...Y...G...R
CaBna32p_C.albicans  FFSYNPPE...F...AINAVEEA...LTKPQFN...OYAHAR...NPN...L...K...Q...V...A...H...Y...S...R...S...Y...G...R
CaYer152p_C.albicans  ...DSDYLSYDT...D...PNNQHP...OYGTDP...NLDVYREV...TAQVWNKFKFGA
ScAro8p_S.cerevisiae  .QNCI...KYTVNKDYADKSNPNSND...PLSRAL...Y...G...F...S...A...C...P...E...L...I...N...F...L...R...D...H...T...K...I...H...D...L

130         140         150         160         170
CaAro8p_C.albicans  PYENWD...V...V...S...G...N...EAWDSTLRT...C...S...K...G...D...T...L...V...E...E...Y...T...S...S...A...D...E...S...A
CaAro9p_C.albicans  NYDDDW...V...T...L...R...K...K...V...Y...V...F...N...L...K...V...L...V...E...E...Y...T...S...S...A...D...E...S...A
CaBna31p_C.albicans  AVGVDE...V...O...I...T...C...A...N...E...G...M...F...A...I...F...F...A...L...T...P...G...D...E...V...I...V...E...F...E...F...D...O...Y...I...P...N...V
CaBna32p_C.albicans  AVGVDE...V...O...I...T...C...A...N...E...G...M...F...A...I...F...F...A...L...T...P...G...D...E...V...I...V...E...F...E...F...D...O...Y...I...P...N...V
CaYer152p_C.albicans  QVSDPNC...N...L...T...A...C...A...S...Y...G...V...G...N...I...L...T...S...V...T...S...P...K...I...T...Q...R...V...V...T...P...T...Y...F...L...I...N...S...C...F...V...D...G...L...D...D...R...L...T...A...I
ScAro8p_S.cerevisiae  KYKDWD...V...L...A...T...A...G...N...A...W...E...S...T...L...R...V...C...N...R...G...D...V...I...L...V...E...A...H...S...S...A...D...E...S...A

180         190         200         210
CaAro8p_C.albicans  NGCGVNTVFVT...DEFGIIPERKLEBELMSRWV...GN...K...PKFFIYT
CaAro9p_C.albicans  ...DEFGIIPERKLEBELMSRWV...GN...K...PKFFIYT
CaBna31p_C.albicans  HMTGARIKYVE...KYPKPFNEVVT...GODWEIDWEG...LNNAITD...KTKIIV
CaBna32p_C.albicans  HMTGARIKYVE...KYPKPFNEVVT...GODWEIDWEG...LNNAITD...KTKIIV
CaYer152p_C.albicans  BETHNGKYSID...VYLL...EQLOKYSQDLPEVHDDINVFPPVVRGTRRYRYFVMYL
ScAro8p_S.cerevisiae  BAQGVITFFVPI...DADGIIPERKLAQVMEN...PGAPK...PKLIYT

220         230         240         250         260
CaAro8p_C.albicans  I...C...G...C...N...P...T...S...S...L...S...A...E...R...R...K...Q...T...Y...D...T...A...C...K...Y...D...F...L...I...V...E...D...E...F...Y...Y...F...L...Q...M...E...T...Y...T...K...D...K...A...A...R...E...G...K...A...V
CaAro9p_C.albicans  I...C...G...C...N...P...T...S...S...L...S...A...E...R...R...K...Q...T...Y...D...T...A...C...K...Y...D...F...L...I...V...E...D...E...F...Y...Y...F...L...Q...M...E...T...Y...T...K...D...K...A...A...R...E...G...K...A...V
CaBna31p_C.albicans  I...N...T...P...H...N...P...I...K...V...T...E...L...Y...K...I...G...K...L...A...V...E...H...N...L...I...L...V...S...D...V...E...N...T...Y...Y...T...D...R...F...P...P...A...
CaBna32p_C.albicans  I...N...T...P...H...N...P...I...K...V...T...E...L...Y...K...I...G...K...L...A...V...E...H...N...L...I...L...V...S...D...V...E...N...T...Y...Y...T...D...R...F...P...P...A...
CaYer152p_C.albicans  I...P...A...F...N...P...G...L...N...Y...T...L...E...T...R...Q...L...V...E...I...A...R...K...Y...D...L...L...S...D...V...E...Y...L...D...Y...T...D...S...K...P...L...
ScAro8p_S.cerevisiae  I...P...A...F...N...P...G...L...N...Y...T...L...E...T...R...Q...L...V...E...I...A...R...K...Y...D...L...L...S...D...V...E...Y...L...D...Y...T...D...S...K...P...L...

270         280         290         300         310
CaAro8p_C.albicans  ...HDH.DEFLKALVPSFISL...DVEGRVVRVLDVDFSKV...V...I...A...G...L...R...G...W...I...V...G...Q...D...L...L...E
CaAro9p_C.albicans  RNDLEIDDDYLNKHLTPSYLEL...DITGRVVRVLRVDFSKV...L...F...A...G...L...R...G...W...I...V...G...Q...D...L...L...E
CaBna31p_C.albicans  DL...L...P...L...P...L...E...L...A...E...R...T...L...V...G...S...A...C...K...S...F...A...A...G...W...I...V...G...Q...D...L...L...E
CaBna32p_C.albicans  DL...L...P...L...P...L...E...L...A...E...R...T...L...V...G...S...A...C...K...S...F...A...A...G...W...I...V...G...Q...D...L...L...E
CaYer152p_C.albicans  ...RLNOLDKAGATKYGNITSNATFSK...I...A...G...L...R...G...W...I...V...G...Q...D...L...L...E
ScAro8p_S.cerevisiae  ...QPH.DEFLKSLANLFLSL...DTEGRVVRVLRVDFSKV...V...I...A...G...L...R...G...W...I...V...G...Q...D...L...L...E

320         330         340         350         360         370
CaAro8p_C.albicans  RYVR...H...E...V...S...V...Q...N...P...S...G...L...S...E...A...I...A...N...A...L...L...R...K...W...H...S...G...Y...L...D...W...L...I...G...L...R...A...E...V...T...H...R...D...V...I...D...A...I...D...A...L...D
CaAro9p_C.albicans  AVKNN...S...D...V...V...N...R...G...A...S...G...L...T...Q...T...I...V...N...V...I...Q...E...N...F...K...G...V...D...G...W...L...E...W...I...L...K...M...R...L...N...K...Y...S...R...D...L...L...Y...S...F...I
CaBna31p_C.albicans  FVTA...H...T...R...I...C...S...T...A...P...L...Q...O...A...V...S...Q...G...F...E...O...A...E...K...S...N...Y...F...E...N...T...R...K...E...Y...H...K...Y...I...P...T...K...V...E...D
CaBna32p_C.albicans  FVTA...H...T...R...I...C...S...T...A...P...L...Q...O...A...V...S...Q...G...F...E...O...A...E...K...S...N...Y...F...E...N...T...R...K...E...Y...H...K...Y...I...P...T...K...V...E...D
CaYer152p_C.albicans  DQLS...T...G...S...N...R...S...G...G...T...N...O...L...S...T...L...V...V...A...D...L...I...K...T...G...T...I...D...I...I...A...K...F...K...N...V...K...E...R...V...A...V...L...K...E...S...I...A
ScAro8p_S.cerevisiae  P...Y...L...S...L...H...E...M...T...I...Q...A...F...A...G...F...T...Q...V...I...V...N...A...T...L...S...R...W...G...Q...R...G...Y...L...D...W...L...L...G...L...R...H...E...V...T...L...K...R...D...G...I...D...A...I...L...Y

380         390         400         410         420
CaAro8p_C.albicans  QFVP...K...E...V...S...S...F...N...P...V...A...C...M...F...T...V...T...I...D...A...S...K...H...P...K...Y...K...E...F...L...E...D...P...L...K...V...E...A...V...H...E...Q...A...I...K...O...I...C
CaAro9p_C.albicans  EQQAYKKKGVDVVDIPKACMFTVTKINL...PKDVD...VLQKMKLLWLLKLSYGI
CaBna31p_C.albicans  DL...G...L...P...Y...T...V...A...E...G...C...V...L...V...N...S...K...V...I...P...A...D...Y...E...P...P...G...T...I...S...R...G...I...D...F...K...L...A...Y...W...L...R...E...I...V
CaBna32p_C.albicans  DL...G...L...P...Y...T...V...A...E...G...C...V...L...V...N...S...K...V...I...P...A...D...Y...E...P...P...G...T...I...S...R...G...I...D...F...K...L...A...Y...W...L...R...E...I...V
CaYer152p_C.albicans  KYLP...Q...D...T...O...V...Y...G...D...G...C...V...V...V...V...T...P...S...A...N...C...F...D...V...V...A...K...A...K...O...N...V
ScAro8p_S.cerevisiae  KYLP...Q...S...D...A...F...V...I...N...P...I...A...C...M...F...T...V...T...I...D...A...S...V...H...P...E...F...K...T...K...Y...N...S...D...P...Y...Q...L...E...Q...S...L...Y...H...K...V...V...E...R...G...V

430         440         450         460         470         480
CaAro8p_C.albicans  I...L...A...P...G...S...W...F...K...A...G...Q...S...S...P...P...Q...K...N...L...P...A...N...P...S...H...K...T...H...T...F...R...G...T...Y...A...A...V...L...D...Q...V...V...G...L...E...R...F...G...R...A...V...R...A...E
CaAro9p_C.albicans  I...L...V...P...G...Y...N...M...T...V...D...L...F...S...K...D...R...S...N...F...R...L...C...Y...A...L...A...N...N...D...E...L...E...S...G...K...R...L...T...D...A...V...Y...E...F
CaBna31p_C.albicans  V...G...I...P...P...T...E...L...T...W...N...R...K...G...L...N...G...L...E...N...C...V...R...F...A...V...C...K...D...D...S...V...L...D...A...V...E...R...L...K...K...L...K...Y...L...E...I...V
CaBna32p_C.albicans  V...G...I...P...P...T...E...L...T...W...N...R...K...G...L...N...G...L...E...N...C...V...R...F...A...V...C...K...D...D...S...V...L...D...A...V...E...R...L...K...K...L...K...Y...L...E...I...V
CaYer152p_C.albicans  V...L...A...G...C...H...F...E...V...T...G...D...K...R...N...G...O...H...C...V...R...L...S...I...S...Y...L...T...P...E...R...Q...O...C...I...K...K...W...G...E...L...L...E
ScAro8p_S.cerevisiae  I...V...V...P...G...S...W...F...K...S...E...T...E...P...P...Q...A...E...S...K...E...V...S...N...P...N...I...F...R...G...T...Y...A...A...V...S...P...E...R...I...T...E...K...L...G...D...L...Y...E...E

490
CaAro8p_C.albicans  FGL...
CaAro9p_C.albicans  FSNGLF...
CaBna31p_C.albicans  ...
CaBna32p_C.albicans  ...
CaYer152p_C.albicans  ...
ScAro8p_S.cerevisiae  FGISK...

```

Rys. 31 Porównanie sekwencji aminokwasowej (aa) białek CaAro8p, CaAro9p, CaBna3p, CaYer152Cp z sekwencją aa białka ScAro8p. Zakonserwowane reszty zaznaczono jako białe litery na czerwonym tle, podobne reszty aminokwasowe zaznaczono na czerwono, czarną ramką zaznaczono różnicę w sekwencji aa CaBna31p i CaBna32p. Zastosowano programy ClustalW [Larkin i in. 2007] i ESPrift [Robert & Gouet 2014] do wygenerowania porównania

Tab. 39 Wykaz stopnia podobieństwa i identyczności pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp, CaBna3p a sekwencjami aa AmAA z *S. cerevisiae* i *Homo sapiens* (w przypadku ludzkiej AmAA porównanie dotyczy α -aminotransferazy L-kinureninowej/L- α -aminoadypinowej).

Program: NCBI BLAST alignment [Altschul i in. 1990]

Białko z <i>C. albicans</i>	Parametr	ScAro8p	ScAro9p	ScYer152Cp	ScBna3p	hKATIIp
	Białko					
CaAro8p	Podobieństwo	70%	52%	45%	39%	50%
	Identyczność	53%	31%	29%	23%	29%
CaAro9p	Podobieństwo	49%	55%	42%	41%	48%
	Identyczność	33%	36%	28%	23%	29%
CaYer152Cp	Podobieństwo	45%	45%	64%	45%	45%
	Identyczność	25%	28%	45%	25%	25%
CaBna3p	Podobieństwo	36%	46%	42%	69%	44%
	Identyczność	23%	32%	23%	54%	24%

Szczegółowa analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych białek CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp i CaBna3p z sekwencjami białek o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej z różnych organizmów znajduje się w załączniku 1 (Rys. 67; w porównaniach wykorzystano programy: Clustal Omega [Sievers i in. 2011] oraz ESPrit [Robert i Gouet 2014]). Zaznaczono zakonserwowane regiony oraz reszty zaangażowane w tworzenie centrum aktywnego enzymu.

Analiza reszt aa tworzących centrum aktywne enzymu

W Tab. 40 zestawiono istotne reszty aminokwasowe, które prawdopodobnie biorą udział w reakcji katalitycznej badanych enzymów. Wybrano 8 reszt aminokwasowych (Arg20, Gly39', Tyr74', Tyr142, Val199, Asn202, Lys263, Arg399), które biorą udział w wiązaniu substratów i PLP w ludzkim enzymie hKATIIp i porównano z sekwencjami analizowanych białek.

Tab. 40 Porównanie reszt aminokwasowych badanych enzymów z resztami tworzącymi centrum katalityczne białek o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Program: Clustal Omega [Sievers i in. 2011]

Nazwa białka	CaAro8p	CaAro9p	CaYer152Cp	CaBna3p	ScAro8p	ScBna3p	hKATIIp	TfLysNp
Reszty aa	Lys29	Lys27	-	His29	Lys26	Ala22	Arg20	Arg23
	Gly46'	Gly44'	Gly7'	Gly58'	Gly43'	Gly62'	Gly39'	Gly40'
	Tyr105'	Tyr130'	Tyr47'	Tyr93'	Tyr105'	Tyr88'	Tyr74'	Tyr70'
	Phe166	Phe192	Leu123	Phe154	Phe166	Phe149	Tyr142	Tyr125
	Ile213	Ile247	Val184	Ile209	Ile215	Ile204	Val199	Ile169
	Asn218	Asn252	Asn189	Asn214	Asn220	Asn125	Asn202	Asn174
	Lys300	Lys341	Lys256	Lys278	Lys305	Lys271	Lys263	Lys238
	Arg463	Arg490	Arg392	Ala431	Arg470	Arg420	Arg399	Arg245

α -Aminotransferazy L- α -aminoadypinowe charakteryzują się zdolnością do katalizowania reakcji z wykorzystaniem różnorodnych substratów [Han i in. 2008a; Iraqui i in. 1998; Karsten i in. 2011; Miyazaki i in. 2004; Passera i in. 2011]. Analizując strukturę uzyskanego krystalicznego białka hKATIIp ze związaną kinureniną [Han i in. 2008b], wytypowano 8 reszt aminokwasowych tworzących centrum aktywne enzymu. Grupa badawcza Karsten zasugerowała, że analogiczne reszty mogą być wykorzystywane przez enzym ScAro8p w wiązaniu kwasu L- α -aminoadypinowego [Karsten i in. 2011], natomiast dane uzyskane dla krystalicznego białka ScAro8p potwierdziły, że reszty Gly43', Asn220, Arg470 i Tyr105' są odpowiedzialne za wiązanie różnorodnych substratów [Bulfer i in. 2013]. Analogiczne reszty aminokwasowe są zakonserwowane w każdej analizowanej aminotransferazie (zostały wyróżnione pismem pochylonym w Tab. 40) a z danych literaturowych wynika, że reszty Gly, Asn, Arg i Tyr biorą udział

w reakcji katalitycznej w białkach T β LysNp, hKATIIP oraz w wołowej α -aminotransferazie L- α -aminoadypinowej [Han i in. 2008b; Ouchi i in. 2009; Tomita i in. 2009]. Ponadto w każdej analizowanej aminotransferazie zakonserwowana jest reszta lizynowa. W ScAro8p α -aminowa grupa z Lys305 bierze udział w wiązaniu PLP (tworzy zasadę Schiffa) [Bulfer i in. 2013]. Natomiast podobieństwo strukturalne białek z *C. albicans* do ScAro8p sugerować może, że PLP będzie w nich wiązane w analogiczny sposób.

Trzy pozostałe reszty aminokwasowe (z omawianych 8 reszt tworzących centrum aktywne enzymu) w CaAro8p, CaAro9p i CaBna3p zostały zastąpione aminokwasami podobnymi. W miejscu Arg20, Tyr142 i Val199 z hKATIIP w CaAro8p znajdują się Lys29, Phe166 i Ile213 natomiast w CaAro9p obecne są Lys27, Phe192 i Ile247. Jak wspomniano wcześniej (Roz. 2.4, Struktura przestrzenna AmAA), substytucja Arg20 z hKATIIP/ Arg23 z T β LysNp na lizynę może mieć kluczowe znaczenie dla powinowactwa tych białek do różnych substratów [Bulfer i in. 2013; Ouchi i in. 2009]. Arg20 z hKATIIP bierze udział w oddziaływaniach kation- π z kinureniną [Han i in. 2008b]. W wyniku badań opisanych w dalszej części tej rozprawy potwierdzono, że obecność Lys29 w sekwencji białka CaAro8p w miejscu Arg20, nie ma aż tak kluczowego wpływu na wiązanie kinureny (białko z *C. albicans* jest w stanie katalizować reakcję kinureninowej aminotransferazy (Roz. 4.3.6)). Wiadomo również, że ScBna3p wykazuje powinowactwo do kinureny, a w miejscu Arg20 posiada Ala22 [Wogulis i in 2008].

Kolejną różnicą w centrach aktywnych enzymów jest obecność fenyloalaniny lub izoleucyny w białkach z *C. albicans* w miejscu Tyr142 z hKATIIP. Tyr142 w hKATIIP bierze udział w wiązaniu PLP, jednak bardziej powszechnymi resztami aminokwasowymi w aminotransferazach wykazujących taką funkcję są Phe i Trp [Rossi i in. 2008a]. Dla przykładu fenyloalanina w miejscu Tyr142 obecna jest również w ScAro8p, hKATIIP oraz AmAA z *Mus musculus* [Rząd i Gabriel 2015].

Ostatnią zaobserwowaną różnicą jest obecność izoleucyny w miejscu Val199 z hKATIIP. Ze względu na podobieństwo strukturalne tych aminokwasów, ta substytucja nie ma większego wpływu na zdolności katalityczne omawianych aminotransferaz.

Analiza sekwencji aa pod kątem obecności charakterystycznych domen katalitycznych

Wykonano również analizę sekwencji aminokwasowej badanych białek przy pomocy programu InterPro Scan [Jones i in. 2014] pod kątem obecności charakterystycznych domen. Każde z analizowanych białek posiada:

- domenę aminotransferaz klasy I i II. Do tej klasy należą m.in. aminotransferazy asparaginowe, aromatyczne aminotransferazy, glutaminowe i kinureninowe aminotransferazy, PLP zależne dekarboksylazy,
- domenę wiążącą PLP, składającą się z subdomeny I i II. Domena ta posiada trzy warstwy $\alpha/\beta/\alpha$, gdzie warstwa β składa się z 7 nici.

Analiza sekwencji aa pod kątem obecności sekwencji sygnałnych

Wykorzystując program MitoProt II [Claros i Vincens 1996] służący do przewidywania lokalizacji białek w komórce, obliczono prawdopodobieństwo występowania badanych białek w

mitochondrium. Znane sekwencje aminokwasowe analizowano pod kątem występowania sekwencji sygnałnych. Wyniki przedstawiono w Tab. 41.

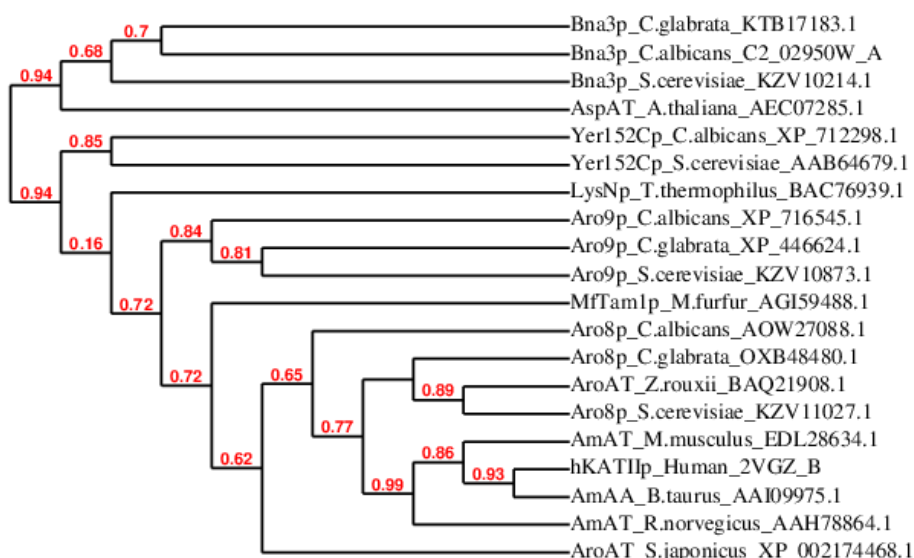
Tab. 41 Zestawienie prawdopodobieństwa występowania mitochondrialnej sekwencji sygnałowej w sekwencjach aminokwasowych analizowanych białek. Program: MitoProt II [Claros i Vincens 1996]

Nazwa białka	CaAro8p	CaAro9p	CaYer152Cp	CaBna3p
Prawdopodobieństwo występowania w mitochondrium	15%	41%	5%	91%

Z przeprowadzonej analizy wynika, że białko CaBna3p z 91% prawdopodobieństwem jest białkiem mitochondrialnym. Grzybowe α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowe (Aro8p, Aro9p, Yer152Cp) są w większości białkami cytoplazmatycznymi [Hébert i in. 2011], natomiast u ssaków, AmAA znajduje się w cytoplazmie i w mitochondrium [Deshmukh i Mungre 1989]. Ludzka AmAA, posiadająca również aktywność kinureninowej aminotransferazy, jest białkiem mitochondrialnym [Goh i in. 2002]. Wysokie prawdopodobieństwo występowania w mitochondrium (95%) wykazano również dla białka ScBna3p (program MitoProt II [Claros i Vincens 1996]).

Analiza filogenetyczna

Stosując program Phylogeny.fr [Dereeper i in. 2008; Dereeper i in. 2010] dokonano analizy filogenetycznej. Wynik tej analizy, w której porównano sekwencje CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp i CaBna3p z sekwencjami aminotransferaz z innych organizmów, przedstawiono na Rys. 32. Wykazano, że białka Aro8p są ze sobą spokrewnione i tworzą osobne odgałęzienie wraz z aromatyczną aminotransferazą z *Z. rouxii* BAQ21908.1. Blisko spokrewnione z białkami Aro8p są również aromatyczne aminotransferazy z *S. japonicus* XP_002174468.1 i *M. furfur* AG159488.1. Wykazano, że najbliższe spokrewnione ewolucyjnie z białkami ssaczymi o aktywności AmAA są białka Aro8p i Aro9p. Białka Bna3p i Yer152Cp tworzą odrębne odgałęzienia natomiast najbliższe spokrewniona z białkami Bna3p jest asparaginowa aminotransferaza z *A. thaliana* AEC07285.1.



Rys. 32 Drzewo filogenetyczne badanych białek CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp i CaBna3p i AmAA z innych organizmów. Program: Phylogeny.fr [Dereeper i in. 2008; Dereeper i in. 2010]

4.2 Określanie roli genów kodujących białka o przypuszczalnej aktywności AmAA poprzez badanie fenotypu mutantów delecyjnych

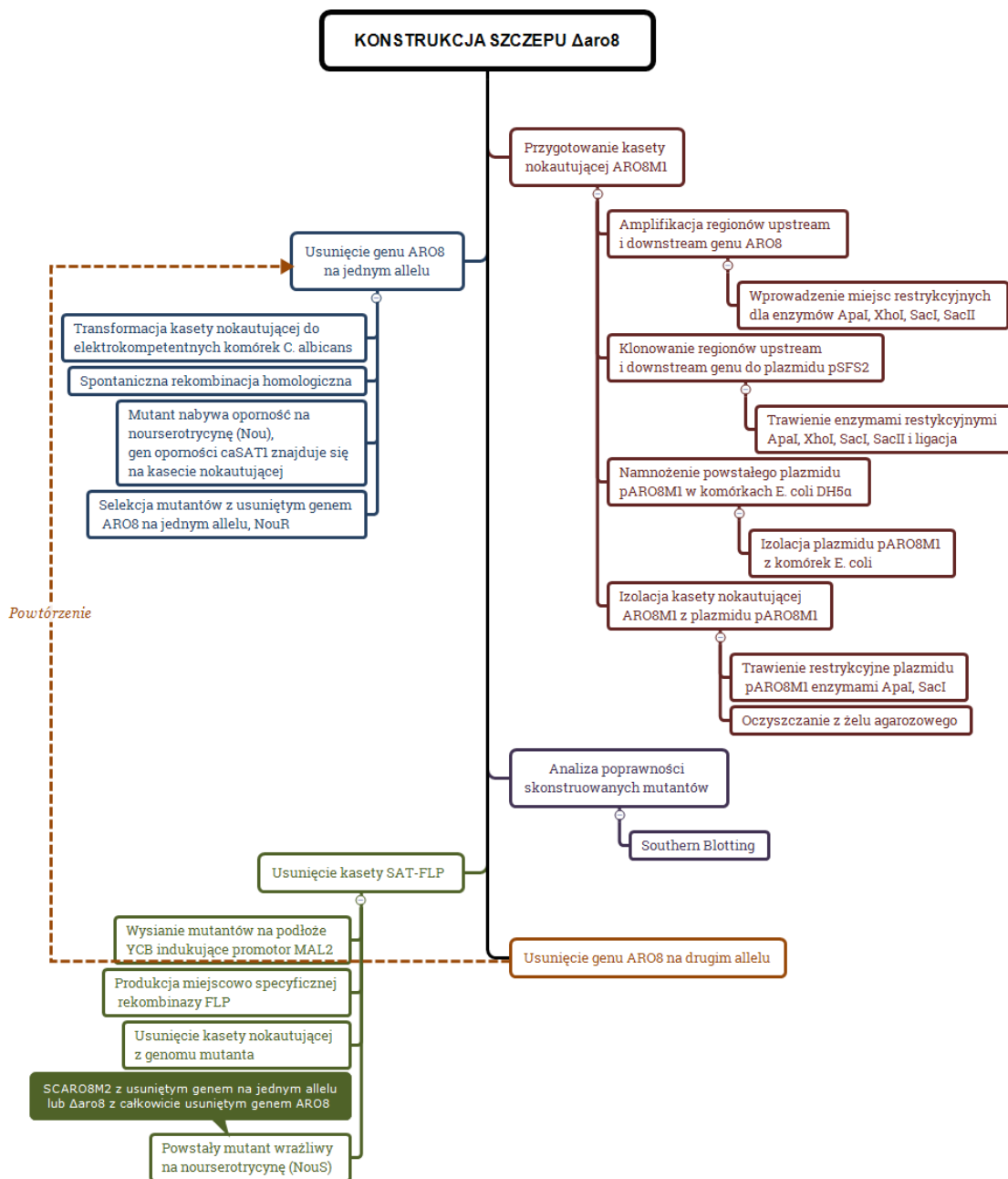
4.2.1 Konstrukcja mutantów *C. albicans* SC5314 z usuniętymi genami kodującymi AmAA

Delecja genów kodujących enzymy umożliwia ocenę wpływu tych enzymów na fenotyp komórek, na zjadliwość szczepu oraz umożliwia poznanie funkcji *in vivo* badanych białek. Usunięcie genów w *C. albicans* jest zadaniem trudniejszym, niż np. w *S. cerevisiae*, ponieważ *C. albicans* to mikroorganizm diploidalny, należy więc usunąć oba allele genu. Bardzo popularna metoda usunięcia genów w *C. albicans* opiera się na wykorzystaniu markera *URA3* do odróżnienia urydno prototroficznych mutantów od urydno auksotroficznych szczepów gospodarza [Fonzi i Irwin 1993]. Ta metoda stwarza jednak wiele trudności z prawidłowym rozpoznanem transformantów [Staab i Sundstrom 2003]. Poziom ekspresji genu *URA3* zależy od miejsca integracji w genomie [Lay i in. 1998] i może wpływać na wirulencje szczepu oraz na cechy związane z wirulencją, co w ostateczności zaburza interpretację końcowego wyniku badania [Bain i in. 2001; Cheng i in. 2003; Cole i in. 1995; Kirsch i Whitney 1991].

Zastosowana w niniejszej pracy doktorskiej metoda SAT1-flipper opracowana przez zespół prof. Morschhäusera [Reuss i in. 2004] umożliwia usunięcie genu z genomu dzikiego szczepu *C. albicans* SC5314, co zapobiega problemom związanym z zastosowaniem auksotroficznych szczepów i markera *URA3*. Markerem selekcyjnym w tej metodzie jest antybiotyk nourseotrycyna. Transformanty są uzyskiwane znacznie szybciej niż w metodzie opartej na wykorzystaniu markera *URA3*, a integracja genu oporności na ten antybiotyk w docelowym miejscu występuje z wysoce podwyższoną specyficznością. Gen oporności na nourseotrycynę wprowadzany jest poprzez integrację w genomie kasety nokautującej w miejsce usuwanego allelu, a następnie usuwany przez miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP. Ta procedura wykonywana jest dwukrotnie, w celu usunięcia obu alleli [Reuss i in. 2004].

W niniejszej pracy usunięto geny *ARO8 orf19.2098*, *ARO9 orf19.1237*, *BNA31 orf19.5809*, *BNA32 orf19.1589.1*, *YER152C orf19.1180* (Candida Genome Database, <http://www.candidagenome.org/>, [Skrzypek i in. 2011]) z genomu *C. albicans* w celu poznania funkcji *in vivo* badanych białek, sprawdzenia, które białko pełni kluczową rolę w patogenezie *C. albicans*, a które w procesie biosyntezy L-lizyny. Badania wykonano wraz z zespołem prof. Morschhäusera na Uniwersytecie w Würzburgu. Szczegółowy opis otrzymywania mutantów z usuniętymi genami został umieszczony Roz.3.2.28. Na schemacie (Rys. 33) zobrazowano kolejne kroki postępowania dla konstrukcji mutantu Δ *aro8*. Usuwanie pozostałych genów przeprowadzono analogicznie.

Przeprowadzono amplifikacje regionów *upstream* i *downstream* genu *ARO8* na matrycy genomowego DNA *C. albicans* SC5314. W tym celu wykorzystano pary starterów ARO8.01 i ARO8.02 do amplifikacji regionu *upstream* oraz ARO8.03 i ARO8.04 do amplifikacji regionu *downstream*. Amplifikowaną sekwencję zmodyfikowano wprowadzając miejsce cięcia dla enzymów restrykcyjnych *SacI*, *SacII*, *Apal*, *XhoI*, dzięki którym możliwe było klonowanie do plazmidu zawierającego elementy kasety nokautującej.



Rys. 33 Schemat postępowania w przypadku usuwania genu metodą *SAT1-FLP* na przykładzie genu *ARO8*

Amplifikacja regionu *upstream* *ARO8* (465 pz):

ARO8.01 5' **TTT GAGCTC CACCACTTAAAACTGATAAGAAA**3'
SacI

sekwencja komplementarna do regionu *upstream* *ARO8* (pozycja od -451 do -418)

ARO8.02 5' **GTAT CCGCGG TCATTATGGCAGTAGAAA**3'
SacI

sekwencja komplementarna do regionu 5' *ARO8* (pozycja od -14 do +14)

Amplifikacja regionu *downstream ARO8* (479 pz):

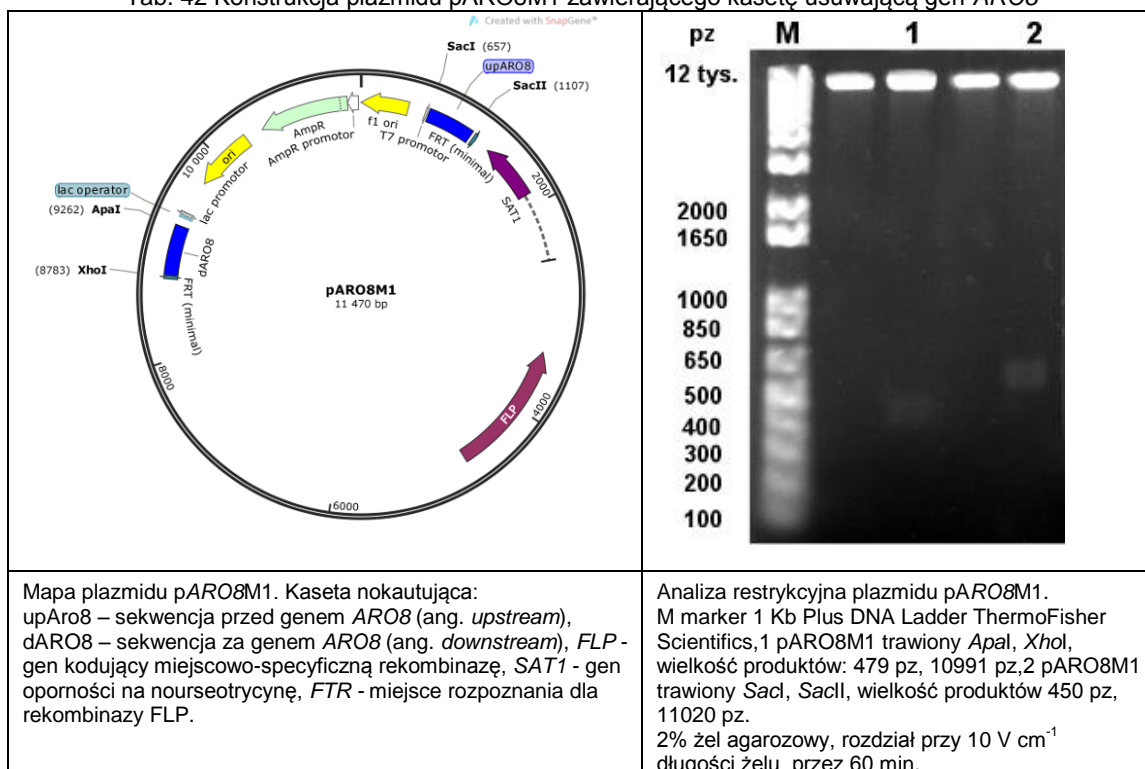
ARO8.03 5' **GTAA CTGAG CTTGTGTGTGCAACAAG**3'
XhoI

sekwencja komplementarna do regionu 3' *ARO8* (pozycja od +1473 do +1502)

ARO8.04 5' **CAAA GGGCC GTCGTAAGATTTATCTG** 3'
ApaI

sekwencja komplementarna do regionu *downstream ARO8* (pozycja od +1924 do +1952)

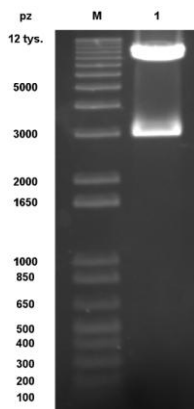
Tab. 42 Konstrukcja plazmidu pARO8M1 zawierającego kasetę usuwającą gen *ARO8*



Amplifikowane regiony klonowano do plazmidu pSFS2, wykorzystując wprowadzone miejsca restrykcyjne, otrzymując plazmid pARO8M1 (Tab. 42). W skonstruowanych plazmidach sekwencja usuniętego genu została zamieniona na kasetę *SAT1*-flipper. Otrzymany plazmid zawierał: regiony *upstream* i *downstream ARO8*, gen *caFLP* kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę *FLP* (będący pod kontrolą promotora *MAL2p*), gen oporności na nourseotrycynę (*SAT1*), sekwencję *FRT* czyli miejsce rozpoznania dla rekombinazy *FLP* (34 pz). Uzyskane plazmidy poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi w celu sprawdzenia poprawności konstrukcji, a następnie wysyłano do sekwencjonowania do zewnętrznej firmy.

Otrzymany plazmid namnażano w komórkach *E. coli* DH5 α i izolowano. Natępnie przeprowadzano trawienie restrykcyjne enzymami *ApaI*, *SacI* w celu izolacji kasety nokautującej *ARO8M1* (Rys. 34). Tak uzyskaną kasetę nokautującą *ARO8up-SAT1flipper-ARO8down* izolowano z żelu agarozowego i wprowadzano do komórek *C. albicans* według procedury 3.2.28. W wyniku transformacji kasety nokautującej do elektrokompetentnych komórek *C. albicans*, następowała wymiana fragmentów komplementarnych (zjawisko *crossing-over*).

Fragment w genomie gospodarza zawierający gen *ARO8* i regiony flankujące (regiony *upstream*, *downstream*) wymieniano na kasetę nokautującą zawierającą regiony *upstream* i *downstream* badanego genu. W wyniku takiej manipulacji genetycznej, zmutowany szczep nabywał oporność na nourseotrycynę (*SAT1* z kasety nokautującej). Selekcje mutantów przeprowadzano na podłożu YEPG zawierającym 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nourseotrycyny.

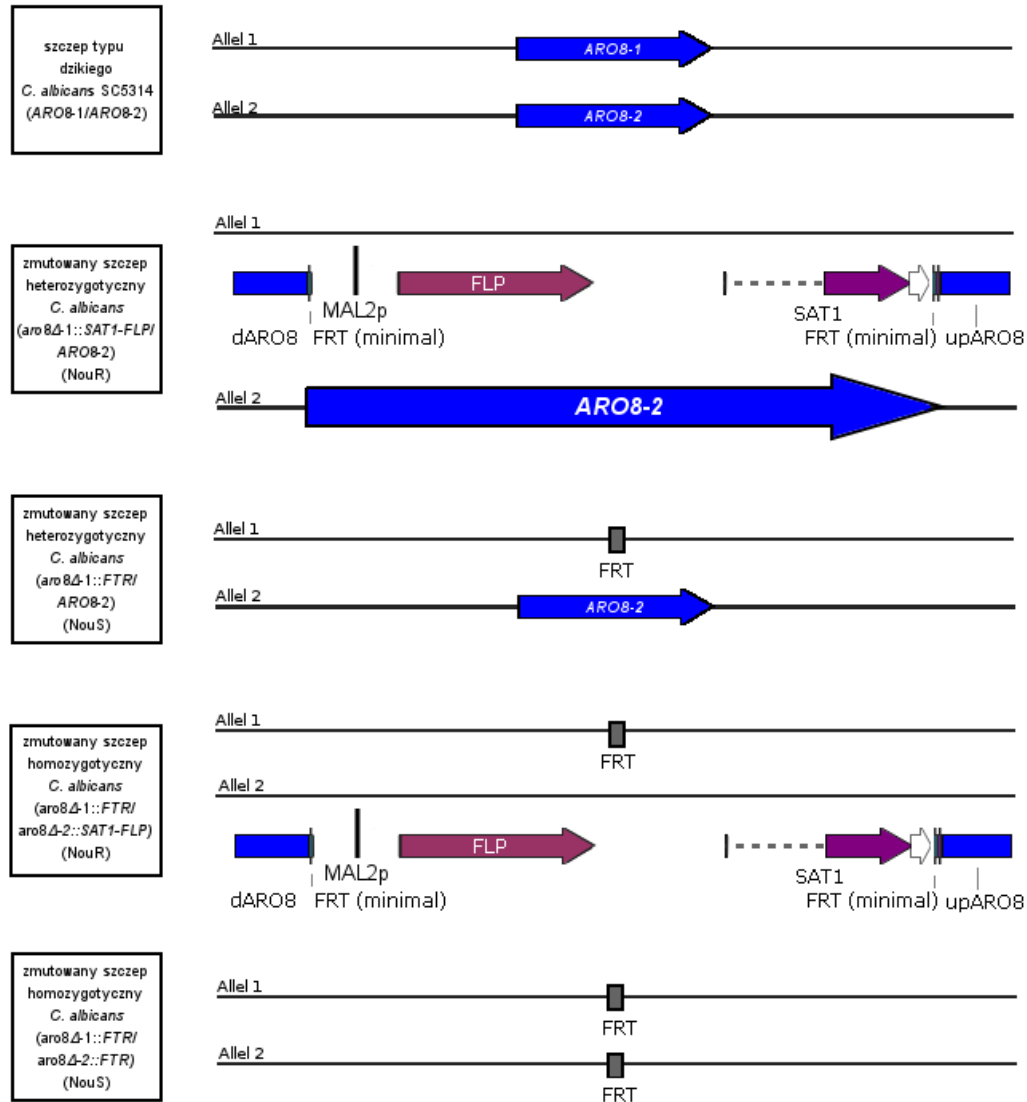


Rys. 34 Przykład izolacji kasety nokautującej *ARO8M1* z plazmidu *pARO8M1* do usuwania genu *ARO8*. M marker BioLabs, 1 trawienie enzymami *ApaI* i *SacI* plazmidu *pARO8M1* w celu izolacji kasety nokautującej *ARO8M1* (8617 pz). 2% żel agarozowy, rozdział przy 10 V cm^{-1} długości żelu, przez 60 min

Poprawność integracji kasety nokautującej w genomie mutantów sprawdzano metodą Southern Blotting (Roz. 3.2.29). Każdy szczep konstruowano w dwóch powtórzeniach, nadając indeks A i B kolejnym mutantom, gdzie mutant A posiadał usunięty gen na allelu 1 (*ARO8-1*), natomiast w mutancie B kasetą zintegrowała się w *locus ARO8-2* (Candida Genome Database <http://www.candida-genome.org/> [Skrzypek i in. 2011]). Sondy wykorzystywane w procedurze Southern Blotting skonstruowano tak, aby możliwe było rozróżnienie obu alleli. Kolejnym etapem było usunięcie kasety nokautującej z genomu mutantów. Mutanty wysiewano na podłożu YCB indukujące promotor *MAL2p*. Następowala inicjacja ekspresji genu kodującego miejscowo-specyficzną rekombinazę FLP, która wycinała kasetę nokautującą *SAT1-flipper* z genomu mutantów, pozostawiając fragment *FTR*. Tak powstały heterozygotyczny szczep *C. albicans ARO8/aro8Δ::FRT* z usuniętym genem *ARO8* na jednym allelu nazywano *CaARO8M2A (aro8-1Δ/ARO8-2)* i B (*ARO8-1/aro8-2Δ*). Mutant pozbawiony kasety nokautującej stawał się wrażliwy na nourseotrycynę. Po usunięciu kasety nokautującej z genomu mutantów ponownie wykonywano Southern Blotting. Procedurę usuwania genu z jednego allelu powtarzano, uzyskując szczep Δaro8 , który różni się od wyjściowego szczepu *C. albicans* usuniętym genem *ARO8* na obydwu allelach (Rys. 35).

Aby mieć pewność, że uzyskany fenotyp szczepów zmutowanych jest konsekwencją usunięcia badanego genu, a nie błędów manipulacji genetycznej, ponownie wprowadzano gen *ARO8* do genomu mutantów *C. albicans Δaro8*. Cała procedura odbywała się zgodnie z opisem (Roz. 3.2.31) a kolejne etapy były podobne do usuwania genu opisanego powyżej. W tym celu skonstruowano plazmid *pARO8K2*, w którym w miejsce *upstream ARO8* plazmidu *pARO8M1* klonowano sekwencję zawierającą *upstream ARO8*, gen *ARO8* i *downstream ARO8*. Prawidłową konstrukcję plazmidu potwierdzono analizą restrykcyjną i sekwencjonowaniem. Z plazmidu *pARO8K2* wycinano przy pomocy endonukleaz *ApaI* i *SacI* liniowy fragment DNA

zawierający gen *ARO8* oraz elementy kasety nokautującej *SAT1*-flipper i transformowano nim komórki *C. albicans* Δ *aro8*. Ponownie przeprowadzano selekcję mutantów na podłożu YEPG zawierającym 200 μ g mL⁻¹ nourseotrycyny, a poprawność integracji transformowanego fragmentu w genomie mutantów sprawdzano metodą Southern Blotting (Roz. 3.2.29).



Rys. 35 Etapy usuwania genu *ARO8* metodą *SAT1-FLP*

Prawidłowo skonstruowane mutanty, w których kasetta *SAT1*-flipper wraz z genem *ARO8* wbudowała się w miejsce *aro8Δ-1* oraz te, w których kasetta zintegrowała się w *locus aro8Δ-2* wysiewano na podłożu indukujące YCB. W wyniku działania miejscowo-specyficznej rekombinazy FLP w genomie mutantów następowało wycięcie elementów kasety *SAT1*-flipper, a pozostawał fragment *upstream ARO8*, gen *ARO8* oraz podwójny fragment *downstream ARO8* i fragment *FTR*. Poprawność manipulacji genetycznej potwierdzano metodą Southern Blotting. Tak powstały heterozygotyczny szcepek *C. albicans* *aro8Δ::FTR/ARO8::FTR* z wprowadzonym ponownie genem *ARO8* na jednym allelu nazywano *CaARO8K2A* (*aro8Δ-1::FTR/ARO8-2::FTR*) i B (*ARO8-1::FTR/aro8Δ-2::FTR*).

Nazwy wszystkich uzyskanych w pracy szczepów i ich genotyp wymieniono w Tab. 43.

Tab. 43 Lista uzyskanych mutantów delecyjnych. Szczepy z indeksem M2 – mutanty heterozygotyczne, K2 -mutanty z komplementacją genu

Szczep	Opis/genotyp
SC5314	Szczep referencyjny (WT)
CaARO8M2A i -B	ARO8/aro8Δ::FRT
CaΔaro8A i -B	aro8Δ::FRT/aro8Δ::FTR
CaARO8K2A i -B	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR
CaARO9M2A i -B	ARO9/aro9Δ::FRT
CaΔaro9A i -B	aro9Δ::FRT/aro9Δ::FTR
CaARO9K2A i -B	aro9Δ::FTR/ARO9::FTR
CaYER152CM2A i -B	YER152C/yer152CΔ::FRT
CaΔyer152CA i -B	yer152CΔ::FRT/yer152CΔ::FTR
CaYER152CK2A i -B	yer152CΔ::FTR/YER152C::FTR
CaBNA31M2A i -B	BNA31/bna31Δ::FRT
CaΔbna31A i -B	bna31Δ::FRT/bna31Δ::FTR
CaBNA31K2B	bna31Δ::FTR/BNA31::FTR
CaBNA32M2A i -B	BNA32/bna32Δ::FRT
Ca Δbna32A i -B	bna32Δ::FRT/bna32Δ::FTR
CaΔaro8 ARO9M2A i -B	aro8Δ, ARO9/aro9Δ::FRT
CaΔaro8 Δaro9A i -B	aro8Δ, aro9Δ::FRT/aro9Δ::FTR
CaΔaro8 ARO9K2A i -B	aro8Δ, aro9Δ::FTR/ARO9::FTR
CaARO8K2 Δaro9A i -B	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR, aro9Δ::FRT/aro9Δ::FTR
CaARO8K2 ARO9K2A i -B	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR, aro8Δ, aro9Δ::FTR/ARO9::FTR
CaΔaro8 YER152CM2A i -B	aro8Δ, YER152C/yer152CΔ::FRT
CaΔaro8 Δyer152CA i -B	aro8Δ, yer152CΔ::FRT/yer152CΔ::FTR
CaΔaro8 YER152CK2A i -B	aro8Δ, yer152CΔ::FTR/YER152C::FTR
CaARO8K2 Δyer152CA	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR, yer152CΔ::FRT/yer152CΔ::FTR
CaARO8K2 YER152CK2A i -B	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR, aro8Δ, yer152CΔ::FTR/YER152C::FTR
CaΔaro8 BNA31M2A i -B	aro8Δ, BNA31/bna31Δ::FRT
CaΔaro8 Δbna31A i -B	aro8Δ, bna31Δ::FRT/bna31Δ::FTR
CaΔaro8 BNA31K2A i -B	aro8Δ, bna31Δ::FTR/BNA31::FTR
CaΔaro8 BNA31K2A i -B	aro8Δ, BNA31::FTR/bna31Δ::FTR
CaARO8K2 Δbna31A	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR, bna31Δ::FRT/bna31Δ::FTR
CaARO8K2 BNA31K2A	aro8Δ::FTR/ARO8::FTR, aro8Δ, bna31Δ::FTR/BNA31::FTR
CaΔaro8 Δbna31 BNA32M2A	aro8Δ, bna31Δ, BNA32/bna32Δ::FRT
CaΔaro8 Δbna31 Δbna32A	aro8Δ, bna31Δ, bna32Δ::FRT/bna32Δ::FTR

4.2.2 Sprawdzenie poprawności konstrukcji mutantów *C. albicans*

Każdy skonstruowany szczep sprawdzano przy pomocy procedury Southern Blotting (Roz. 3.2.29). W tym celu z każdego szczepu izolowano genomowe DNA (Roz. 3.2.4), które następnie poddawano trawieniu restrykcyjnemu (Roz. 3.2.7).

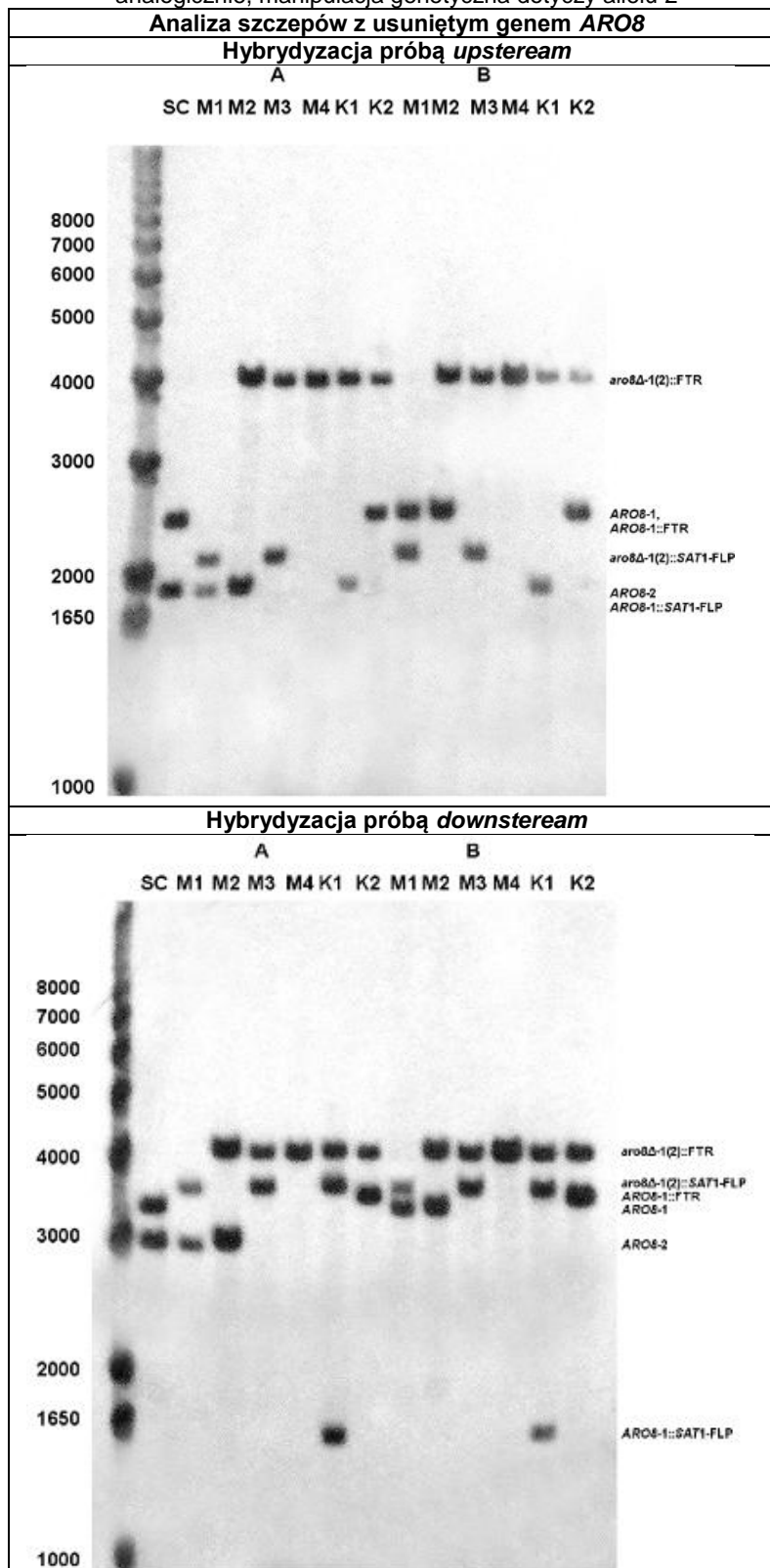
Na podstawie analizy bioinformatycznej dobierano odpowiednie endonukleazy DNA aby:

- nie trawiły one sekwencji komplementarnej do znakowanej sondy DNA,
- wycinały fragmenty DNA komplementarne do znakowanej sondy o wielkości mieszczącej się w granicach 1- 10 kpb,
- wycinane fragmenty DNA komplementarne do znakowanej sondy miały długość inną na jednym i drugim allelu (aby można było odróżnić obydwa allele od siebie).

Dobrano następujące enzymy:

- *EcoRI*, *NdeI* w przypadku analizowania obecności genu *ARO8*,
- *XhoI*, *NdeI* w przypadku analizowania obecności genu *YER152C*,
- *SfiI* w przypadku analizowania obecności genu *ARO9*,
- *PvuI*, *HindIII* oraz *MlyI* w przypadku analizowania obecności genów *BNA31* i *BNA32*.

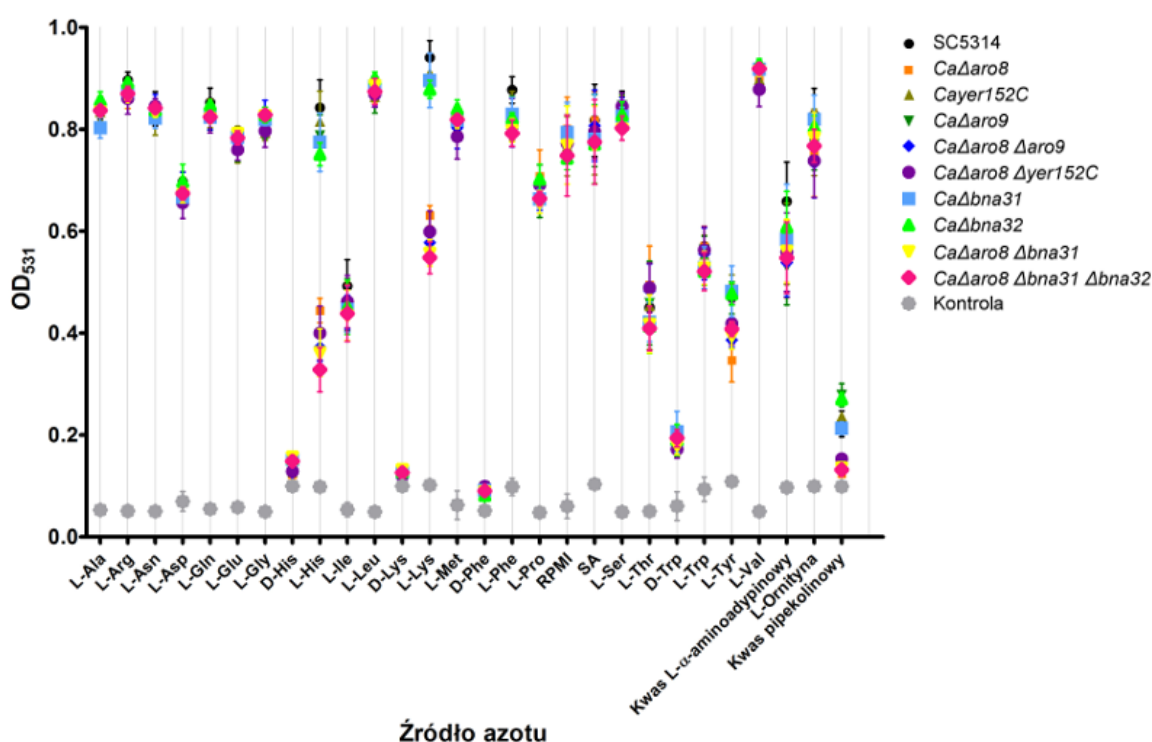
Tab. 44 Schemat hybrydyzacji sond *upstream* i *downstream* do fragmentu DNA w okolicach *locus* genu *ARO8*, z zaznaczeniem diagnostycznych miejsc, rozpoznawanych przez enzymy *EcoRI* i *NdeI*. Wynik analizy Southern Blotting szczepów z usuniętym genem *ARO8*. SC - szczep referencyjny SC5314, M1 A szczep *aro8-1Δ::SAT1-FLP/ARO8-2*, M2 A szczep *aro8-1Δ::FRT/ARO8-2*, M3 A szczep *aro8-1Δ::FRT/aro8-2Δ::SAT1-FLP*, M4 A szczep *aro8-1Δ::FRT/aro8-2Δ::FTR*, K1 A szczep *ARO8-1::SAT1-FLP/aro8-2Δ::FTR*, K2 A szczep *ARO8-1::FRT/aro8-2Δ::FTR*. Szczepy z indeksem B są nazywane analogicznie, manipulacja genetyczna dotyczy allelu 2



Jako sond do hybrydizacji DNA używano fragmentów DNA *upstream* i *downstream* badanego genu uzyskanych przy pomocy reakcji PCR (Roz. 3.2.26). Do znakowania sond używano zestawu ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System firmy Amersham Biosciences. Poprawność konstrukcji każdego szczepu sprawdzana była przez hybrydizację, zarówno z sondą *upstream* (up), jak i z sondą *downstream* (down). Wybrane wyniki tych analiz przedstawiono poniżej (Tab. 44).

4.2.3 Wzrost mutantów w podłożu minimalnym z różnymi źródłami azotu

Wszystkie otrzymane mutanty delecyjne zostały poddane ocenie fenotypu wzrostowego w pożywce minimalnej YNB zawierającej różne źródła azotu (siarczan amonu, aminokwasy lub intermediaty szlaku biosyntezy i degradacji L-lizyny, kwas L- α -aminoadypinowy, kwas pipekolinowy). Otrzymane wyniki przedstawiono na Rys. 36.

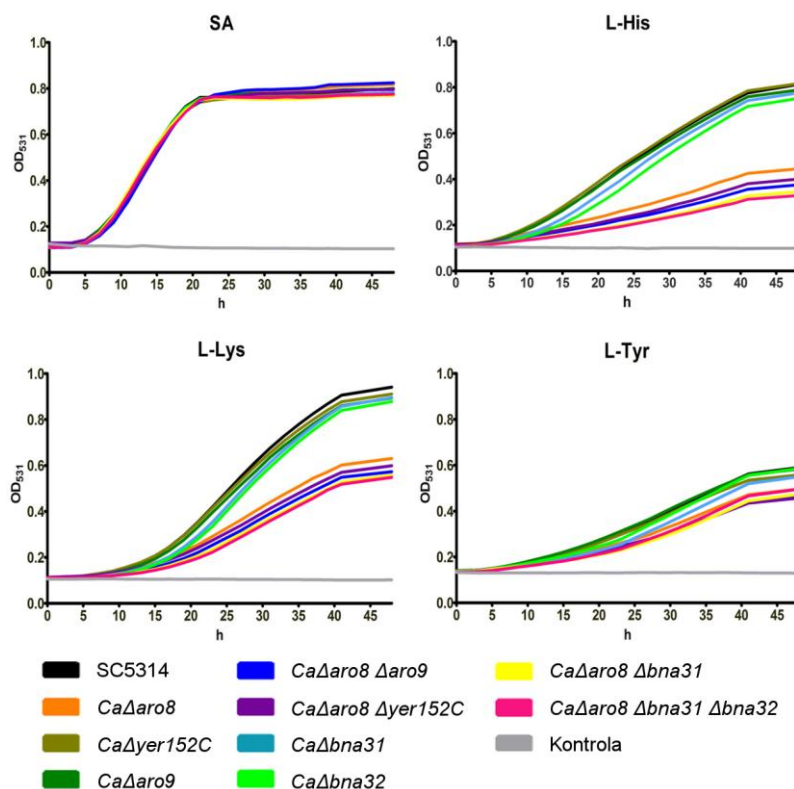


Rys. 36 Zestawienie szybkości wzrostu mutantów delecyjnych na podłożu minimalnym z dodatkiem różnego źródła azotu. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm, po 48 h inkubacji w 30°C. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB

Żaden z mutantów nie wykazywał auksotrofii względem zastosowanych źródeł azotu. W szczególności, zaobserwowano identyczny wzrost wszystkich mutantów i szczepu dzikiego w pożywce zawierającej siarczan amonu jako jedyne źródło azotu. Oznacza to, że żaden z badanych enzymów, tj. *CaAro8p*, *CaAro9p*, *CaYer152Cp*, *CaBna31p*, *CaBna32p* nie pełni kluczowej roli w szlaku biosyntezy aminokwasów białkowych. Jedynie dla mutantów z usuniętym genem *ARO8* wykazano zauważalne zahamowanie wzrostu szczepów na podłożu minimalnym z dodatkiem L-lizyny, L-histydyny i L-tyrozyny, co oznacza że produkt tego genu, czyli enzym *CaAro8p* odgrywa istotną rolę w szlaku degradacji tych aminokwasów, jednak nie jest jedynym enzymem w komórce wykazującym taką aktywność. Pozostałe mutanty były

w stanie wykorzystywać jako jedyne źródło azotu wszystkie z 19 przebadanych aminokwasów, z efektywnością równą szczepowi wyjściowemu.

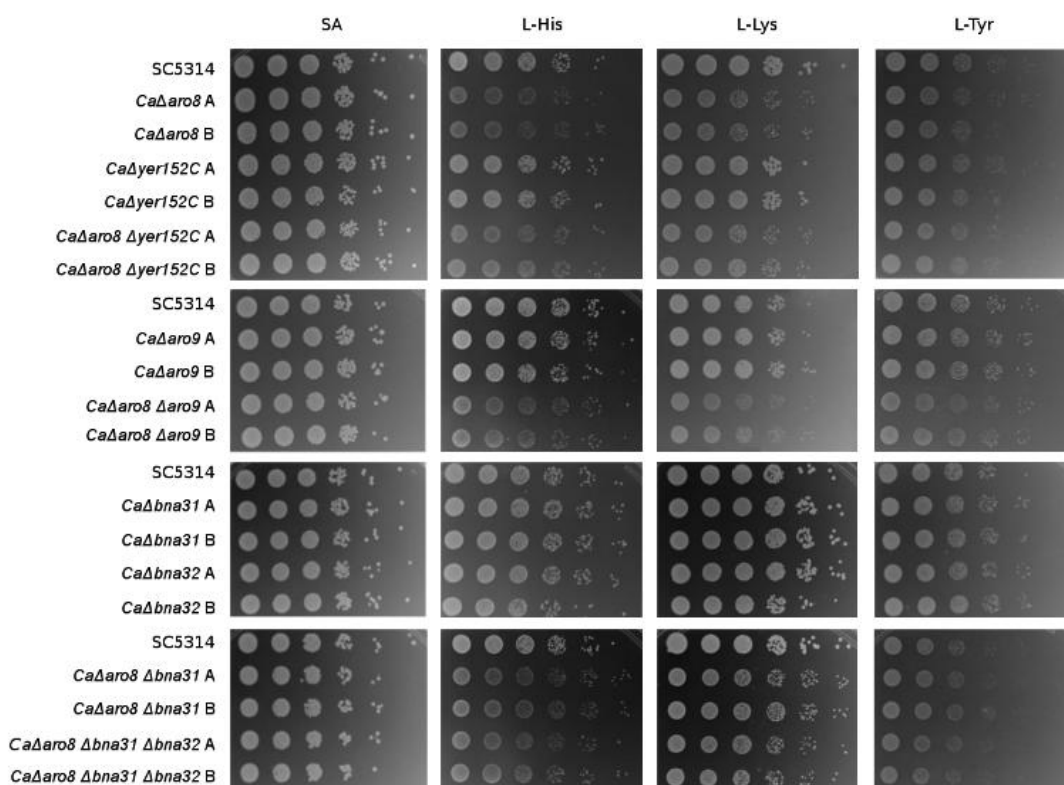
Wzrost mutantów sprawdzono również w podłożu RPMI 1640, używanym w hodowlach *in vitro* komórek ssących i kulturach tkankowych, którego skład jest zaprojektowany tak aby naśladować warunki panujące *in vivo* w krwiobiegu ssaków. Żaden z mutantów nie wykazywał defektu wzrostu w pożywce RPMI 1640 w porównaniu ze szczepem dzikim.



Rys. 37 Kinetyka wzrostu szczepu dzikiego *C. albicans* SC5314 i skonstruowanych mutantów delecyjnych w pożywce YNB zawierającej L-Lys, L-His, L-Tyr jako źródło azotu (10 mM) lub siarczan amonu (SA) (10 mM). Gęstość optyczna zawiesin komórkowych była mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB

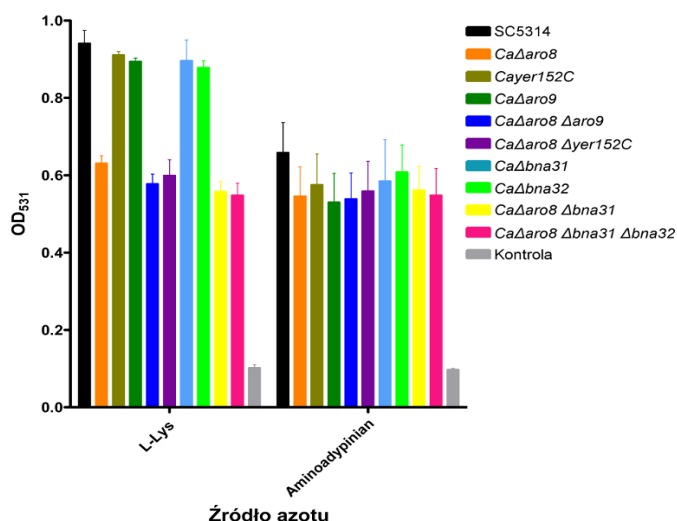
Różnice we wzroście mutantów z usuniętym genem *ARO8* w podłożu YNB z L-Lys, L-His lub L-Tyr jako źródłem azotu można było lepiej zaobserwować w badaniach kinetyki wzrostu na tych pożywkach (Rys. 37).

Dokonano także ilościowej oceny wzrostu mutantów na stałych pożywkach minimalnych (Rys. 38). Jak można zauważyć na Rys. 38, dla wszystkich mutantów z delecją *Δaro8* zauważono wolniejszy wzrost na pożywce minimalnej YNB z L-Lys, L-His lub L-Tyr jako jedynym źródłem azotu w porównaniu do szczepu dzikiego, przy czym najmniejszą różnicę w tempie wzrostu w porównaniu ze szczepem dzikim stwierdzono w przypadku, gdy jedynym źródłem azotu była L-Tyr. Delecja pozostałych genów, czyli *ARO9*, *BNA31*, *BNA32*, *YER152C* nie miała wpływu na wykorzystanie jako jedynego źródła azotu L-His, L-Lys, L-Tyr ani żadnego innego aminokwasu. Podobne prawidłowości zaobserwowano w teście przeprowadzonym na podłożach stałych (Rys. 38). Świadczy to o tym, że żaden z tych genów nie odgrywa istotnej roli w katabolizmie analizowanych aminokwasów.



Rys. 38 Wzrost mutantów delecyjnych na stałym podłożu YNB z L-His, L-Lys, L-Tyr lub siarczanem amonu (10 mM) jako źródłami azotu. Płytki inkubowano 48 h w 30°C

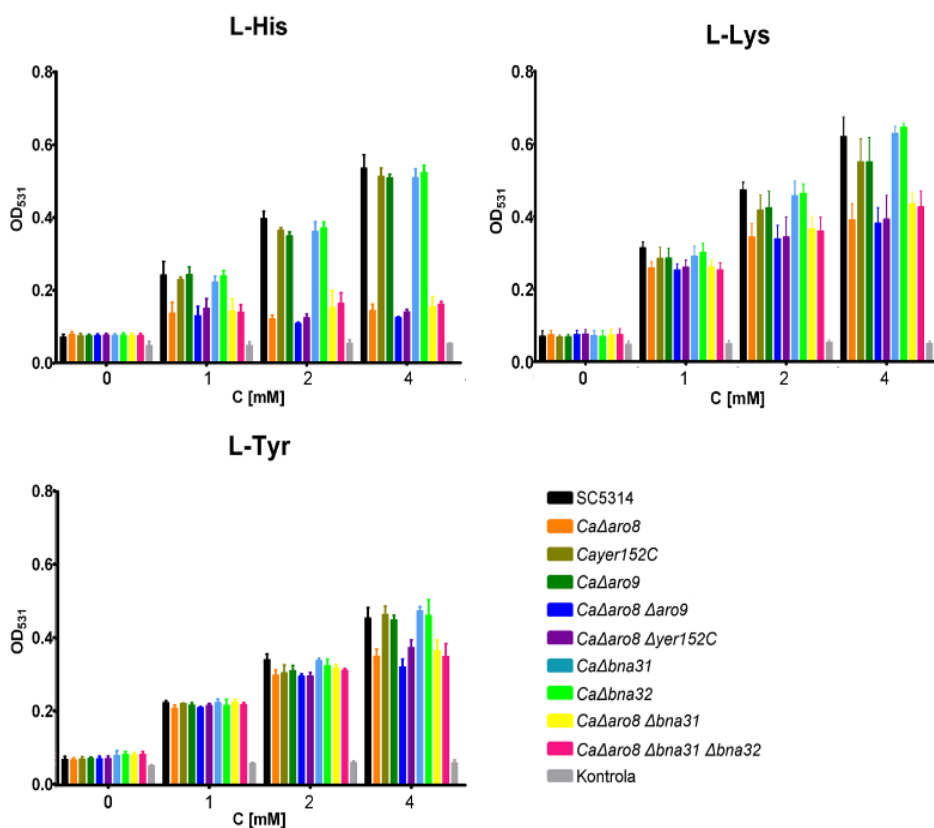
Delecja genów *ARO9*, *BNA31*, *BNA32*, *YER152C* nie wpłynęła również na wzrost komórek *C. albicans* w pożywce YNB z kwasem L- α -aminoadypinowym (produkt przejściowy biosyntezy L-lizyny) jako jedynym źródłem azotu, podczas gdy wpływ taki zaobserwowano dla mutantów pozbawionych genu *ARO8* (Rys. 39).



Rys. 39 Wzrost szczepu *C. albicans* SC5314 i skonstruowanych mutantów na pożywce YNB zawierającej L-Lys (10 mM) lub kwas L- α -aminoadypinowy (5 mM) jako źródło azotu. Gęstość optyczna została mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm po 48 h inkubacji w 30°. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB

Zdolność do wzrostu mutantów z usuniętym genem *ARO8* na podłożu YNB z L-Lys lub L-Tyr jako źródłem azotu mogła być przywrócona w stopniu zależnym od stężenia tych

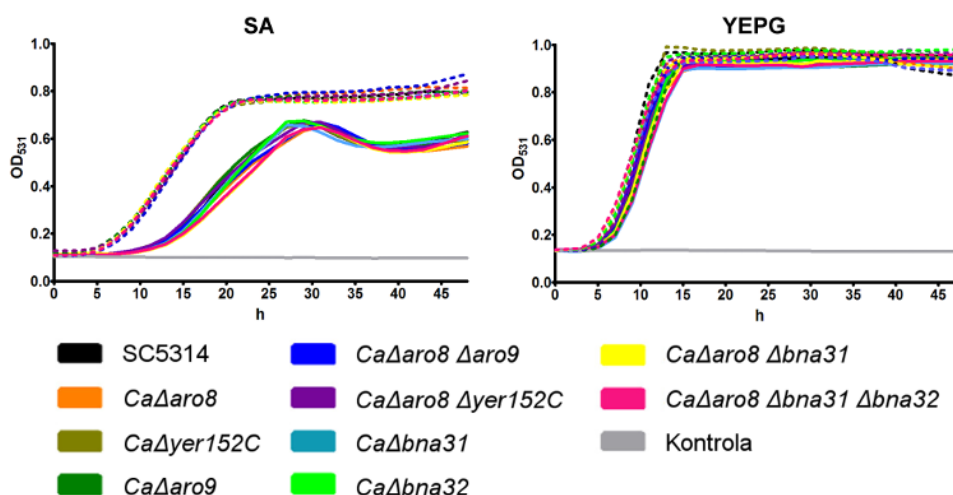
aminokwasów Rys. 40. Dla dodatku 4 mM L-Lys i L-Tyr do pożywki uzyskano odpowiednio $62,3 \pm 4,2\%$ i $74,0 \pm 4,9\%$ przywrócenia stopnia poziomu wzrostu w porównaniu ze szczepem dzikim. Natomiast dodatek L-His, niezależnie od stężenia, nie wpływał na poziom wzrostu szczepów. Dla dodatku 4 mM L-His do pożywki YNB, poziom wzrostu szczepów pozostawał na stałym poziomie, $19,9\% \pm 3,7\%$ poziomu wzrostu szczepu dzikiego.



Rys. 40 Wzrost szczepu referencyjnego *C. albicans* SC5324 i szczepów zmutowanych na pożywce minimalnej YNB z różnym stężeniem źródła azotu L-His, L-Lys, L-Tyr. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm, po 48 h inkubacji w 30°C. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB

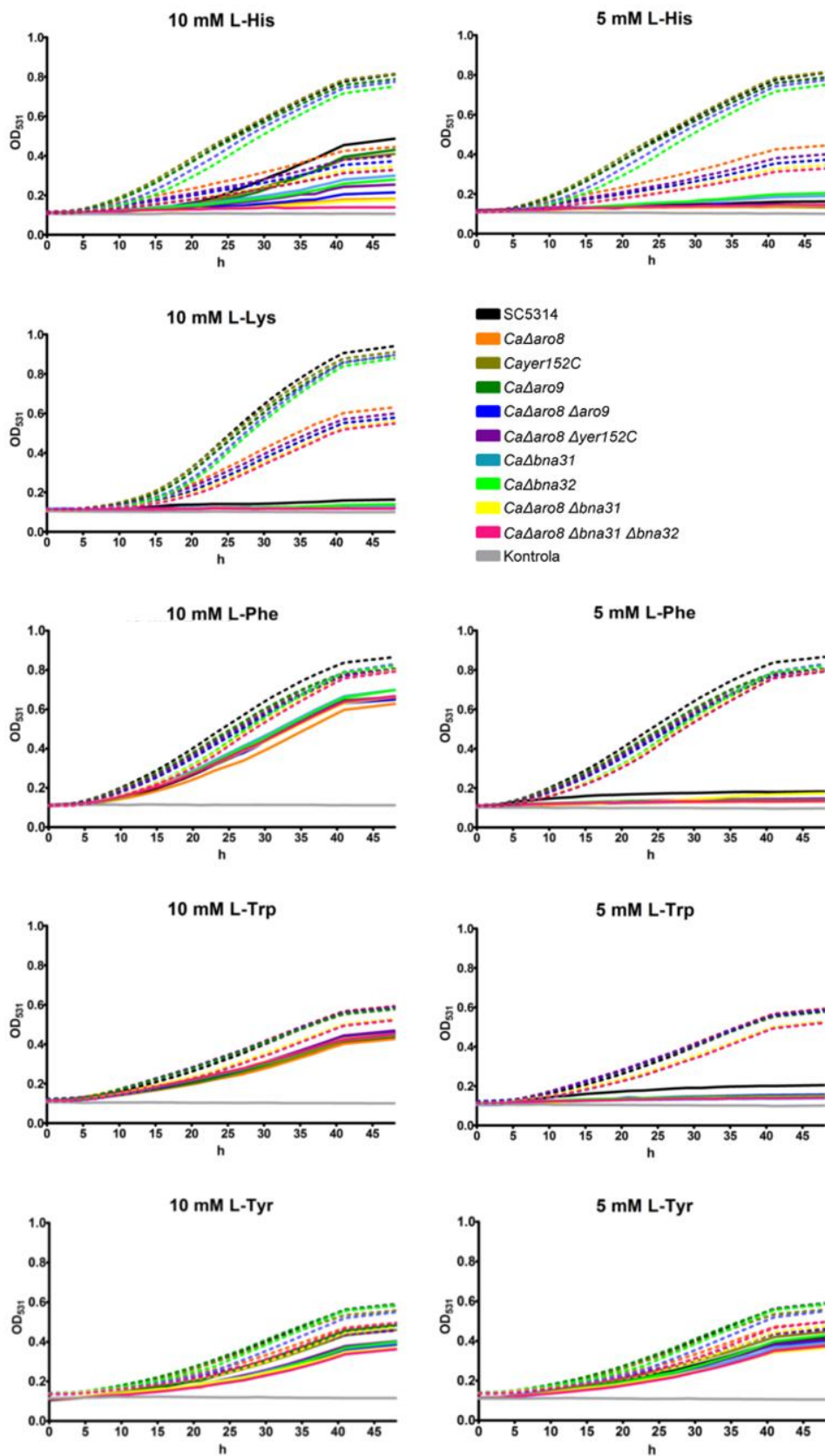
4.2.4 Wpływ inhibitora aminotransferaz AOA na wzrost analizowanych mutantów

Kwas aminoksyoctowy (AOA) jest inhibitorem enzymów PLP zależnych [Brunke i in. 2014; Preuss i in. 2013; Wallach 1961]. Zbadano, czy obecność tego związku w pożywce wpływa na wzrost skonstruowanych mutantów delecyjnych. Badanie to miało wykazać, czy utylizacja poszczególnych aminokwasów zależy wyłącznie od aktywności aminotransferazowej. Wyniki tych eksperymentów przedstawiono na Rys. 41. Wykazano, że wzrost szczepu referencyjnego *C. albicans* SC5314 i mutantów delecyjnych w pożywce YNB z siarczanem amonu z dodatkiem AOA był spowolniony. Efekt ten był identyczny niezależnie od szczepu. Natomiast zmniejszenia szybkości wzrostu nie zaobserwowano w podłożu bogatym YEPG. Wyniki te wskazują, że zahamowanie wzrostu w podłożu minimalnym jest konsekwencją inhibicji aminotransferazy lub aminotransferaz innych niż badane w tej pracy, a negatywny wpływ na wzrost może być zniwelowany poprzez dodanie peptydów i aminokwasów obecnych w podłożu YEPG (Rys. 41).



Rys. 41 Wpływ kwasu aminoksyoctowego (AOA) na wzrost *C. albicans* SC5314 i analizowanych mutantów w pożywce minimalnej YNB z dodatkiem siarczanu amonu (SA) i w pożywce bogatej (YEPG). Przerwane linie, brak dodatku AOA, linie ciągłe, dodatek 10 mM AOA. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm

Zbadano również wpływ AOA na wzrost mutantów delecyjnych i szczepu dzikiego *C. albicans* w pożywce YNB z dodatkiem L-Trp, L-Phe, L-Lys i L-His jako źródło azotu. Wyniki tego badania przedstawiono na Rys. 42. Całkowite zahamowanie wzrostu zaobserwowano dla wszystkich szczepów w pożywce YNB z dodatkiem 5 mM L-His, natomiast w pożywce z dodatkiem 10 mM L-His, efekt bliski całkowitemu zahamowaniu wzrostu obserwowano dla większości szczepów, natomiast w przypadku szczepu dzikiego oraz szczepów *CaΔyer152C* i *CaΔaro9* stwierdzono około 50% zahamowanie wzrostu. W wymienionych szczepach w procesie katabolizmu L-His (wykorzystanie tego aminokwasu jako źródło azotu) mogą uczestniczyć inne, nie usunięte aminotransferazy, np. *CaAro8p* czy *CaBna3p*. Pomimo, że AOA powoduje inhibicję *CaAro8p* w zakresie mikromolarnych stężeń (wartość IC_{50} dla *CaAro8p* wynosi $96,29 \pm 3$ [μ M]) to działanie tego związku *in vivo* na badane aminotransferazy może być zaburzone poprzez np. biodostępność. Aby uzyskać taki sam efekt inhibicji enzymu wymagane jest znacznie wyższe stężenie AOA w badaniach *in vivo*. Wzrost szczepów z usuniętym genem *ARO8* był całkowicie zredukowany w pożywce minimalnej z dodatkiem 10 mM L-His. Omawiane wyniki dowodzą, że biosynteza L-His w *C. albicans* nie jest zależna od żadnej z badanych aminotransferaz: *CaAro8p*, *CaAro9p*, *CaYer152Cp* i *CaBna3p*, natomiast enzym *CaAro8p* pełni prawdopodobnie kluczową rolę w degradacji tego aminokwasu. Całkowite zahamowanie wzrostu wszystkich szczepów zaobserwowano także w pożywce YNB z dodatkiem 10 mM L-Lys i 10 mM AOA. Dowodzi to, że degradacja lizyny jest całkowicie zależna od obecności aminotransferaz, *CaAro8p*, *CaAro9p* oraz prawdopodobnie także innych, nieprzebadanych w tej pracy. Porównując uzyskane wyniki z uzyskanymi dla fenotypu wzrostu mutantów delecyjnych w podłożu minimalnym z siarczanem amonu zauważyć można, że biosynteza lizyny nie zależy od *CaAro8p* ani od innej badanej aminotransferazy. Jednakże degradacja tego aminokwasu jest zależna od *CaAro8p* oraz innych aminotransferaz nieprzebadanych w ramach tej pracy.



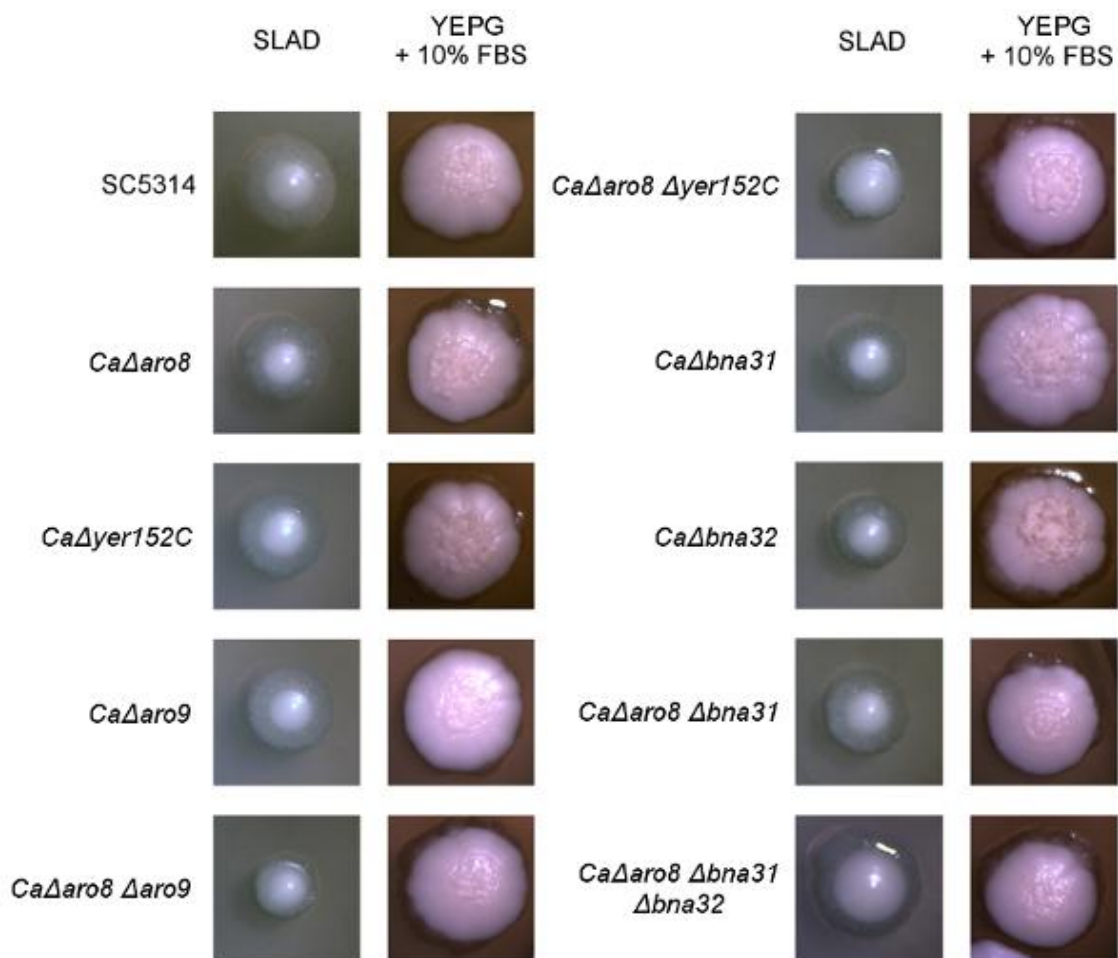
Rys. 42 Wpływ kwasu aminoksyoctowego (AOA) na wzrost *C. albicans* SC5314 i analizowanych mutantów na pożywce minimalnej YNB z dodatkiem różnych aminokwasów jako źródło azotu. Przerwane linie, brak dodatku AOA, linie ciągłe, dodatek 10 mM AOA. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm

Degradacja L-Phe i L-Trp jest również zależna od aktywności aminotransferaz, jednakże nie tak ściśle jak degradacja L-His i L-Lys. Dodatek inhibitora AOA do pożywki z 5 mM L-Phe lub L-Trp zaburza wzrost szczepu dzikiego *C. albicans* i mutantów delecyjnych. Przy wyższym stężeniu aminokwasu zaobserwowano wzrost komórek podobny do wzrostu w pożywce bez dodatku inhibitora. Uzyskane wyniki dla L-Tyr różnią się od tych opublikowanych wcześniej przez zespół Brunke, który badał rolę aminotransferaz w degradacji aminokwasów aromatycznych i L-His w *C. glabrata* (2014). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wykazują, że degradacja tyrozyny w *C. albicans* nie zależy ściśle od aktywności aminotransferazowej. Niezależnie od stężenia L-Tyr (5 czy 10 mM) w pożywce minimalnej z dodatkiem AOA, wszystkie badane szczepy *C. albicans* rosą prawie identycznie jak w pożywce bez dodatku inhibitora.

4.2.5 Wpływ delecji genów na zdolność *C. albicans* do transformacji morfologicznej Y → M.

Drożdże *C. albicans* należą do drożdży dimorficznych. Mogą występować w dwóch formach morfologicznych, jako drożdże pączkujące (forma Y) lub w formie mycelialnej (forma M) określane jako strzępki rzekome lub prawdziwe. Obie formy mają udział w patogenezie drożdżaka [Jacobsen i in. 2012; Kumamoto i Vines 2005; Matthews 1994], choć nitkowate strzępki są formą bardziej inwazyjną [Berman i Sudbery 2002], ze względu na większą powierzchnię przylegania, większą zdolność penetracji do komórek nabłonka i zdolność adhezji, natomiast mniejsze blastospory odpowiedzialne są za rozprzestrzenianie się grzyba poprzez krwioobieg [Saville i in. 2003]. Mutanty niezdolne do zmiany formy morfologicznej *in vitro* często są również awirulentne [Lo i in. 1997]. Wytworzenie formy mycelialnej jest powiązane z ekspresją wielu genów, które wydawałoby się nie mają z tym procesem bezpośredniego związku [Zheng i in. 2004]. Zmiana formy morfologicznej grzyba wiąże się ze wzmożonym zapotrzebowaniem na aminokwasy niezbędne do produkcji białek odpowiedzialnych za proces transformacji. Istnieje przypuszczenie, że usunięcie genów kodujących enzymy, uczestniczących w kluczowych szlakach biosyntezy aminokwasów, może wpłynąć na zaburzenie dimorfizmu. Tak jest w przypadku usunięcia genu *MET6* kodującego syntazę metioninową w genomie *Fusarium graminearum*, grzybowego patogenu roślinnego [Seong i in. 2005].

W celu sprawdzenia czy obecność genów *ARO8*, *ARO9*, *BNA3*, *YER152C* ma wpływ na zmianę formy morfologicznej grzyba *C. albicans*, komórki szczepów mutantów delecyjnych hodowano w warunkach stymulujących przemianę dimorficzną (Roz. 3.2.34). Uzyskane wyniki wykazały, że komórki wszystkich skonstruowanych mutantów były zdolne do zmiany formy morfologicznej z taką samą wydajnością jak szczep referencyjny (Rys. 43). Badane enzymy nie mają zatem wpływu na ten czynnik wirulencji. Warto w tym miejscu nadmienić, że usunięcie genów *LYS21* i *LYS22* z genomu *C. albicans* kodujących dwie izoformy syntazy homocytrynianowej oraz *LYS4* kodującego homoakoniatazę (enzymy ze szlaku biosyntezy L-lizyny) również nie wpłynęło na efektywność transformacji morfologicznej grzyba (wyniki uzyskane we wcześniejszych latach w Katedrze Technologii Leków i Biochemii [Gabriel i in. 2014; Kur i in. 2010]).



Rys. 43 Wybrane wyniki obrazujące zmianę formy morfologicznej skonstruowanych mutantów. Podłoże stałe SLAD i YEPG + 10 % v/v płodowa surowica bydlęca (FBS), inkubacja 7 dni 30°C

4.2.6 Wpływ delecji genów na zdolność *C. albicans* do wytwarzania biofilmu

Wytwarzanie biofilmu przez szczepy *C. albicans* na abiotycznych (protezy, cewniki) i biotycznych (błony śluzowe) powierzchniach jest kolejnym ważnym czynnikiem wirulencji drożdżaka [Fanning i Mitchell 2012]. Tworzenie biofilmu to złożony proces wymagający współdziałania wielu szlaków biosyntezy, rozpoczynający się od przyłączenia komórek grzybowych do powierzchni, zmiany formy morfologicznej na strzępki, następnie gromadzona jest zewnątrzkomórkowa substancja polimerowa (macierz biofilmu, ang. *EPS*) i rozprzestrzeniane są komórki biofilmu w celu kolonizacji nowych miejsc [Finkel i Mitchell 2011]. Komórki grzybowe zorganizowane w formie biofilmu są bardziej odporne na związki przeciwdrobnoustrojowe i układ odpornościowy gospodarza niż komórki zawieszinowe (planktoniczne) ze względu na architekturę biofilmu, zewnątrzkomórkową macierz i wzmorzoną aktywność pomp lekowych [Finkel i Mitchell 2011; Fanning i Mitchell 2012].

W niniejszej pracy sprawdzono czy uzyskane mutanty delecyjne mają zaburzony proces wytwarzania biofilmu wykorzystując procedurę opisaną (Roz. 3.2.33). Okazało się jednak, że wszystkie skonstruowane mutanty wytwarzały biofilm z taką samą wydajnością jak szczep referencyjny.

4.3 Charakterystyka biochemiczna produktów genów kodujących białka o przypuszczalnej aktywności AmAA

4.3.1 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych do nadprodukcji białek CaAro8p, CaAro9p, CaBna3p, CaYer152Cp w komórkach *E. coli*.

Jako szkielet plazmidów ekspresyjnych wykorzystano plazmid pET101/D-TOPO[®] firmy Invitrogen. Plazmid ten umożliwia nadprodukcję białka w komórkach *E. coli* z wykorzystaniem systemu Tabora-Studiera [Tabor i Richardson 1985]. Specjalna budowa plazmidu znacznie skraca czas poprawnego skonstruowania plazmidu ekspresyjnego, wymusza jednak odpowiednie przygotowanie produktu do klonowania. O pozostałych zaletach plazmidu oraz jego konstrukcji wspomniano wcześniej (Roz. 3.2.11).

Geny *ARO8*, *ARO9*, *BNA3*, *YER152C* zostały zamplifikowane na matrycy genomowego DNA z *C. albicans* SC5314 według metody opisanej w Roz. 3.2.11. W celu kierunkowego klonowania do plazmidu pET101/D-TOPO[®] dla każdej sekwencji (*ARO8*, *ARO9*, *BNA3*, *YER152C*) zaprojektowano startery do reakcji PCR zawierające sekwencję CACC na końcu 5', komplementarną do wiszących końców zastosowanego wektora. Tak przygotowany insert klonowano do plazmidu a następnie transformowano do komórek *E. coli* według procedury Roz. 3.2.11.

Dodatkowo, każdy insert zaprojektowano w dwóch wariantach:

- z sekwencją nukleotydową kodującą domenę fuzyjną oligoHis (domena polihistydynowa złożona z sześć reszt histydynowych) na C końcu białka. Nie wykorzystano możliwości wprowadzenia domeny oligoHis przy pomocy sekwencji obecnej w plazmidzie pET101/D-TOPO[®], ponieważ wprowadzono by wówczas dodatkową sekwencję wynikającą z konstrukcji plazmidu. Takie działanie wydłużyłoby łańcuch aminokwasowy białka, a to mogłoby mieć wpływ na aktywność enzymu. Domenę oligoHis wprowadzono z wykorzystaniem zaprojektowanych specjalnie starterów do amplifikacji (Roz. 3.1.5). Domena ta daje możliwość szybszego i bardziej efektywnego oczyszczania białka z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa. Ponadto w przypadku niskiej nadprodukcji określonego białka, kiedy to trudno jest ocenić jego rzeczywistą obecność przy pomocy elektroforezy poliakrylamidowej SDS-PAGE, istnieje możliwość detekcji białka w ekstrakcie bezkomórkowym przy pomocy metody Western Blotting.

Wprowadzenie domeny oligoHis może wpłynąć na aktywność enzymów [Perron-Savard i in. 2005; Wu i Filutowicz 1999]. Zarówno na N końcu jak i na C końcu badanych białek, znajdują się reszty aminokwasowe, które prawdopodobnie mają znaczenie katalityczne (np. Lys29 i Arg463 w CaAro8p, Tab. 40). Jednakże ze względu na wiele korzyści wynikających z możliwości oczyszczania badanych białek z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa (m. in. krótki czas przygotowania preparatu dozowanego do kolumny, krótki czas rozdziału chromatograficznego, czystość końcowego preparatu) podjęto próbę konstrukcji białek rekombinantowych z domeną oligoHis na C końcu. Atutem takiej domeny jest wielkość (ok. 0,84 kDa). Jest to jedna z najmniejszych stosowanych obecnie domen fuzyjnych w chromatografii powinowactwa, zazwyczaj nie ma konieczności jej proteolitycznego odcinania [Terpe 2003].

Plazmidy ekspresyjne nazwano odpowiednio: pET101/D-TOPO + ARO8CH, pET101/D-TOPO + ARO9CH, pET101/D-TOPO + YERCH, pET101/D-TOPO + BNA3CH (Tab. 46).

- bez dodatkowej modyfikacji. Przygotowano plazmidy ekspresyjne z wprowadzonymi genami badanych białek bez modyfikacji sekwencji.

Plazmidy ekspresyjne nazwano odpowiednio: pET101/D-TOPO + ARO8, pET101/D-TOPO + ARO9, pET101/D-TOPO + YER152C, pET101/D-TOPO + BNA3 (Tab. 46).

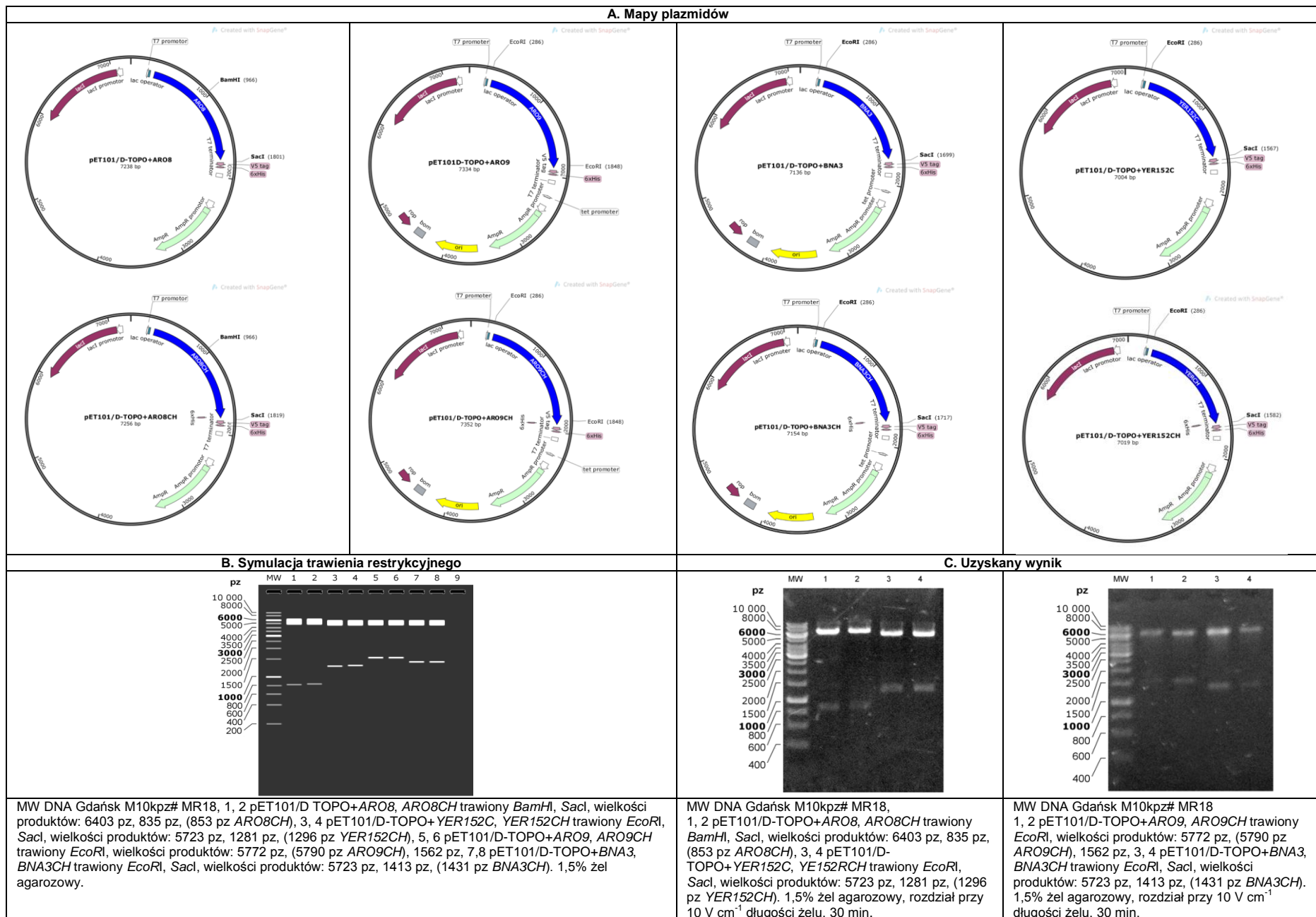
Ze względu na różnicę w translacji w komórkach grzybowych i bakteryjnych sekwencji nukleotydowych kodujących białka CaAro9p i CaBna3p (dokładniejsze informacje w Roz. 4.1), skonstruowane plazmidy ekspresyjne pET101/D-TOPO + ARO9, pET101/D-TOPO + ARO9CH, pET101/D-TOPO + BNA3, pET101/D-TOPO + BNA3CH poddano mutagenезie ukierunkowanej według procedury (Roz. 3.2.12). Zamieniono trójki CTG (nukleotydy C₅₉₂, T₅₉₃ oraz C₁₁₂₀, T₁₁₂₁ w sekwencji ARO9 oraz C₁₁₁₁ i T₁₁₁₂ w sekwencji BNA3) kodujące leucynę w komórkach *E. coli* na TCG kodujące serynę w komórkach *E. coli*. Po każdym etapie projektowania plazmidów ekspresyjnych wykonywano analizę restrykcyjną uzyskanych produktów (Roz. 3.2.7), a następnie wysyłało do sekwencjonowania. Skonstruowane plazmidy pozwoliły na uzyskanie białek o następującej sekwencji (Tab. 45):

Tab. 45 Sekwencje aminokwasowe badanych białek. Na **żółto** zaznaczono domenę fuzyjną oligoHis, na **czerwono** aminokwasy kodowane przez trójki nukleotydów CTG poddanych mutagenезie (Ser198 i Ser374 w CaAro9p i CaAro9Chp oraz Ser371 w CaBna3p i CaBna3Chp)

Nazwa białka	Sekwencja aminokwasowa
CaAro8p	MTSDTKPQAKDLTHLLSNESKARQTSPLKGIFKYYKQPGITFLGGGLPLSDYFPFEKVTADIPTPSFSGGIG APIEGENKTTIEVFKAADNVPDQIELARSLQYGSTFGLPEFLQFIKEHTDMVHKVPYENWDVIVSVGNTEA WDSTLRTFCSKGDILVEEYTFSSALESANGQGVNTVPVTMDEFGIPEKLEELMSRWVGNKPKFLYTICTG QNPTGSSLSAERRKQIYDIACKYDFLIIEDEPYFMQMETYTKDKAAREGKAVHDHDFLKLAVPSFISLDV EGRVVRDLDSFSKVLAPGLRLGWIVGQKDLLERYVRLHEVSVQNPSPGFSEALANALLRWGHSGLDWLIG LRAEYTHKRDVAIDALDQFVFPKEVSSFNPPVAGMFFVTLDASKHPKYKEFLEDPLKVEAAVHEQAIKQGC LLAPGSWFKAEGQSSPPQKNLPANPSHKTHIFFRGTAAVPLDQLVVGLEKFGKAVRAEFGL _{STOP}
CaAro8Chp	MTSDTKPQAKDLTHLLSNESKARQTSPLKGIFKYYKQPGITFLGGGLPLSDYFPFEKVTADIPTPSFSGGIG APIEGENKTTIEVFKAADNVPDQIELARSLQYGSTFGLPEFLQFIKEHTDMVHKVPYENWDVIVSVGNTEA WDSTLRTFCSKGDILVEEYTFSSALESANGQGVNTVPVTMDEFGIPEKLEELMSRWVGNKPKFLYTICTG QNPTGSSLSAERRKQIYDIACKYDFLIIEDEPYFMQMETYTKDKAAREGKAVHDHDFLKLAVPSFISLDV EGRVVRDLDSFSKVLAPGLRLGWIVGQKDLLERYVRLHEVSVQNPSPGFSEALANALLRWGHSGLDWLIG LRAEYTHKRDVAIDALDQFVFPKEVSSFNPPVAGMFFVTLDASKHPKYKEFLEDPLKVEAAVHEQAIKQGC LLAPGSWFKAEGQSSPPQKNLPANPSHKTHIFFRGTAAVPLDQLVVGLEKFGKAVRAEFGL HHHHHH _{STOP}
CaAro9p	MSDPTHLISKRAAGRTSVHFTNAPSDKPPANFKPHEKPLALSYGMPNHGFFPIDSIDVNLVDYFPQKITTPS TTSSTAEEPPSSSLNGSENGHQTKTPSSIHTPQSTVHISRHTTDPKIDLARGLQYAAVEGHAPLLQFAR DFIIRTHKPNYDDWNVFITGASDGLNKAADVFLDDGDVILVEEFTFSPFLRF S DNAGAKAVPVKINFNDNS DGIDLQFVDLLENWEKHYPNLPKPKALYTIATGQNPTGFTQSLFRKKIYDLAVKYDFAIIEDDPYGYLTLP KYEKPNIGGSGSGNNEKNDLEIDDYLNKHLTPSYLELDTTGRVLRVETFSKLFAPGLRGLGFIVGHKEVIDAV KNYSDVVNRGA S GLTQTIVNNVIQENFKGVGDWLEWILKMRLNYSYRKDLLYSIFESQAYKKGYYVDVIDP KAGMFVTFKINLPKDVVLDLQMKMLLWKLISYGILVVPYGNMTVDLEFSKDRSNFFRLCYALANNDEEILES GKRLTDAVYEFFSNGLEF _{STOP}
CaAro9Chp	MSDPTHLISKRAAGRTSVHFTNAPSDKPPANFKPHEKPLALSYGMPNHGFFPIDSIDVNLVDYFPQKITTPS TTSSTAEEPPSSSLNGSENGHQTKTPSSIHTPQSTVHISRHTTDPKIDLARGLQYAAVEGHAPLLQFAR DFIIRTHKPNYDDWNVFITGASDGLNKAADVFLDDGDVILVEEFTFSPFLRF S DNAGAKAVPVKINFNDNS DGIDLQFVDLLENWEKHYPNLPKPKALYTIATGQNPTGFTQSLFRKKIYDLAVKYDFAIIEDDPYGYLTLP KYEKPNIGGSGSGNNEKNDLEIDDYLNKHLTPSYLELDTTGRVLRVETFSKLFAPGLRGLGFIVGHKEVIDAV KNYSDVVNRGA S GLTQTIVNNVIQENFKGVGDWLEWILKMRLNYSYRKDLLYSIFESQAYKKGYYVDVIDP KAGMFVTFKINLPKDVVLDLQMKMLLWKLISYGILVVPYGNMTVDLEFSKDRSNFFRLCYALANNDEEILES GKRLTDAVYEFFSNGLEF HHHHHH _{STOP}
CaBna3p	MLRRLFPPIRQLYTTTRAMASKSTDPSTLHNPYFYQKPGQKDIWSLINETAAQAQQESGEPIVNLGGGFFSY NPPEFAINAVEEALTKPQFNQYAHARGNPNLLKQVAEHYSRSYGRAVGVDEVQITTGANEGMFAIFFAFLT PGDEVIVFEPFFDQYIPNVEMTGAKIKYVEIKPKFDNEVVTGQDWEIDWEGLNNAITDKTKIIVINTPHNPI GKVFTEEELYKIGKLAVEHNLILVSEVYENLYYTKDFPRPAALPQLPELAERTLTVGSAGKSFAATGWRVG YIQGANLIKVFVTAATHRICFSTPAPLQQAVSQGFEQAESNYFENTRKEYEHKYKIFTKVFDLGLPYTVA EGGYFVLVNL S KVIPADYEFPGTISDRGTLDKFLAYWLIKEIGVVGIPTTEFLTEWNRKGNLENCVRFVAV CKDSDVLEDAVERLKKLDYL _{STOP}

CaBna3CHp	MLRRLFPIRQLYTTTRAMASKSTDPTSLHNPYFYQKPGQKDIWSLINETAAQAQQESGEPIVNLGQGFFSY NPPEFAINAVEEALTKPQFNQYAHARGNPNLLKQVAEHYSRSYGRAVGVDEVQITTGANEGMFAIFFAFLT PGDEVIVFEPFFDQYIPNVEMTGAKIKYVEIKYPKKFDNEVVTGQDWEIDWEGLNNAITDKTKIIVINTPHNPI GKVFTTEEELYKIGKLAVEHNLILVSDEVYENLYYTDKFPRAALPQLPELAERTLTVGSAGKSFAATGWRVG YIQGPANLIKFVTAATHRICFSTPAPLQQAVSQGFQAESNYFENTRKEYEHKYKIFTKVFDLGLPYTVA EGGYFVLVNLKVKIPADYEPFGTISDRGTLDFKLAYWLIKEIGVVGIPPTFLETEWNRKGNLENCVRFVA CKDDSVLEDAVERLKKLKDYLHHHHHH _{STOP}
CaYer152Cp	MINFFKGHPRELLPVNEIADSYKRVLLDSYLSYDTPNQHPLQYGTDPGNLDVREVIQWVNNKFGA QVSDPNCINLTAGASYGVGNILTSVTSPKITQRFVVTPTYFLINSCFVDVGLDDRLEAIEETHNGKYSIDLVI LEQQLQKYSQDLEPVHDDINVPDPVRGTRKYRFRVYLVPTFSNPGGLNYLETRQKLVEIARKYDLLLLIS DDVYEFLDYTDKPLPRLNQLDKAGATKYGNTISNATFSKIIAPGLRVGWQETATPKLVDQLSITGSNRSGG TPNQLSTLVVADLIKTGTIDEIIAKFKNVYKERVAVLKESIAKYLQDQVYGGDGGYFVWVVTSPANCFDV VAKLAKQNVVLAGGEHFEVTGDKRNWQHCVRLSISYLTTEEIQGGIKIWGELLE _{STOP}
CaYer152CHp	MINFFKGHPRELLPVNEIADSYKRVLLDSYLSYDTPNQHPLQYGTDPGNLDVREVIQWVNNKFGA QVSDPNCINLTAGASYGVGNILTSVTSPKITQRFVVTPTYFLINSCFVDVGLDDRLEAIEETHNGKYSIDLVI LEQQLQKYSQDLEPVHDDINVPDPVRGTRKYRFRVYLVPTFSNPGGLNYLETRQKLVEIARKYDLLLLIS DDVYEFLDYTDKPLPRLNQLDKAGATKYGNTISNATFSKIIAPGLRVGWQETATPKLVDQLSITGSNRSGG TPNQLSTLVVADLIKTGTIDEIIAKFKNVYKERVAVLKESIAKYLQDQVYGGDGGYFVWVVTSPANCFDV VAKLAKQNVVLAGGEHFEVTGDKRNWQHCVRLSISYLTTEEIQGGIKIWGELLEHHHHHH _{STOP}

Tab. 46 Analiza restrykcyjna skonstruowanych plazmidów ekspresyjnych. A. Mapy plazmidów ekspresyjnych pET101/D-TOPO+ARO8, pET101/D-TOPO+ARO8CH, pET101/D-TOPO+ARO9, pET101/D-TOPO+ARO9CH, pET101/D-TOPO+YER152C, pET101/D-TOPO+YER152CH, pET101/D-TOPO+BNA3, pET101/D-TOPO+BNA3CH z zaznaczonymi miejscami cięcia restrykcyjnego, B. Symulacja żelu agarozowego uzyskanego po trawieniu restrykcyjnym plazmidów, C. Wynik analizy restrykcyjnej



4.3.2 Optymalizacja nadprodukcji badanych białek w komórkach ekspresyjnych *E. coli*

Do nadprodukcji rekombinantowych białek wykorzystano szczepy *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, *E. coli* Rosetta (DE3) pLacI, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, *E. coli* BL21 Star(DE3)TM, *E. coli* Origami2 (DE3) pLysS (Roz. 3.1.4). Trzy pierwsze szczepy pochodziły z kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii, komórki *E. coli* Origami 2 (DE3) pLysS z kolekcji Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, natomiast *E. coli* BL21 Star(DE3)TM to komórki z firmy Invitrogen zakupione wraz z wektorem pET101/D-TOPO[®]. Szczepy BL21 są najczęściej stosowanymi szczepami do nadprodukcji białek rekombinantowych, natomiast Rosetta umożliwiają sprawdzenie wpływu stężenia IPTG na poziom ekspresji wklonowanych genów [Rosano i Ceccarelli 2014]. Użyto głównie szczepy z wklonowanymi plazmidami pLysS i pLacI z serii pRARE, które umożliwiają wydajną ekspresję genów heterologicznych kodowanych przez rzadkie kodony w *E. coli*. Analiza bioinformatyczna wykazała, że badane geny posiadają rzadkie kodony, co mogłoby wpłynąć na ich niski poziom nadprodukcji w komórkach *E. coli* (Tab. 47). Użyto również szczepy Origami, które nie produkują białek reduktazy glutationowej gor i reduktazy tioredoksyny TrxB. Cytoplazma tych komórek jest środowiskiem o potencjale znacznie mniej redukującym, przez co zwiększona jest szansa na powstanie w ekspymowanym białku mostków disiarczkowych. W szczepach Origami jest mniejsza szansa na powstanie ciał inkluzyjnych lub degradację białek źle złożonych.

Tab. 47 Analiza bioinformatyczna badanych genów pod kątem obecności rzadkich kodonów w *E. coli*. CAI to indeks adaptacji kodonu (Codon Adaptation Index). CAI > 0,8 oznacza, że gen posiada mało rzadkich kodonów, a jego ekspresja w *E. coli* jest oceniana jako dobra. Im niższa wartość CAI tym wyższe prawdopodobieństwo, że gen będzie słabo ekspymowany. Analiza wykonana za pomocą programu genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis

Nazwa genu	<i>ARO8</i>	<i>ARO9</i>	<i>YER152C</i>	<i>BNA3</i>
CAI	0,64	0,65	0,60	0,63

Komórki transformowano skonstruowanymi plazmidami ekspresyjnymi według procedury (Roz. 3.2.3) a następnie prowadzono hodowlę według procedury (Roz. 3.2.13) w celu nadprodukcji białka rekombinantowego w systemie Tabora-Studiera [Tabor i Richardson 1985].

Optymalizowano:

- temperaturę i czas nadprodukcji (6-48 h, 20-37°C). W temperaturze 37°C nadprodukcję prowadzono najkrócej, 6 h. Fakt ten jest niewątpliwą zaletą wyboru tej temperatury. Obniżenie temperatury natomiast sprzyjało prawidłowemu fałdowaniu się struktury przestrzennej [Schein i Noteborn 1988; Vasina i Baneyx 1997; Vera i in. 2007]. Niższa temperatura zmniejsza prawdopodobieństwo agregacji co wynika z zależności hydrofobowych oddziaływań od temperatury [Baldwin 1986; Makhatadze i Privalov 1995; Schellman 1997]. W przypadku obniżenia temperatury nadprodukcji wzrost komórek bakteryjnych jest wolniejszy, w związku z tym wydłuża się czas nadprodukcji do 24-48 h, co umożliwia uzyskanie maksymalnej ilości nadprodukowanego białka,
- rodzaj i stężenie induktora. Do indukcji ekspresji używano laktozę bądź izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG) w stężeniu 0,05 - 0,1 mM. Niższe stężenie induktora zmniejsza ilość nadprodukowanego białka, tym samym może wpłynąć na zwiększenie jego

stabilności [Chen i in. 2003; Jhamb i Sahoo 2012]. Parametry te (rodzaj i stężenie induktora) nie miały wpływu na proces nadprodukcji badanych białek,

- gęstość optyczną komórek w chwili dodawania induktora do hodowli (OD_{600nm} 0,3 - 0,8). Najczęściej induktor dodaje się gdy hodowla komórkowa jest w połowie fazy logarytmicznego wzrostu ($OD_{600} = 0,3 - 0,4$). Istnieją jednak doniesienia uzyskania optymalnej nadprodukcji białka dla indukowanej hodowli w późnej fazie logarytmicznego wzrostu [Galloway i in. 2003; Ou i in. 2004]. Czasami wolniejsza nadprodukcja białka wpływa na jego poprawne fałdowanie i zmniejszenie stopnia agregacji,
- skład pożywki. Dzięki zmianie składu pożywki można wpłynąć na poziom wzrostu komórek bakteryjnych a tym samym zwiększyć ilość nadprodukowanego białka [Cui i in. 2006]. W badaniach wykorzystywano pożywkę LB pH 7 i pożywkę autoindukcyjną. Pożywka LB jest najbardziej popularną pożywką stosowaną do hodowli komórek *E. coli*, łatwą do przygotowania. Nie umożliwia jednak wzrostu komórek do osiągnięcia wysokiej gęstości optycznej, ze względu na niewielkie ilości węglowodanów i dwuwartościowych kationów [Sezonov i in. 2007]. Zmiana składu pożywki może umożliwić uzyskanie większej gęstości hodowli komórkowej [Studier 2005]. Jednym z czynników jaki może pomóc jest zwiększenie zdolności buforowej pożywki [Madurawe i in. 2000; Studier 2005], ponieważ w trakcie wzrostu komórek w pożywce środowisko ulega zakwaszeniu co hamuje dalszy rozwój hodowli. Do modyfikacji nadprodukcji białek stosowano również pożywkę autoindukcyjną [Studier 2005]. Pożywka ta zawiera zoptymalizowane ilości glukozy, laktozy i glicerolu. Na początku wzrostu komórki pobierają glukozę jako źródło węgla. Następnie po wyczerpaniu glukozy w pożywce, pobierany jest glicerol i laktoza (zwykle w fazie równowagi lub w późnej fazie wykładniczego wzrostu) co równocześnie powoduje indukcję ekspresji [Studier 2014]. Użycie takiej pożywki pozwala na uzyskanie większej gęstości optycznej komórek, jest również wygodne ze względu na brak konieczności kontrolowania gęstości optycznej przed dodaniem induktora,

Zastosowanie pożywki indukcyjnej oraz LB buforowanej nie wpłynęło na poziom nadprodukcji badanych białek.

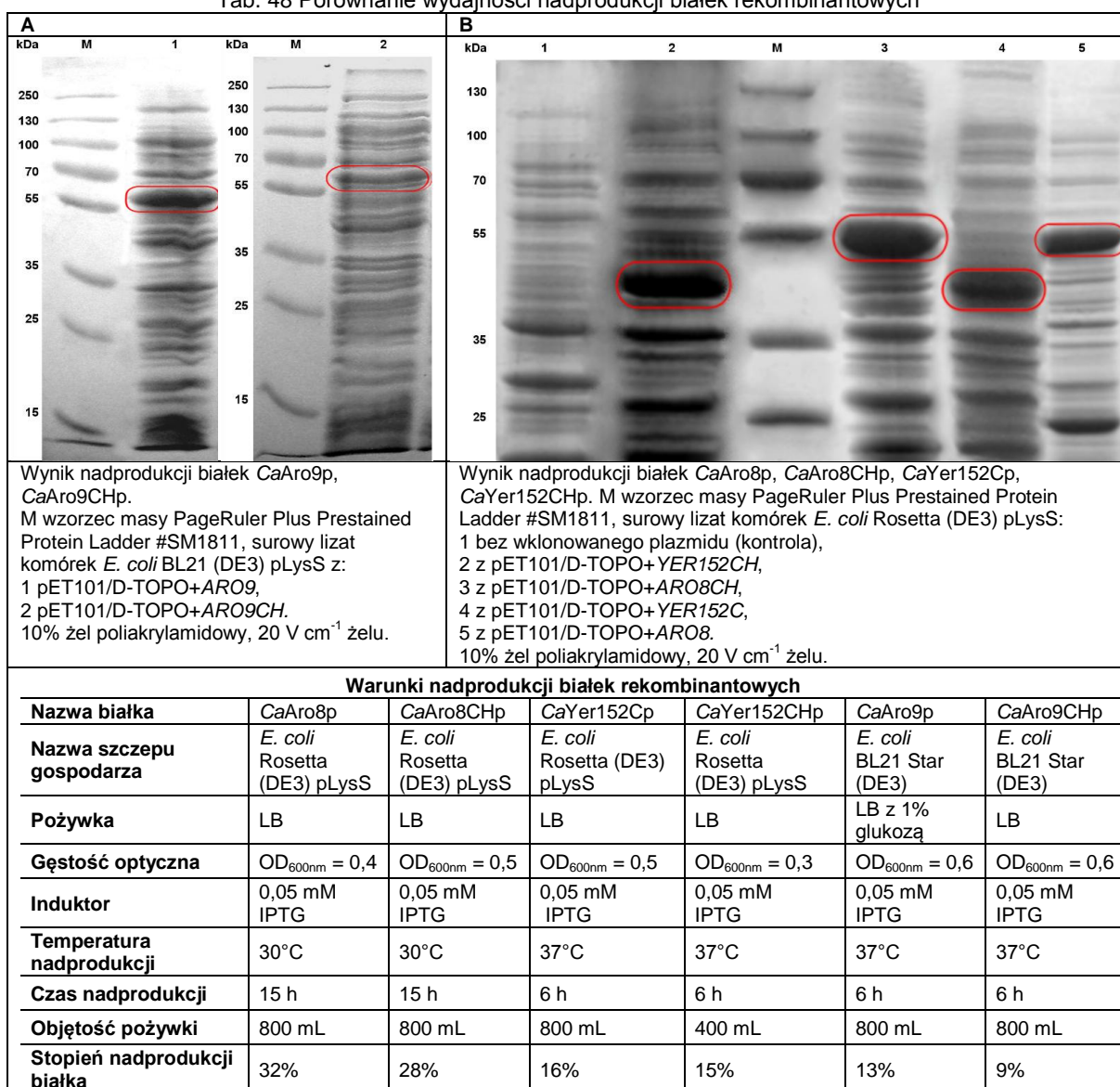
W celu optymalizacji ilości nadprodukowanych białek zastosowano również dodatki do pożywki LB. Dodawano 1% glukozy, 4% glicerolu, 3% etanolu lub 0,5 M sorbitolu lub zamiast ampicyliny zastosowano karbanicylinę. Dodatek glukozy czy glicerolu do pożywki zawierającej pepton hamuje indukcję promotora *lac* spowodowaną obecnością laktozy w pożywce (większa kontrola nadprodukcji) [Al-Samarrai i in. 2013; Studier 2005]. Sorbitol zwiększa ciśnienie osmotyczne pożywki powodując akumulację osmoprotektantów w komórce stabilizujących strukturę natywną białka [Blakwell i Horgan 1991]. Wpływ etanolu na nadprodukcję białka nie jest do końca wyjaśniony, jednakże wiadomo, że dokonuje zmian w płynności błony [Dombek i Ingram 1984; Ingram i Buttke 1984], w transporcie przez błonę [Ingram i Buttke 1984], zmienia skład lipidów błonowych [Ingram i Buttke 1984; Ingram 1986]. Zmiany te mogą wpływać na replikację DNA, co prowadzi do wzmocnienia syntezy DNA [Basu i Poddar 1994]. Wzmocnienie syntezy DNA prowadzi natomiast do

amplifikacji genu, a to do zwiększenia nadprodukcji białka [Chhetri i in. 2015]. Karbenicylina jest bardziej odporna na działanie β -laktamaz wydzielanych przez komórki *E. coli*. Inaktywacja karbenicyliny przebiega wolniej niż ampicyliny. Dodając karbenicylinę do hodowli unika się więc zanieczyszczenia hodowli komórkami *E. coli* bez wklonowanego plazmidu co daje większą kontrolę nadprodukcji [Sambrook i in. 2001],

- ilość pożywki (200-800 mL). Od ilości pożywki zależy napowietrzenie hodowli. Ograniczenie tlenu wyzwała ekspresję ponad 200 genów, zdolności metaboliczne komórki dostosowują się do dostępności tlenu, a ten stan wpływa negatywnie na wzrost hodowli [Unden i in. 1995].

Przygotowywano próby do elektroforezy SDS-PAGE z hodowli komórkowych i sprawdzano poziom nadprodukcji białek. Po analizie wyników wybierano optymalne warunki nadprodukcji (Tab. 48).

Tab. 48 Porównanie wydajności nadprodukcji białek rekombinantowych

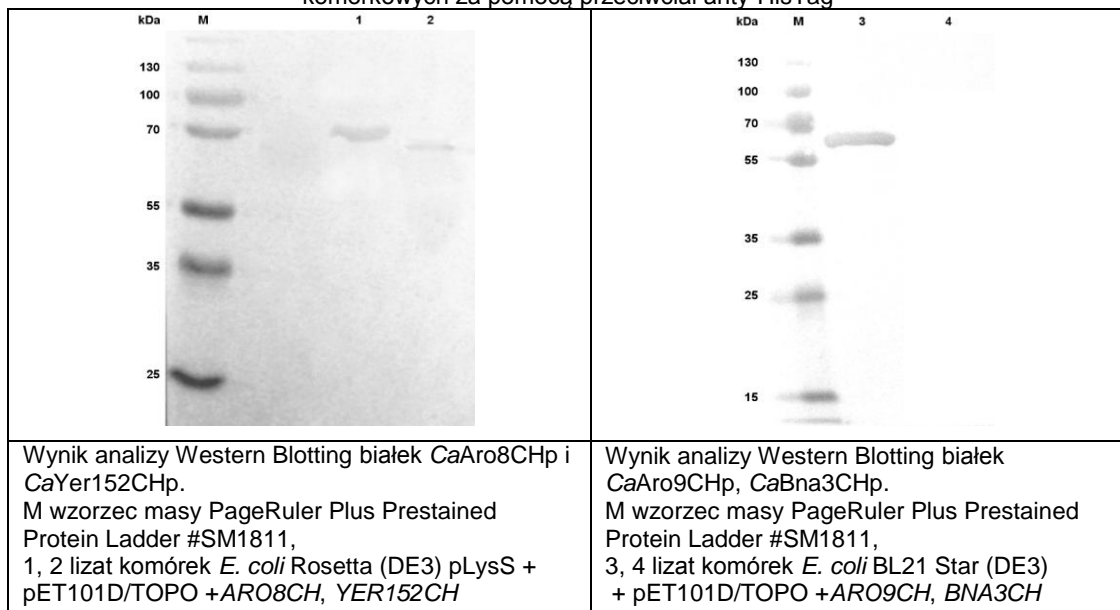


Po przeanalizowaniu różnych warunków nadprodukcji badanych białek ustalono:

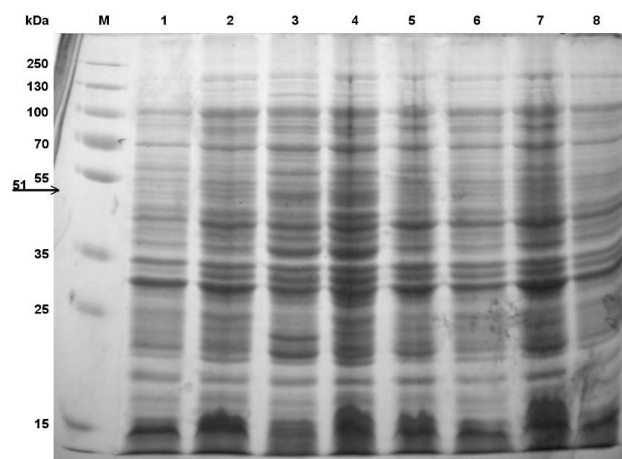
- najlepsze parametry nadprodukcji *CaAro8p*, *CaAro8CHp*, *CaYer152Cp*, *CaYer152CHp* uzyskano w *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS natomiast *CaAro9p* i *CaAro9CHp* w *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Wszystkie geny nadprodukowanych białek zawierają rzadkie kodony w *E. coli*, w związku z czym były najlepiej eksprymowane w szczepach zawierających plazmid pLysS z serii pRARE,
- optymalna temperatura i czas nadprodukcji białek *CaAro8p*, *CaAro8CHp* wynosi 30°C i 15 h natomiast dla *CaAro9p*, *CaAro9CHp*, *CaYer152Cp* i *CaYer152CHp* 37°C i 6 h nadprodukcji
(Roz. 3.2.13). Krótszy czas nadprodukcji umożliwia oczyszczanie białka następnego dnia bez opóźnienia związanego z koniecznością przygotowania osadu komórkowego. Wymaga jednak zamrożenia osadu. Dłuższy czas nadprodukcji umożliwia oczyszczanie białka następnego dnia bez konieczności mrożenia. Nie zauważono jednak żeby przechowywanie osadu w -20°C miało wpływ na oczyszczanie białek rekombinantowych, ich aktywność czy zdolność do krystalizacji. Obniżenie temperatury nadprodukcji poniżej 30°C i wydłużenie czasu nadprodukcji powyżej 18 h nie wpłynęło na poprawę ilości nadprodukowanego białka czy na poprawę jego fałdowania,
- optymalne stężenie induktora IPTG wynosiło 0,05 mM dla nadprodukcji wszystkich białek. Dodatek laktozy do hodowli w celu indukcji nadprodukcji nie wpłynął na poprawę procesu,
- dla wszystkich procesów nadprodukcji optymalny moment indukcji to czas gdy hodowla komórkowa jest w połowie fazy logarytmicznego wzrostu,
- w większości przypadków optymalną pożywką do nadprodukcji białek była pożywka LB. W przypadku *CaAro9p* dopiero dodatek 1% glukozy umożliwił uzyskanie efektu nadprodukcji,
- tylko w przypadku *CaYer152CHp* należało zmniejszyć ilość pożywki do 400 mL podczas prowadzenia nadprodukcji. W przypadku innych białek zmiana napowietrzenia pożywki w trakcie procesu nadprodukcji nie miała wpływu na ilość białka rekombinantowego.

W celu potwierdzenia obecności białek fuzyjnych *CaAro8CHp*, *CaAro9CHp*, *CaYer152CHp*, *CaBna3CHp* w lizatach komórkowych, zastosowano technikę Western Blotting z użyciem monoklonalnych przeciwciał anty-HisTag (Roz. 3.2.21) specyficznie rozpoznających domeny polihistydynowe (Tab. 49).

Tab. 49 Immunodetekcja białek *CaAro8CHp*, *CaAro9CHp*, *CaYer152CHp*, *CaBna3CHp* w lizatach komórkowych za pomocą przeciwciał anti-HisTag



Uzyskane wyniki potwierdziły obecność nadprodukowanych białek *CaAro8CHp*, *CaAro9CHp*, *CaYer152CHp* w lizatach komórkowych. Nie udało się natomiast uzyskać nadprodukcji białka *CaBna3CHp*. Pomimo optymalizacji wyżej wymienionych parametrów, jak również sposobu przygotowania hodowli (według wskazówek Protein Expression and Purification Core Facility, Heidelberg, https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/index.html) czy napowietrzania (zwiększenia szybkości wytrząsania w przedziale 160-220 rpm) nie uzyskano nadprodukcji białek *CaBna3p* i *CaBna3CHp*. Nie zaobserwowano nadprodukcji w ekstraktach bezkomórkowych ani w formie rozpuszczalnej ani w osadzie, w postaci tzw. kamienia białkowego (przykładowy wynik optymalizacji Rys. 44).



Rys. 44 Optymalizacja nadprodukcji *CaBna3p* i *CaBna3CHp* (ok. 51 kDa) w komórkach *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. M wzorzec masowy PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811, 1 (5) *CaBna3p* (*CaBna3CHp*), stężenie induktora IPTG 0,05 mM, gęstość optyczna komórek w chwili dodawania induktora do hodowli $OD_{600} = 0,5$, temperatura nadprodukcji 37°C, czas nadprodukcji 6 h, pożywka LB, 2 (6) *CaBna3p* (*CaBna3CHp*), stężenie induktora IPTG 0,05 mM, gęstość optyczna komórek w chwili dodawania induktora do hodowli $OD_{600} = 0,5$, temperatura nadprodukcji 30°C, czas nadprodukcji 18 h, pożywka LB, 3 (7) *CaBna3p* (*CaBna3CHp*), stężenie induktora IPTG 0,05 mM, gęstość optyczna komórek w chwili dodawania induktora do hodowli $OD_{600} = 0,5$, temperatura nadprodukcji 37°C, czas nadprodukcji 6 h, pożywka LB + 1% glukozy, 4 (8) *CaBna3p* (*CaBna3CHp*), temperatura nadprodukcji 30°C, czas nadprodukcji 18 h, pożywka autoindukcyjna. 10% żel poliakrylamidowy, 20 V cm⁻¹ żelu

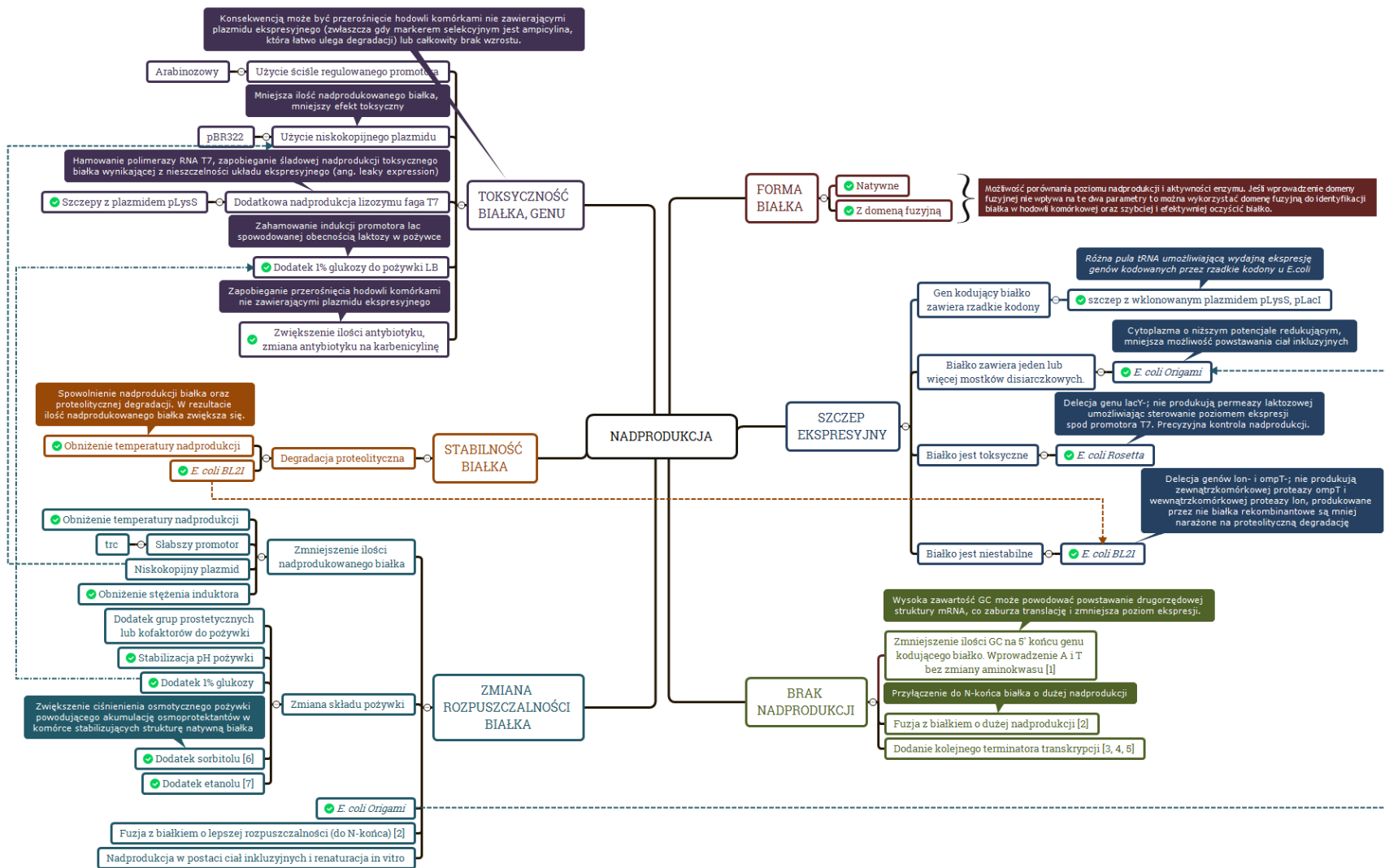
Pomimo braku widocznej nadprodukcji białka CaBna3CHp na żelu poliakrylamidowym i pozytywnego wyniku Western Blotting (immunodetekcja za pomocą przeciwciał anti-HisTag, czułość $\geq 0,15$ ng) podjęto próbę oczyszczania białka z wykorzystaniem kolumny do chromatografii metalopowinowactwa HisTrapFF (Roz. 3.2.15) - również z negatywnym skutkiem.

Wyciągnięto następujące wnioski (podjęte kroki w celu optymalizacji nadprodukcji oraz możliwe kolejne działania zostały podsumowane na Rys. 45):

- brak nadprodukcji nie jest spowodowany toksycznością genów, czy też białek CaBna3p, CaBna3CHp, ponieważ:
 - szczepy z wklonowanymi plazmidami ekspresyjnymi rosły identycznie jak szczep dziki,
 - dodatek glukozy do pożywki, zapewniający bardziej ścisłą kontrolę nadprodukcji (zahamowanie indukcji promotora *lac* spowodowanej obecnością laktozy w pożywce), nie wpłynął na poprawę procesu,
 - zmiana antybiotyku na karbenicylinę (co zapobiega przerośnięciu hodowli komórkami, które utraciły plazmid ekspresyjny) nie wpłynęło na poprawę procesu,
- brak nadprodukcji CaBna3p i CaBna3CHp nie jest spowodowany destabilizacją białka w komórce gospodarza. Zmiana temperatury nadprodukcji czy użycie szczepów, które nie produkują zewnątrzkomórkowej proteazy ompT i wewnątrzkomórkowej proteazy lon nie wpłynęły na poprawę procesu,
- białko CaBna3CHp nie jest produkowane ani w formie rozpuszczalnej w ekstrakcie bezkomórkowym ani w osadzie (w formie kamienia białkowego), co potwierdziła analiza metodą Western Blotting,
- wprowadzenie domeny fuzyjnej oligoHis nie wpłynęło na nadprodukcję białka,
- wprowadzenie mutacji punktowych do plazmidów ekspresyjnych nie wpłynęło na nadprodukcję białek. Podjęto próbę ekspresji genów *BNA3* i *BNA3CH* z użyciem plazmidów przed przeprowadzeniem mutagenyzy ukierunkowanej. Bez pozytywnego efektu.

W celu uzyskania nadprodukcji białek CaBna31p, CaBna32p warto rozważyć dodanie kolejnego terminatora transkrypcji [Hayashi i Hayashi 1985; Newbury i in. 1987; Vasquez i in. 1989] czy zmniejszenie ilości GC na 5' końcu genów kodujących białka (bez wprowadzania zmian

w sekwencji aminokwasowej) [Mirzadeh i in. 2015]. To ostatnie działanie byłoby bardziej czasochłonne i wymagałoby wprowadzania wielokrotnych mutacji (optymalizacji reakcji PCR, oczyszczanie, sekwencjonowanie). Kolejna propozycja rozwiązania braku nadprodukcji to fuzja z białkiem o dużej nadprodukcji [Tsunoda i in. 2005]. To działanie mogłoby jednak stwarzać problemy z późniejszym oczyszczaniem białka i oznaczaniem jego aktywności. Jeżeli zaproponowane metody nie umożliwiłyby uzyskanie nadprodukowanego białka należałoby podjąć próbę nadprodukcji w komórkach grzybowych. Nie podjęto wymienionych zadań ze względu na brak czasu na ich realizację.

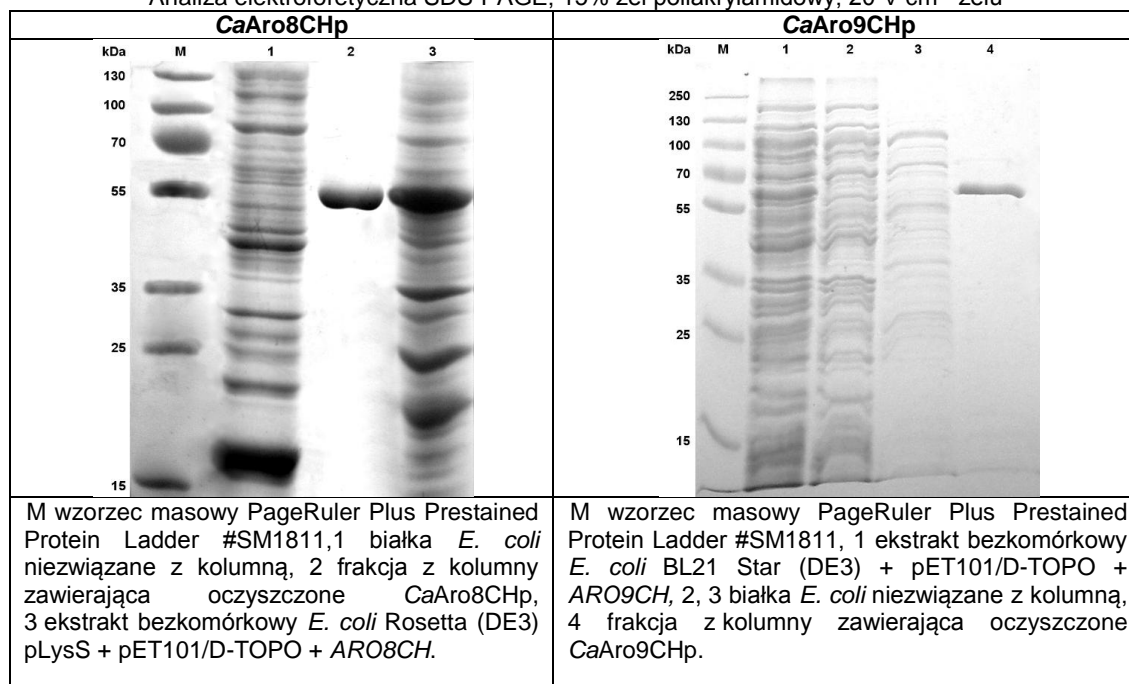


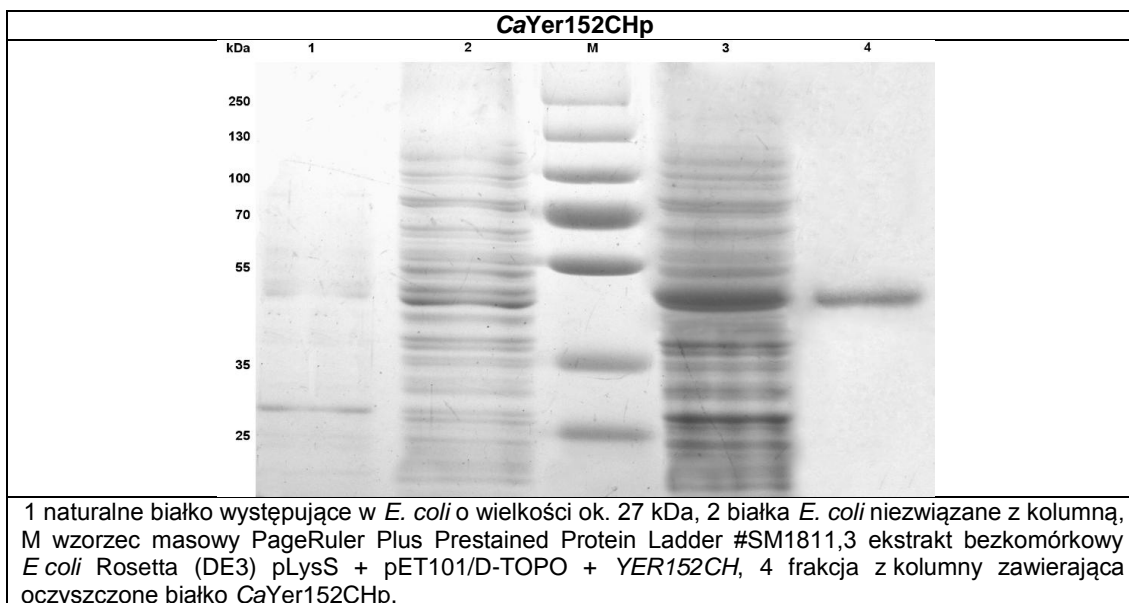
Rys. 45 Optymalizacja nadprodukcji białka. Podjęte działania (zaznaczone na zielono) i zaproponowane kolejne rozwiązania. [1] Mirzadeh i in. 2015, [2] Tsunoda i in. 2005, [3] Hayashi i Hayashi 1985, [4] Newbury i in. 1987, [5] Vasquez i in. 1989, [6] Blakwell i Horgan 1991, [7] Chhetri i in. 2015

4.3.3 Optymalizacja oczyszczania rekombinowanych białek

Białka rekombinantowe z domeną fuzyjną oligoHis (*CaAro8CHp*, *CaAro9CHp*, *CaYer152CHp*) oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii matalopowinowactwa (Roz. 3.2.15). Białka zawierające domenę HisTag selektywnie wiązały się ze złożem, a następnie były wymywane wraz ze zwiększającym się stężeniem imidazolu. Zastosowano 20 mM bufor Tris-HCl pH 8 z 5 mM i 500 mM imidazolem, dla białek *CaAro8CHp* i *CaYer152CHp* oraz 20 mM bufor Tris-HCl pH 8,5 z 5 mM i 500 mM imidazolem dla białka *CaAro9CHp*. Również w buforze Tris-HCl wykonywano filtrację żelową przed krystalizacją białek *CaAro8CHp* i *CaAro9CHp* oraz oznaczano aktywność badanych białek. Jednakże, do przechowywania białek rekombinantowych zmieniano bufor na 50 mM bufor fosforanowy, pH 7,5, 10% glicerol, gdyż w takich warunkach białka dłużej zachowywały swoją aktywność enzymatyczną. Metodę oczyszczania optymalizowano pod kątem dobrania pH buforu, stężenia początkowego imidazolu, ilości buforu do wstępnego przemywania kolumny. Z każdej frakcji dającej sygnał w postaci piku chromatograficznego przygotowywano próby do elektroforezy SDS-PAGE (Roz. 3.2.6) w celu sprawdzenia wydajności procesu oczyszczania (Tab. 50). Zastosowana metoda oczyszczania okazała się bardzo skuteczna, szybka i wygodna. Zdecydowana większość białek *E. coli* nie wiązała się ze złożem i była wymywana przy 5 mM stężeniu imidazolu (początkowe stężenie imidazolu zastosowane w eluencie A). Podczas oczyszczania nie zaobserwowano strat białek rekombinantowych, co świadczy o dobrym dobraniu warunków rozdziału (białka doskonale wiążą się z zastosowanym złożem). W ciągu mniej niż 15 min uzyskiwano czysty preparat białkowy (czystość $\geq 99\%$) o wysokim stężeniu.

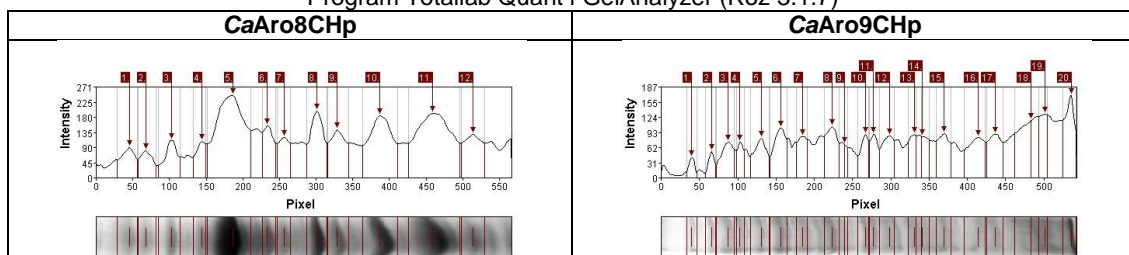
Tab. 50 Wynik oczyszczania białek rekombinantowych z domeną oligoHis z lizatu komórkowego *E. coli*. Analiza elektroforetyczna SDS-PAGE, 15% żel poliakrylamidowy, 20 V cm^{-1} żelu

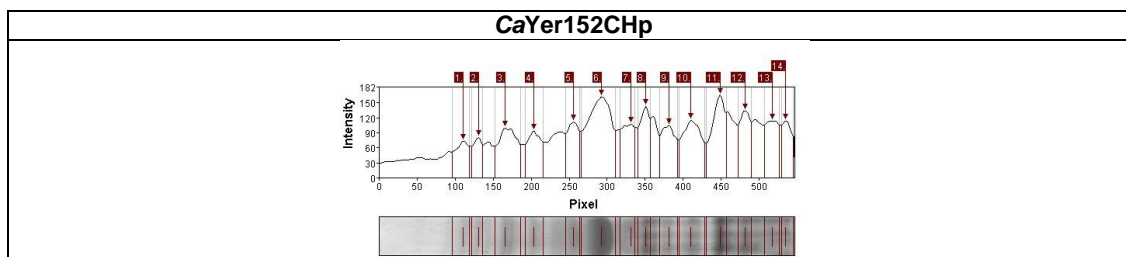




Odczyn buforów do oczyszczania wybierano na podstawie danych literaturowych dotyczących optymalnego pH działania ScAro8p i ScAro9p i zastosowanej metody oczyszczania dla tych białek [Chen i in. 2009; Karsten i in. 2011]. Zastosowane profile elucji dla CaAro8CHp, CaAro9CHp i CaYer152CHp były praktycznie identyczne. Aby przyspieszyć procedurę oczyszczania stosowano modyfikację warunków przedstawionych dla białka CaAro8CHp (program elucji: 0-2,5 min 15% B, 2,5 min do 15 min 15%-100% B liniowo, przepływ 5 mL min⁻¹). Taka modyfikacja umożliwiała jedynie na zaoszczędzenie 5 - 7 min. W przypadku przygotowywania białka CaAro8CHp do krystalizacji, starano się jednak w możliwie jak najkrótszym czasie uzyskać czysty preparat, gdyż dłuższe przechowywanie mogłoby wpłynąć na niestabilność enzymu, utratę aktywności czy utworzenie się nowych form oligomerycznych co zaburzyłoby proces krystalizacji [Stewart i Baldock 1999]. W przypadku oczyszczania białek z ekstraktu bezkomórkowego przygotowanego z 800 mL lub 1200 mL hodowli, zwiększano ilość buforu stosowanego do wstępnego przemywania kolumny z 20 mL do 30 mL. Na podstawie analizy densytometrycznej rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE nadprodukowanych białek rekombinantowych (Tab. 51) ustalono, że poziom nadprodukcji CaAro8CHp, CaYer152CHp, CaAro9CHp wynosił odpowiednio 23%, 15% i 9% wszystkich białek z ekstraktu bezkomórkowego. Największą nadprodukcję uzyskano dla CaAro8CHp. Duży poziom nadekspresji ARO8CH świadczy o stabilnym układzie ekspresyjnym i braku toksyczności badanego białka w stosunku do komórek gospodarza.

Tab. 51 Analiza densytometryczna rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE ekstraktu bezkomórkowego komórek *E. coli* nadprodukujących białka rekombinantowe CaAro8CHp, CaAro9CHp, CaYer152CHp. Program Totallab Quant i GelAnalyzer (Roz 3.1.7)

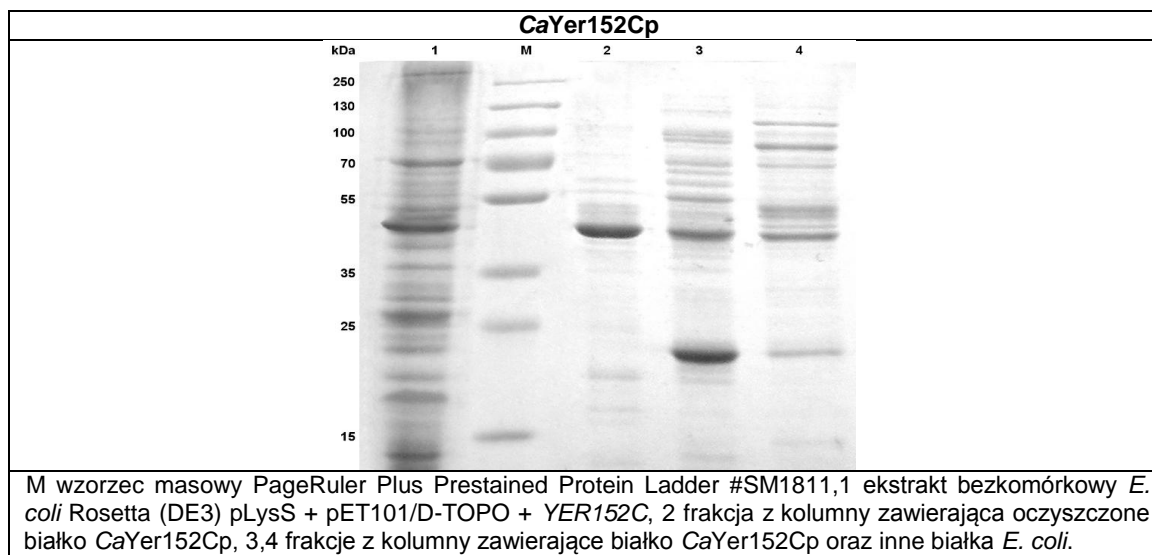




Białka rekombinantowe CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp, oczyszczano z zastosowaniem kolumny anionowymiennej Resource Q (Roz. 3.2.16). Ze względu na zasadę rozdzielania w chromatografii jonowymiennej, pH zastosowanych eluentów powinno być przynajmniej o jedną wartość wyższe niż pI rozdzielanych białek (Roz. 4.1). pH 7 spełniało ten wymóg. Istotnym elementem oczyszczania białek z zastosowaniem kolumny ResourceQ okazała się prędkość rozdzielania. Zwiększenie szybkości przepływu eluentu powyżej 1 mL min⁻¹ skutkowało znacznym obniżeniem rozdzielczości co przekładało się na czystość końcowego preparatu. Wyższa prędkość zaburzała oddziaływanie białek ze złożem, słabiej związane wypływały szybciej z kolumny przy niższym stężeniu soli.

Tab. 52 Wynik oczyszczania białek rekombinantowych CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp z lizatu komórkowego *E. coli*. Analiza elektroforetyczna SDS-PAGE, 15% żel poliakrylamidowy, 20 V cm⁻¹ żelu

CaAro8p							CaAro9p										
kDa	M	1	2	3	4	5	6	kDa	M	1	2	3	4	5	6	7	8
250								250									
130								130									
100								100									
70								70									
55								55									
35								35									
25								25									
								15									
<p>M wzorzec masowy PageRuler Plus Prestained Protein Ladder#SM1811, 1 frakcja białek <i>E. coli</i> związanych z kolumną silniej niż CaAro8p, 2 frakcja z kolumny zawierające białko CaAro8p oraz inne białka <i>E. coli</i>, 3 frakcja z CaAro8p, 4 próba dozowana do kolumny Resource Q, 5 próba białkowa przygotowana z nierozpuszczalnych fragmentów komórki, 6 ekstrakt bezkomórkowy <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS + pET101/D-TOPO + ARO8.</p>							<p>M wzorzec masowy PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811, 1 ekstrakt bezkomórkowy <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)+ pET101/D-TOPO + ARO9, 2 próba dozowana do kolumny Resource Q, 3 białka <i>E. coli</i> niezwiązane z kolumną, 4, 5 zanieczyszczona frakcja z białkiem CaAro9p, 6 frakcja z kolumny zawierająca białko CaAro9p, 7, 8 frakcje z kolumny zawierające inne białka <i>E. coli</i> związane silniej z kolumną niż CaAro9p.</p>										

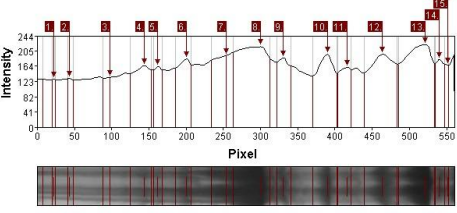
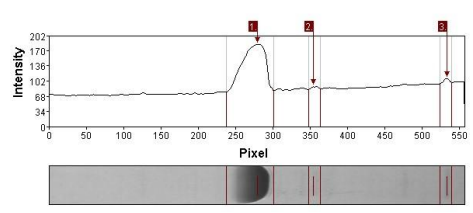
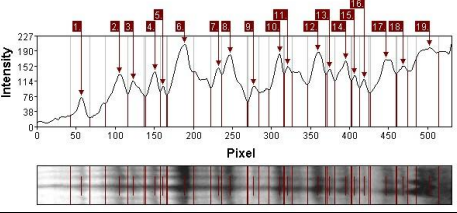
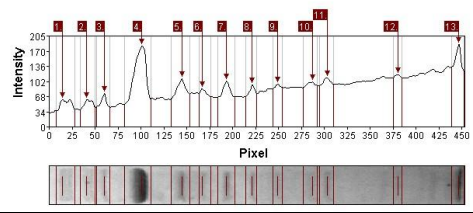
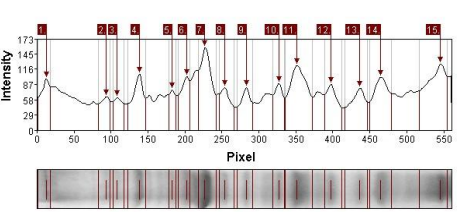
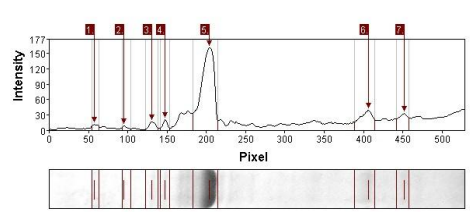


Ekstrakt bezkomórkowy zawierający białka rekombinantowe *CaAro8p*, *CaAro9p* lub *CaYer152Cp* poddawano wstępnemu oczyszczaniu. Najpierw usuwano kwasy nukleinowe przy pomocy siarczanu streptomycyny, gdyż mogłyby zaburzyć rozdział chromatograficzny. Następnie wysalano białka przy pomocy siarczanu amonu. W tym etapie wytrącano badane białko. Część białek, które nie ulegały wysoleniu odrzucano, uzyskując tym samym bardziej jednorodny preparat z białkiem rekombinantowym. Nie optymalizowano stężenia siarczanu streptomycyny, jak i siarczanu amonu. Wykorzystano protokół opracowany wcześniej w Katedrze Technologii Leków i Biochemii. Nadmiar soli usuwano przy pomocy kolumny HiTrap Desalting. Próbkę zanieczyszczona solą uniemożliwiłaby oczyszczenie badanych białek przy pomocy chromatografii jonowymiennej, gdyż jony soli związałyby się ze złożem, białka natomiast wypłynęłyby z kolumny. Oczyszczanie badanych białek optymalizowano pod kątem doboru pH w eluentach, ilości buforu do wstępnego przemywania kolumny, prędkości przepływu eluentów. Z każdej frakcji dającej sygnał w postaci pików chromatograficznego przygotowywano próby do elektroforezy SDS-PAGE (Roz. 3.2.6) w celu sprawdzenia wydajności procesu oczyszczania (Tab. 52).

Ustalono (Tab. 53), że białko *CaAro8p* stanowi $\leq 41\%$ wszystkich białek w ekstrakcie bezkomórkowych komórek *E. coli* natomiast czystość oczyszczonego preparatu białkowego *CaAro8p* (ścieżka 3, Tab. 52) ustalono na $\geq 91\%$. Podczas przygotowania ekstraktu bezkomórkowego wykazano straty ok. 80% początkowej ilości białka *CaAro8p* nadprodukowanego w komórkach bakteryjnych. Wykazano, że większość nadprodukowanego białka *CaAro8p* znajduje się we frakcji nierozpuszczalnej (w postaci ciał inkluzyjnych, tzw. kamienia białkowego). Aby zwiększyć rozpuszczalność nadprodukowanego białka obniżono temperaturę nadprodukcji do 30°C. Taki zabieg spowodował zmniejszenie strat na tym etapie z ok. 80% na 40% (Tab. 52, ścieżka 5 i 6). W związku z dużą nadprodukcją białka *CaAro8p* zdecydowano, że korzystniej jest ponieść straty na tym etapie na poziomie ok. 40% niż poszukiwać nowych warunków nadprodukcji (nowy układ ekspresyjny, inny szczep ekspresyjny, inne warunki nadekspresji). Oczyszczanie *CaAro8p* z tak przygotowanego ekstraktu komórkowego umożliwiła na uzyskanie wysokiej rozdzielczości rozdziału (ze względu

na mniejsze stężenie białka w preparacie dozowanym do kolumny, gdyż część została odrzucona ze względu na powstanie kamienia białkowego) co przedłożyło się na wysokie stężenie preparatu białka CaAro8p o czystości $\geq 91\%$. Takie parametry umożliwiły przeprowadzanie dalszych analiz enzymu. Poszukiwanie nowych warunków nadprodukcji czy oczyszczania generowałoby straty odczynników i czasu pracy.

Tab. 53 Analiza densytometryczna prób białkowych zawierających białka CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp. Program Totallab Quant i GelAnalyzer (Roz 3.1.7)

<p>CaAro8p</p>		
<p>CaAro9p</p>		
<p>CaYer152Cp</p>		

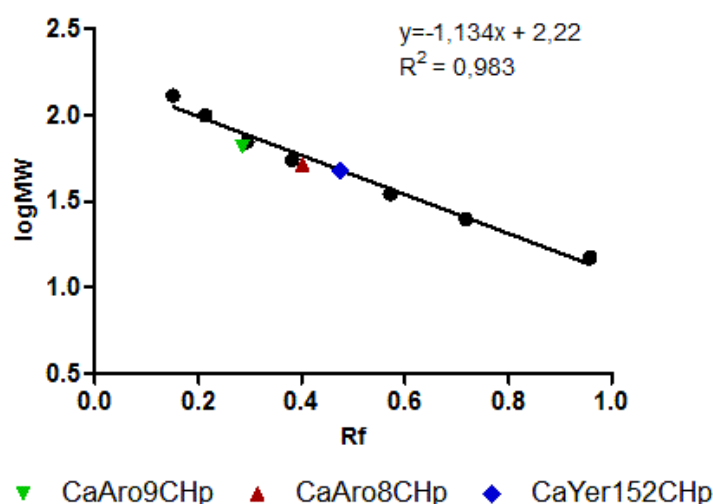
Poziom nadprodukcji białka CaAro9p ustalono na 13% (Tab. 53) puli wszystkich białek w ekstrakcie bezkomórkowym a czystość oczyszczonego preparatu białkowego CaAro9p (ścieżka 3, Tab. 52) ustalono na $\geq 18\%$. Niska czystość preparatu białkowego z CaAro9p nie wpłynęła na dalsze wyniki badań ani na charakter pracy. Pomimo niejednorodności próby białkowej, przygotowanie próby do krystalizacji CaAro9p odbywało się tak samo jak w przypadku preparatu z CaAro8p o wyższej czystości $\geq 91\%$. Do przygotowania próby do krystalizacji CaAro9p pobierano frakcję 6, którą następnie poddawano filtracji żelowej. Na tym etapie pozbywano się zanieczyszczeń, które mogłyby zaburzać proces krystalizacji. Ze względu na dużą nadprodukcję białka CaAro9p stwierdzono, że korzystniej jest ponieść straty

nadprodukowanego białka wynikające z odrzucenia bardziej niejednorodnych frakcji 4 i 5 (Tab. 52) niż poszukiwać nowe metody oczyszczania co powodowałoby niepotrzebne zużycie odczynników i stratę czasu.

Poziom nadprodukcji białka CaYer152Cp ustalono na 16% puli białek w ekstrakcie bezkomórkowym. Natomiast czystość próby CaYer152Cp oczyszczanej na kolumnie Resource Q ustalono na 61%. Straty wynikające ze wstępnego podczyszczania ekstraktu bezkomórkowego wynosiły aż 32% nadprodukowanej ilości białka. Straty na takim poziomie przy tak niskiej nadprodukcji białka CaYer152Cp znacząco wpływały na dalszy charakter pracy z białkiem.

4.3.4 Wyznaczenie masy cząsteczkowej i struktury oligomerycznej

Wyznaczono masy cząsteczkowe natywnych i zdenaturowanych białek. Wprowadzenie domeny oligoHis nie wpłynęło na strukturę oligomeryczną badanych białek a tylko nieznacznie zmieniło masę cząsteczkową. Zamieszczono więc wyniki tylko dla białek zawierających domenę oligoHis.



Rys. 46 Wyznaczenie masy cząsteczkowej zdenaturowanych białek CaAro8CHp, CaAro9CHp, CaYer152CHp na podstawie krzywej wzorcowej pasm białkowych wzorca masowego PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811

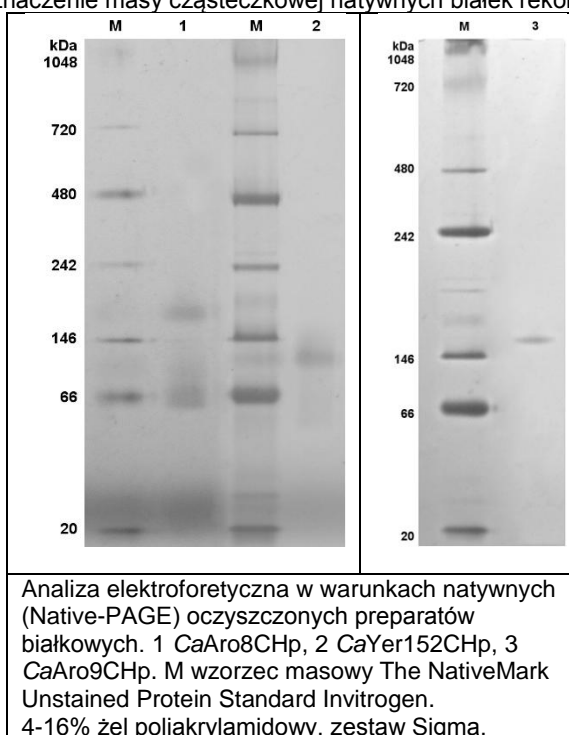
Masę cząsteczkowa pojedynczej podjednostki białka rekombinantowego wyznaczono na podstawie analizy bioinformatycznej (program ProtParam [Artimo i in. 2012], Roz. 4.1) oraz przy pomocy elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE. Analizując wyniki elektroforezy wyznaczono krzywą wzorcową $\log MW = f(R_f)$ dla pasm białkowych wzorca masowego PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811 (Rys. 46). Do otrzymanego równania prostej podstawiono współczynniki ruchliwości elektroforetycznej R_f wyznaczone dla badanych białek. Masy cząsteczkowe wyznaczone dla pojedynczych podjednostek badanych białek przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE są bardzo zbliżone do wartości wyliczonych poprzez analizę bioinformatyczną (Tab. 54).

Tab. 54 Wyznaczone masy cząsteczkowe zdenaturowanych białek rekombinantowych

Białko	CaAro8CHp	CaYerCHp	CaAro9CHp
SDS-PAGE	55 ± 9 kDa	48 ± 2kDa	66 ± 7 kDa
Analiza bioinformatyczna	55,5 kDa	47,3 kDa	59,6 kDa

Masę cząsteczkową natywnych białek wyznaczono przy pomocy filtracji żelowej i elektroforezy w warunkach natywnych. Preparaty białkowe oczyszczone przy pomocy chromatografii metalopowinowactwa poddano filtracji żelowej według procedury (Roz. 3.2.18). Dla białka CaAro8CHp uzyskano masę cząsteczkową równą 74 ± 8 [kDa]. Wynik elektroforezy w warunkach natywnych zawiera dwa sygnały odpowiadające masie 70 ± 11 [kDa] i 142 ± 40 [kDa] (Tab. 55, Tab. 56). Białko CaAro8CHp może zatem występować zarówno w formie dimeru jak i monomeru.

Tab. 55 Wyznaczenie masy cząsteczkowej natywnych białek rekombinantowych



Wyniki uzyskane dla białek CaYer152CHp i CaAro9CHp są podobne. Masa cząsteczkowa białka CaYer152CHp wyliczona z chromatografii żelowej wynosi 63 ± 6 [kDa] natomiast białka CaAro9CHp wynosi 79 ± 8 [kDa], wyniki w obu przypadkach są zbliżone do masy monomeru (masa monomeru CaYer152CHp wyliczona za pomocą analizy bioinformatycznej wynosi 47,3 kDa, a dla CaAro9CHp 59,6 kDa), natomiast opierając się na wyniku z elektroforezy natywnej stwierdzono przewagę formy dimerycznej $MW_{CaYer152CHp} = 97 \pm 27$ [kDa], $MW_{CaAro9CHp} = 151 \pm 23$ [kDa] (Tab. 55, Tab. 56).

Różnice w określeniu struktury oligomerycznej za pomocą filtracji żelowej i elektroforezy natywnej mogły być spowodowane różnym czasem jaki upłynął pomiędzy oczyszczaniem a zadozowaniem próby oraz różnym stężeniem białka w analizowanym preparacie (mogły się wytworzyć nowe formy oligomeryczne), czułością zastosowanej metody. Natomiast różnice dotyczące wyliczonej masy cząsteczkowej badanego białka za pomocą filtracji żelowej

a teoretycznie wyliczoną masą pojedynczej podjednostki wynikać mogą ze zużycia zastosowanej kolumny Superdex 200 (nie dokładna analiza).

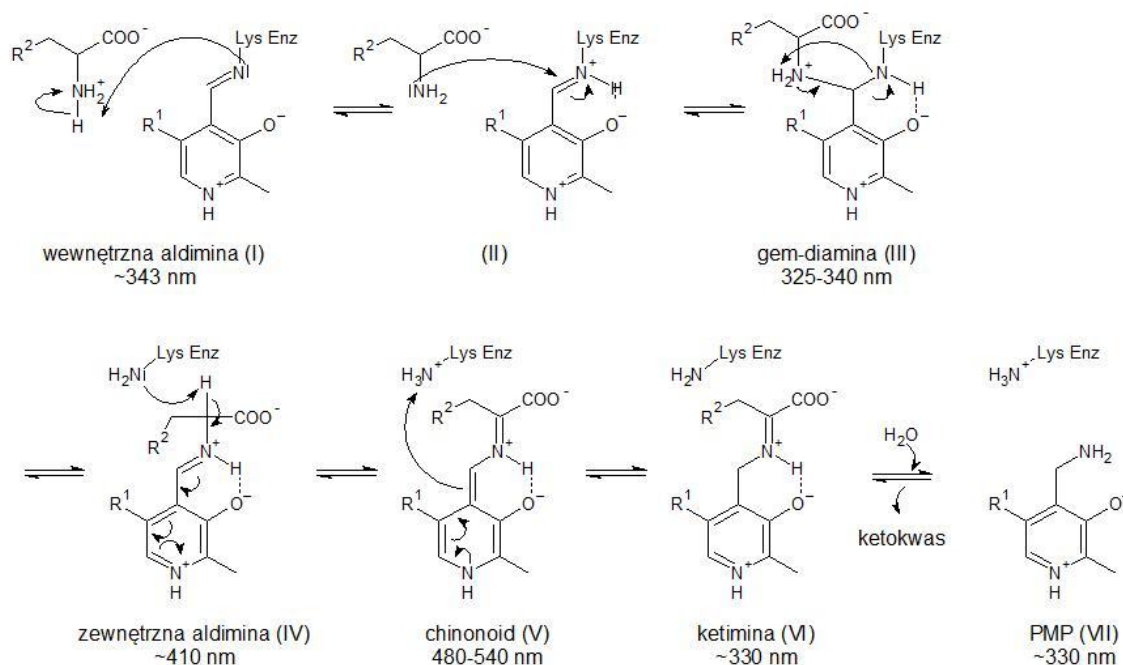
Tab. 56 Wyznaczone masy cząsteczkowe natywnych białek rekombinantowych

Nazwa białka	Masa cząsteczkowa/forma oligomeryczna	
	Filtracja żelowa $\pm 10\%$ błędu	Native Page $\pm 15\%$ błędu
CaAro8CHp	74 \pm 8 kDa / monomer	70 \pm 11 [kDa] / monomer 142 \pm 40 [kDa] / dimer
CaAro9CHp	79 \pm 8 [kDa] / monomer	151 \pm 23 [kDa] / dimer
CaYer152CHp	63 \pm 6 [kDa] / monomer	97 \pm 27 [kDa] / dimer

Występowanie aminotransferazy w formie monomeru nie jest znane w literaturze. Alaninowe aminotransferazy z *P. furious* i *C. maltosa* są dimerami [Umemura i in. 1994; Ward i in. 2000]. Podobny rezultat uzyskano dla białka ScAro8p oraz dla AmAA z *T. thermophilus* (TfLysNp) czy ludzkiej α -aminotransferazy L-kinureninowej/L- α -aminoadypinowej II (hKATIIP) [Bulfer i in. 2013; Han i in. 2008b; Tomita i in. 2009]. Strukturę dimeryczną przedstawiono też dla asparaginowych aminotransferaz z *B. subtilis* i *E. coli* [Smith i in. 1989; Sung i in. 1990].

4.3.5 Potwierdzenie zdolności wiązania PLP

Aminotransferazy należą do grupy enzymów, których aktywność uzależniona jest od obecności fosforanu pirydoksalu jako koenzymu. Celem sprawdzenia, czy badane enzymy wiążą PLP wykonano widma absorpcyjne w zakresie od 300 do 550 nm. W tym bowiem obszarze pojawiają się dwa charakterystyczne maksima widma absorpcyjnego PLP, przy 320 nm i 380 nm [Dršata i in. 2005].

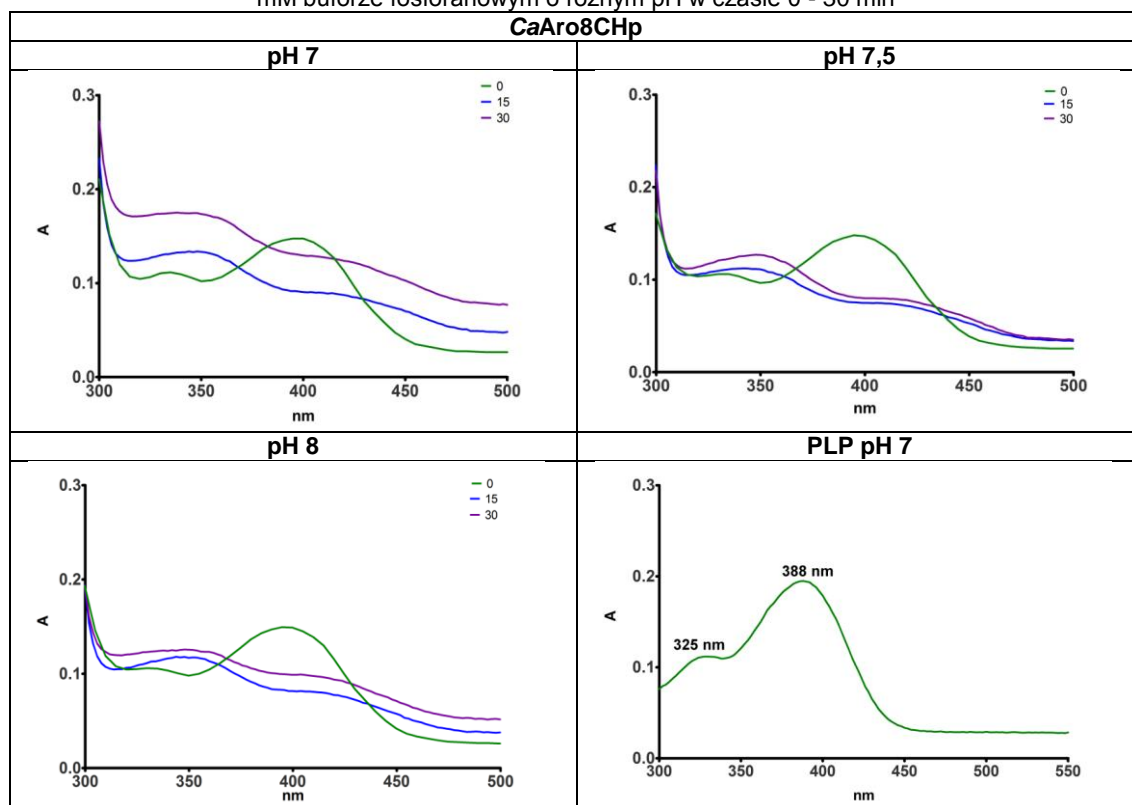


Rys. 47 Schemat mechanizmu reakcji katalizowanej przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową [na podstawie Karsten i in. 2011]

Bezpośrednio po dodaniu PLP do próby z białkiem CaAro8CHp zaobserwowano dwa piki w widmie absorpcyjnym, przy 335 nm i 400 nm (Tab. 57). Po 15 min nastąpiło przesunięcie piku z 335 nm na 350 nm świadczące o powstaniu niesprotonowanej wewnętrznej aldminy

(Rys. 47 I). Ta wartość maksimum absorpcji różni się o 6 nm od wartości maksimum absorpcji niesprotonowanej aldiminy tworzonej przez ScAro8p i PLP (344 nm) [Karsten i in. 2011]. Najczęściej jednak, wartość maksimum absorpcji dla niesprotonowanej aldiminy jest bliższa 360 nm, tak jak w przypadku ludzkiej tyrozynowej aminotransferazy [Sivaraman i Kirsh 2006], asparaginowej aminotransferazy z *E. coli* [Toney i Kirsh 1993] czy aromatycznej aminotransferazy z *E. coli* [Hayashi i in. 1993]. Forma niesprotonowanej wewnętrznej aldiminy dla wymienionych aminotransferaz dominuje w wyższym pH. Po 15 min od dodania PLP do próby z białkiem CaAro8CHp nastąpiło również przesunięcie maksimum piku z 400 nm do 420 nm. Zmiana ta jest spowodowana powstaniem sprotonowanej formy wewnętrznej aldiminy, ketoenaminy (Rys. 47 II). Związany proton jest współdzielony pomiędzy iminowy azot i tlen O³ koenzymu [Kallen i in. 1985]. Wartość absorpcji dla tej formy wynosi 430 nm dla ludzkiej tyrozynowej aminotransferazy [Sivaraman i Kirsh 2006], asparaginowej aminotransferazy z *E. coli* [Toney i Kirsh 1993] i aromatycznej aminotransferazy z *E. coli* [Hayashi i in. 1993]. Uzyskane widma potwierdzają wytworzone wiązanie pomiędzy enzymem CaAro8CHp i PLP.

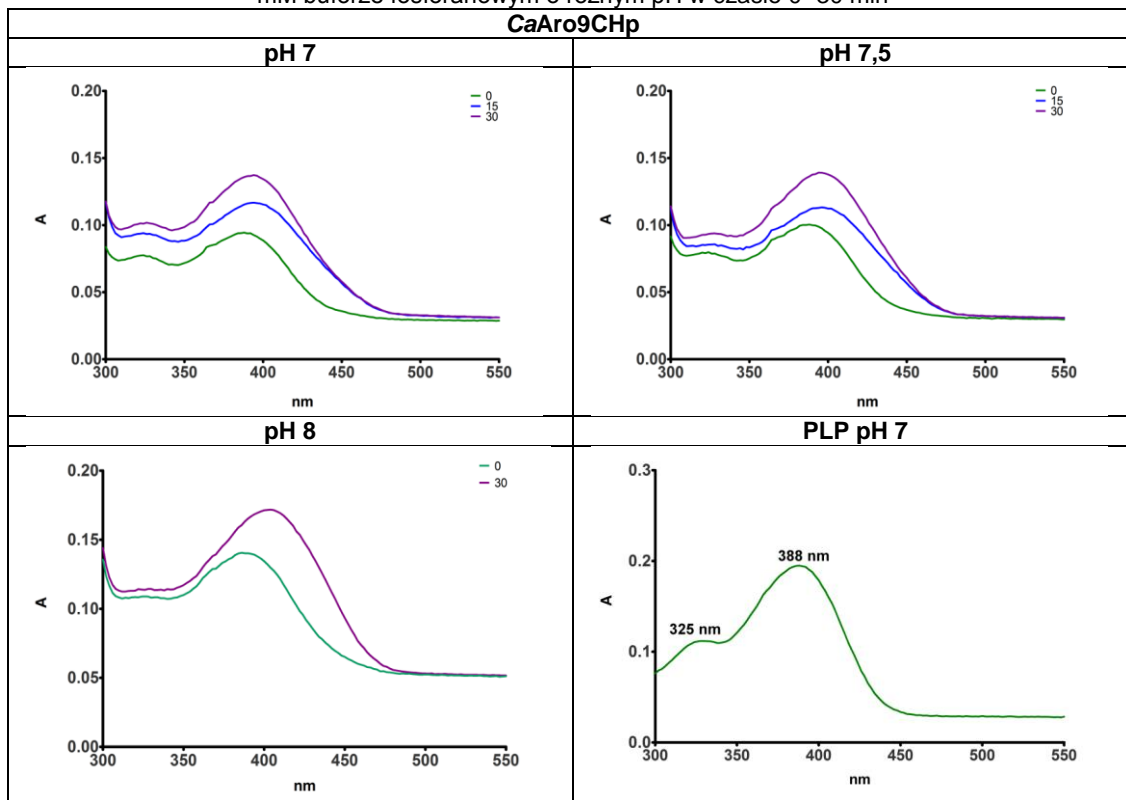
Tab. 57 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 500 nm dla CaAro8CHp [1 mg mL⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym o różnym pH w czasie 0 - 30 min



Na widmach CaAro9CHp ze związanym PLP znajdują się piki przy ~325 nm i ~400 nm (Tab. 58). Widma te wyglądają praktycznie identycznie jak widmo dla wolnego PLP. Może to świadczyć o obecności wolnego PLP w miejscu aktywnym enzymu. Taką sytuację zaobserwowała grupa Toney i Kirsh w przypadku asparaginowej aminotransferazy z *E. coli* [Toney i Kirsh 1993]. W przypadku asparaginowej aminotransferazy z *E. coli* dopiero dodatek donora grupy aminowej umożliwia wiązanie PLP i zaobserwowanie powstania wewnętrznej aldiminy [Toney i Kirsh 1993]. Dla CaAro9CHp dodatek donora grupy aminowej (kwasu L- α -

aminoadypinowego czy kwasu L-glutaminowego) do preparatu z białkiem i PLP nie umożliwił zaobserwowania związania PLP (brak przesunięcia absorpcji w kierunku wyższych długości fali 350 nm i 430 nm). Umożliwił natomiast obserwacje powstawania PMP, o czym świadczy wzrost absorpcji przy 325 nm i spadek przy ~ 400 nm (Tab. 59). Jest to dowód na to, że enzym CaAro9CHp katalizuje reakcję charakterystyczną dla aminotransferazy wykorzystując PLP.

Tab. 58 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 550 nm dla CaAro9CHp [1 mg mL^{-1}] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym o różnym pH w czasie 0- 30 min



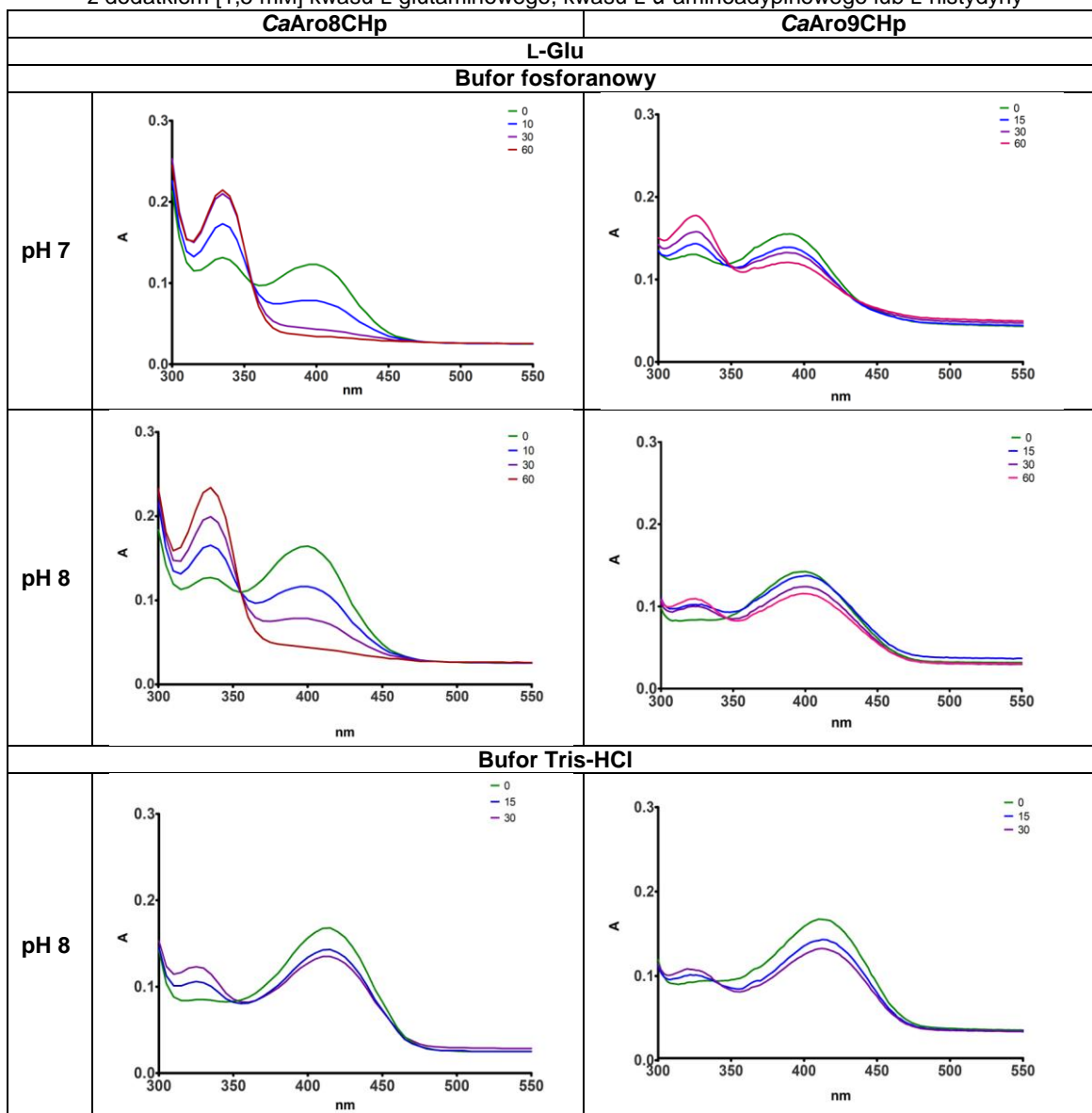
Po dodaniu donora grupy aminowej nie zaobserwowano zmian w widmie świadczących o powstaniu wewnętrznej aldminy z dwóch prawdopodobnych powodów:

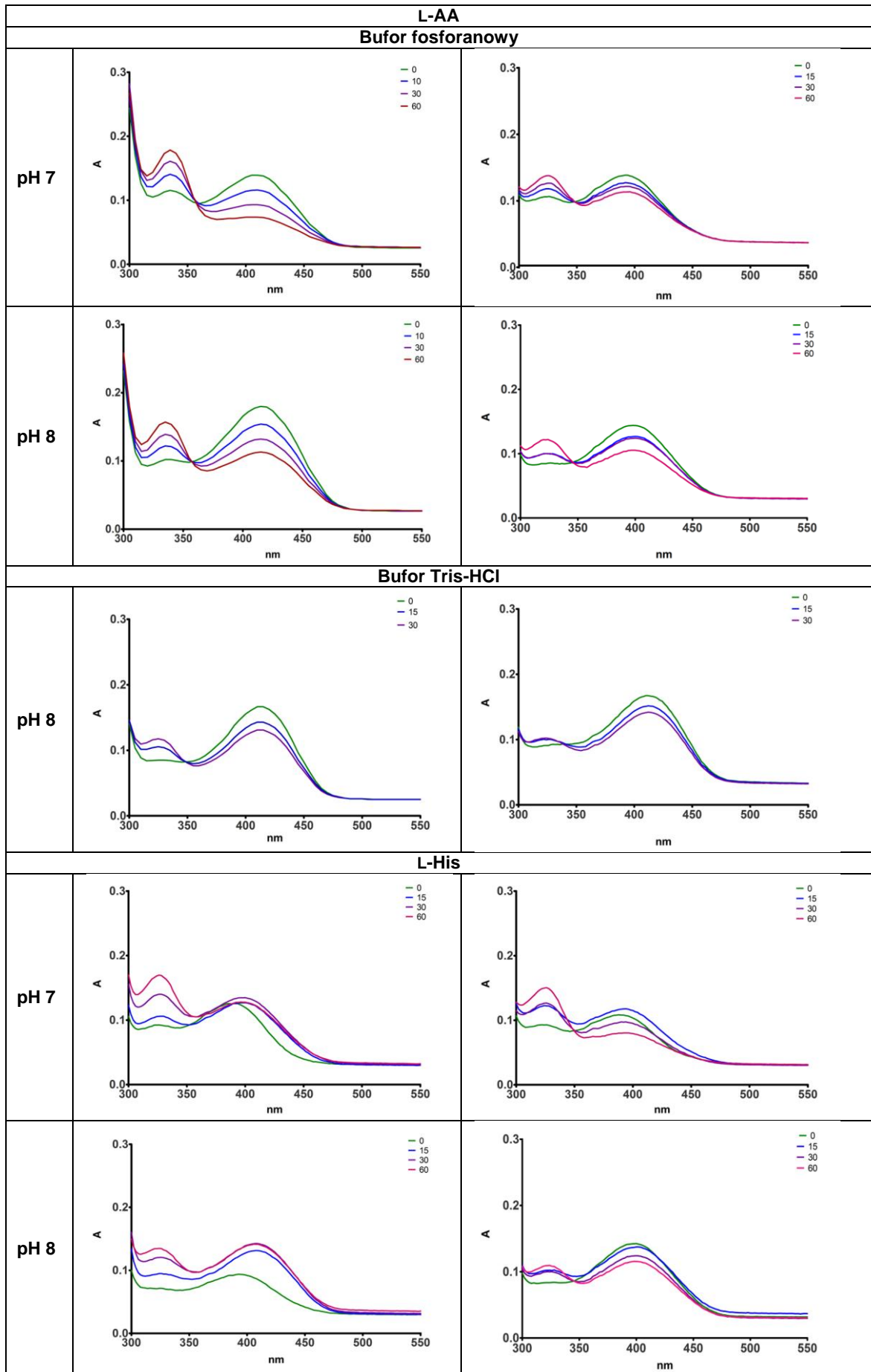
- białko CaAro9p miało już w swojej strukturze związaną cząsteczkę PLP, obraz widma zaburzał wolny kofaktor PLP dodany do buforu podczas wykonywania badania. Tą tezę potwierdzają wyniki krystalizacji białka gdzie pomimo braku dodatku PLP do próby krystalizacyjnej białko wykryzalizowało ze związanym PLP w centrum aktywnym (Roz. 4.3.9.2),
- tak jak w przypadku asparaginowej aminotransferazy z *E. coli* [Toney i Kirsh 1993], w miejscu aktywnym enzymu znajdowała się niezwiązana cząsteczką PLP, a ze względu na zbyt duży odstęp czasu pomiędzy kolejnymi pomiarami (15 min) niemożliwa była obserwacja powstawania produktu pośredniego reakcji (wewnętrznej aldminy).

Widma PLP dla CaAro8CHp i CaAro9CHp mierzone w czasie po dodaniu źródła grupy aminowej umożliwiając zaobserwowanie powstawania PMP (Tab. 59) (Rys. 47, VII) czyli przebiegu początkowej fazy reakcji charakterystycznej dla aminotransferaz. CaAro8CHp znacznie szybciej przekształca PLP w PMP niż CaAro9CHp, niezależnie od użytego donora

grupy aminowej i pH. Reakcja z kwasem L-glutaminowym katalizowana przez CaAro8CHp zachodzi znacznie szybciej niż z wykorzystaniem kwasu L- α -aminoadypinowego czy L-histydyny. CaAro9CHp najszybciej przekształca PLP w PMP w przypadku dodania L-histydyny.

Tab. 59 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 550 nm dla CaAro8CHp i CaAro9CHp [po 1 mg mL⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym i 100 mM buforze Tris-HCl o różnym pH w czasie 0- 60 min z dodatkiem [1,5 mM] kwasu L-glutaminowego, kwasu L- α -aminoadypinowego lub L-histydyny

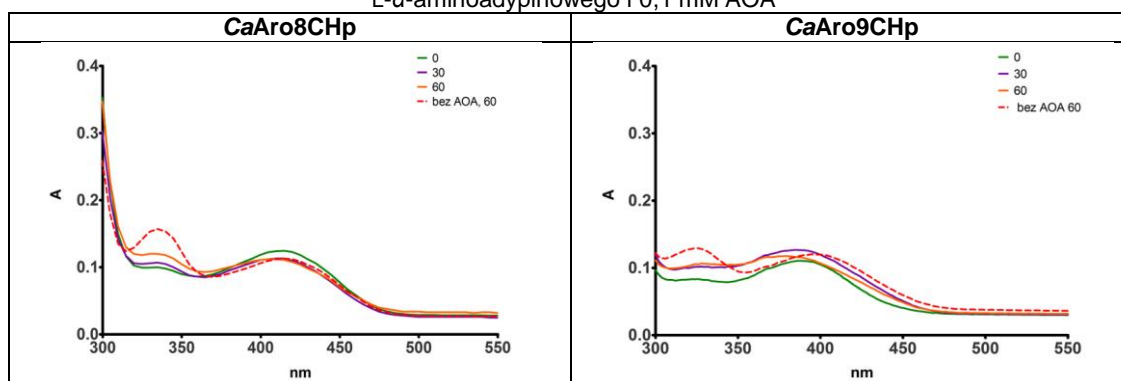




Zauważono różnice w widmach wykonywanych w buforze fosforanowym i w buforze Tris-HCl o pH 8. Białko CaAro8CHp wytwarzało PMP z udziałem L-Glu znacznie mniej efektywnie w buforze Tris-HCl niż w buforze fosforanowym. Maksimum piku zostało przesunięte z ~400 nm (bufor fosforanowy) do 415 nm (bufor Tris-HCl). Niewielkie różnice w szybkości wytwarzania PMP zauważono również dla białka CaAro8CHp z udziałem L-AA. Białko CaAro9CHp katalizowało reakcje wytwarzania PMP z identyczną szybkością w obu buforach. Nie wyjaśniono widocznych różnic. W literaturze znany jest przypadek inhibicji hKAT1p w buforze Tris-HCl [Han i in. 2004]. Grupa Han zasugerowała, że aminowa grupa cząsteczki Tris w środowisku zasadowym może oddziaływać z kompleksem enzym-PLP i obniżać aktywność aminotransferazową hKAT1p. Również dla hKAT1p zauważono przesunięcie maksimum piku z 400 nm w buforze fosforanowym do 415 nm w buforze Tris [Han i in. 2004].

Wykonano również widma absorpcyjne z dodatkiem aminooctanu (AOA), inhibitora aminotransferaz zależnych od PLP [Preuss i in. 2013; Wallach 1961]. Z badań literaturowych wynika, że grupa aminowa AOA wiąże się kowalencyjnie z atomem C4A PLP i zapobiega powstawaniu PMP [Marković-Housley i in. 1996; Wybenga i in. 2012]. Wykonane widma absorpcyjne potwierdziły, że AOA blokuje reakcje katalizowane przez CaAro8CHp i CaAro9CHp. Absorpcja przy 325 nm, świadcząca o powstawaniu PMP w uzyskanych widmach, po dodaniu AOA, jest stała w czasie i niższa od absorpcji przy tej długości fali dla próby bez dodatku inhibitora (Tab. 60), Oznacza to, że po dodaniu inhibitora AOA następuje zahamowanie pierwszego etapu reakcji katalizowanej przez aminotransferazy.

Tab. 60 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 550 nm dla CaAro8CHp i CaAro9CHp [po 1 mg mL⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym pH 7,5 w czasie 0- 60 min z dodatkiem 1,5 mM kwasu L- α -aminoadypinowego i 0,1 mM AOA



Pomimo dodatku AOA do badanych prób, zaobserwowano powstanie niewielkich ilości PMP. Taka sytuacja związana jest ze sposobem wykonania widm i oczyszczania białek. Po pierwsze zanim AOA związało się w mieszaninie reakcyjnej z PLP, enzym mógł już w tym czasie wykorzystać część wolnego PLP znajdującego się w próbce i wytworzyć PMP a po drugie, jak pokazały późniejsze badania krystalizacyjne (Roz. 4.3.9.3), pomimo braku dodatku PLP podczas wykonywania oczyszczania białek, enzym mógł posiadać już związaną w swojej strukturze cząsteczkę PLP, którą wykorzystał do wytworzenia PMP. Uzyskany wynik dowodzi, że CaAro8CHp i CaAro9CHp są enzymami PLP zależnymi.

Nie wykonano widm absorpcyjnych dla białek CaYer152CHp i CaYer152Cp ponieważ:

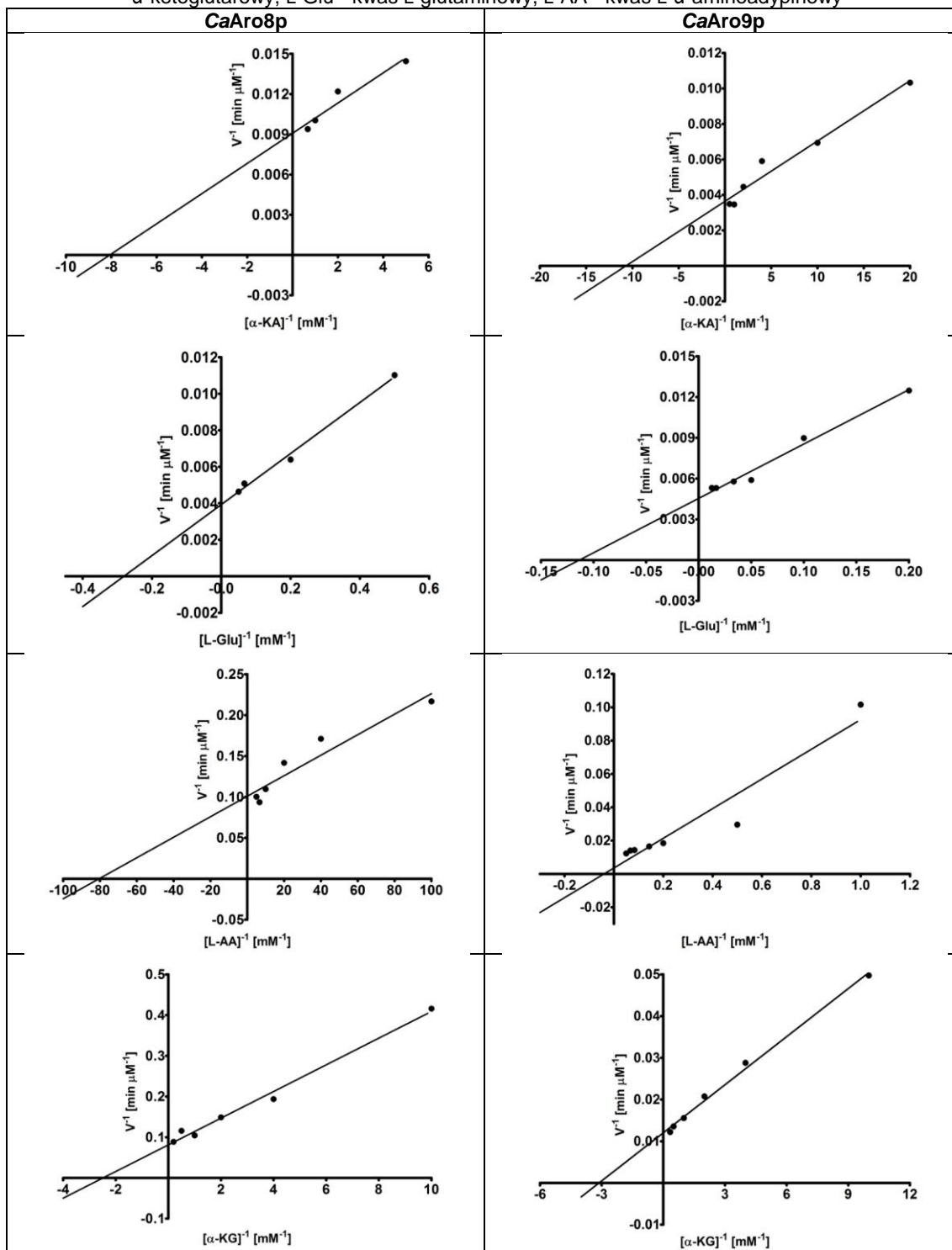
- w niniejszej pracy charakteryzowano enzymy o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej, a białko CaYer152Cp nie wykazywało takiej aktywności (Roz. 4.3.6),
- aby zaobserwować zmiany w widmie absorpcyjnym podczas wiązania PLP do struktury białka należało zastosować wysokie stężenie enzymu w analizowanej próbce (1 mg mL⁻¹). Uzyskanie takiego stężenia białka CaYer152Cp byłoby bardzo czasochłonne (bądź niemożliwe) ze względu na niski poziom nadprodukcji białka i duże straty podczas oczyszczania,
- białko CaYer152CHp nie wykazywało aktywności aminotransferazowej (Roz. 4.3.6).

4.3.6 Wyznaczenie parametrów kinetycznych

α -Aminotransferazy L- α -aminoadypinowe charakteryzują się zdolnością do katalizowania reakcji z wykorzystaniem szerokiego spektrum substratów (Tab. 1, Roz. 2.4). Białko ScAro8p, opisywane w literaturze jako aminotransferaza aromatyczna I, jest zdolne do katalizowania reakcji w kierunku syntezy i rozkładu aminokwasów aromatycznych [Iraqi i in. 1998; Karsten i in. 2011; Kradolfer i in. 1982], a także katalizuje reakcję typową dla α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej [Iraqi i in. 1998; Karsten i in. 2011; King i in. 2009]. Wykorzystuje wiele ketokwasów m.in. pirogronian, α -ketoglutaran, α -ketoadypinian [Iraqi i in. 1998; Karsten i in. 2011; King i in. 2009]. Natomiast ludzkie białko hKATIIP katalizuje reakcję rozkładu kwasu L- α -aminoadypinowego (jedna z reakcji w procesie rozkładu L-lizyny) a także wykazuje powinowactwo do kwasu kinurenowego [Han i in. 2008a; Passera i in. 2011].

Na podstawie zebranych informacji przeprowadzono charakterystykę badanych białek z *C. albicans* pod kątem aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej, aromatycznej aminotransferazy i kinureninowej aminotransferazy. Sprawdzone również, czy wprowadzone domeny oligoHis wpływają na aktywność badanych białek. Wyznaczano K_M (stała Michaelisa), V_{max} (maksymalna szybkość reakcji), k_{kat} (stała katalityczna, liczba obrotów enzymu) oraz $k_{kat}K_M^{-1}$ (wydajność katalityczna) mierząc prędkość początkową reakcji przy różnym stężeniu jednego substratu i przy stałym, wysycającym stężeniu substratu drugiego. W celu sporządzenia krzywej Michaelisa-Menten wykonywano pomiary dla co najmniej czterech różnych stężeń substratu i wykonywano co najmniej trzy powtórzenia pomiaru a uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wykresów Lineweavera-Burka (Tab. 61). Uzyskane linie proste przecinają oś rzędnych w punkcie wyznaczającym V_{max}^{-1} , a oś odciętych w punkcie wyznaczającym $-K_M^{-1}$.

Tab. 61 Wyznaczanie parametrów kinetycznych względem substratów α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Przykładowe wykresy Lineweavera-Burka, zależności $V^{-1}=f(C_{\text{substrat}}^{-1})$. V- prędkość początkowa reakcji, C_{substrat} - stężenie substratu, α -KA - kwas α -ketoadypinowy, α -KG- kwas α -ketoglutaryny, L-Glu - kwas L-glutaminowy, L-AA - kwas L- α -aminoadypinowy



Parametry kinetyczne wyliczono z zastosowaniem programu GraphPad Prism.

Tab. 62 Parametry kinetyczne badanych białek z *C. albicans*. Akceptor grupy aminowej: 10 mM kwas α -ketoglutarowy. Uzyskane dane wyliczono z co najmniej trzech wykonywanych pomiarów

Donor grupy aminowej	Parametr	Jednostka	CaAro8p	CaAro8CHp	CaAro9p	CaAro9CHp	CaYer152Cp
L-Phe	K_M	mM	0,053 \pm 0,003	0,049 \pm 0,003	4,761 \pm 1,166	4,602 \pm 0,710	0,240 \pm 0,024
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	0,626 \pm 0,023	0,696 \pm 0,024	-	0,089 \pm 0,016	-
L-Tyr	K_M	mM	0,091 \pm 0,008	0,107 \pm 0,008	2,806 \pm 0,253	2,315 \pm 0,188	0,456 \pm 0,121
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	0,518 \pm 0,049	0,466 \pm 0,014	-	0,157 \pm 0,013	-
L-Trp	K_M	mM	1,677 \pm 0,282	1,455 \pm 0,164	1,806 \pm 0,181	1,875 \pm 0,143	1,070 \pm 0,182
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	0,104 \pm 0,014	0,119 \pm 0,015	-	0,192 \pm 0,018	-
L-AA	K_M	mM	0,016 \pm 0,008	0,021 \pm 0,006	4,282 \pm 1,057	4,584 \pm 1,168	nieaktywny
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	1,479 \pm 0,558	1,127 \pm 0,307	-	0,038 \pm 0,004	nieaktywny
L-His	K_M	mM	11,500 \pm 2,425	-	-	-	-
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	0,015 \pm 0,003	-	-	-	-
L-Kyn	K_M	mM	-	0,132 \pm 0,019	-	-	-
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	-	0,382 \pm 0,072	-	-	-

*Preparaty enzymatyczne CaAro9p i CaYer152Cp były zbyt niejednorodne aby wyliczyć parametr $k_{kat} K_M^{-1}$. Parametr k_{kat} przeliczany jest na stężenie enzymu w próbce, znane było natomiast stężenie wszystkich białek w tych preparatach, a nie stężenie enzymu.

Tab. 63 Parametry kinetyczne badanych białek z *C. albicans*. Stężenie donora grupy aminowej: 5 mM. Uzyskane dane wyliczono z co najmniej trzech wykonywanych pomiarów.

Akceptor grupy aminowej	Parametr	Jednostka	CaAro8p	CaAro8CHp	CaAro9p	CaAro9CHp	CaYer152Cp
Donor grupy aminowej: L-Glu							
α -KA	K_M	mM	0,094 \pm 0,031	0,119 \pm 0,037	0,132 \pm 0,042	0,161 \pm 0,021	nieaktywny
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	1,171 \pm 0,673	1,816 \pm 0,328	-	1,983 \pm 0,283	nieaktywny
PhePi	K_M	mM	0,017 \pm 0,004	0,014 \pm 0,002	-	-	nieaktywny
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	1,023 \pm 0,24	1,245 \pm 0,216	-	-	nieaktywny
4-HPP	K_M	mM	0,026 \pm 0,004	0,029 \pm 0,003	-	-	nieaktywny
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	0,967 \pm 0,163	0,867 \pm 0,113	-	-	nieaktywny
Donor grupy aminowej: L-Phe							
α -KG	K_M	mM	-	5,192 \pm 0,712	2,918 \pm 0,486	2,118 \pm 0,188	2,752 \pm 0,564
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	-	0,019 \pm 0,003	-	0,150 \pm 0,011	-
Pirogronian	K_M	mM	-	3,597 \pm 0,538	-	-	-
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	-	0,015 \pm 0,003	-	-	-
Glioksylian	K_M	mM	-	7,037 \pm 0,648	-	-	-
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	-	0,014 \pm 0,002	-	-	-
α -KA	K_M	mM	-	0,807 \pm 0,092	-	-	-
	$k_{kat} K_M^{-1}$	$\mu M^{-1} min^{-1}$	--	0,404 \pm 0,053	-	-	-

Wykazano, że białka CaAro8p i CaAro9p katalizują reakcje α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej tj. przekształcają α -ketoadypinian i kwas L-glutaminowy do α -ketoglutaranu i kwasu L- α -aminoadypinowego oraz katalizują reakcję odwrotną, tzn. rozkładają kwas L- α -aminoadypinowy. Oba enzymy wykazują powinowactwo do L-fenylalaniny, L-tyrozyny i L-tryptofanu. CaAro8p katalizuje reakcje z udziałem L-histydyny i L-kinureniny oraz katalizuje reakcje rozkładu i syntezy aromatycznych aminokwasów. Domena oligoHis na C końcu nie zmienia parametrów kinetycznych białka CaAro8p (uzyskane wartości są bardzo podobne dla białka CaAro8CHp i CaAro8p), co oznacza, że wprowadzenie domeny hekshaHis nie wpływa na strukturę przestrzenną kieszeni katalitycznej białka. Można dzięki temu zastosować szybszą i tańszą metodę oczyszczania białka CaAro8p stosując chromatografię metalopowinowactwa. Wprowadzenie domeny oligoHis na C końcu białka CaAro9p nie wpływa na powinowactwo białka do analizowanych substratów (wartości K_M są zbliżone dla białka CaAro9CHp i CaAro9p). Białko CaYer152CHp natomiast okazało się nieaktywne enzymatycznie w badanych układach. Wprowadzenie domeny oligoHis na C końcu całkowicie zaburzyło funkcje katalityczne białka CaYer152Cp.

Białko CaAro8p wykazuje najwyższą efektywność katalityczną względem kwasu L- α -aminoadypinowego (L-AA) i α -ketoadypinianu (α -KA), wartości efektywności katalitycznej $k_{kat} K_M^{-1}$ dla tych substratów są najwyższe, a różnica między nimi mieści się w granicach błędów.

Białko CaAro8p wykazuje znacznie wyższe powinowactwo względem L-AA niż α -KA (o czym świadczą wartości K_M , $K_{M-L-AA} = 0,016 \pm 0,008$ [mM], $K_{M-\alpha-KA} = 0,094 \pm 0,031$ [mM]) (Tab. 62, Tab. 63). Jednakże, warto wspomnieć, że parametr K_M nie informuje o efektywności katalizy, a informuje tylko o powinowactwie względem substratu. Substrat, dla którego został wyznaczony niski parametr K_M (wysokie powinowactwo), może być silnie wiązany w miejscu katalitycznym enzymu, przez co reakcja katalityczna może przebiegać wolniej. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że dominującą aktywnością *in vitro* białka CaAro8p jest aktywność α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej (AmAA). Enzym ten katalizuje biosyntezę i degradację kwasu L-AA z równą efektywnością. Dla porównania, białko ludzkie hKATIIP o aktywności AmAA, które bierze udział w degradacji L-lizyny, również wykazuje wyższe powinowactwo do L-AA niż do α -KA ale wykazuje też znacznie wyższą efektywność katalityczną względem L-AA. Różnice pomiędzy wartościami tych parametrów dla L-AA i α -KA są znacznie większe (hKATIIP $K_{M-L-AA} = 0,9 \pm 0,1$ [mM], $k_{kat} K_M^{-1} L-AA = 196,2$ [min mM⁻¹], $K_{M-\alpha-KA} = 20,9 \pm 5$ [mM], $k_{kat} K_M^{-1} \alpha-KA = 13,9$ [min mM⁻¹]) [Han i in. 2009]. Niedużo niższą efektywność katalityczną białko CaAro8p wykazuje w stosunku do substratów niezbędnych dla syntezy aromatycznych aminokwasów fenylopirogonianu (PhePi) i 4-hydroksyfenylopirogonianu (4-HPP). Natomiast aż o dwa rzędy wielkości niższą wartość $k_{kat} K_M^{-1}$ otrzymano dla rozkładu L-histydyny, pirogonianu, glioksylanu i α -KG. Enzym CaAro8p wykazuje też najniższe powinowactwo do L-histydyny spośród wszystkich badanych substratów (Tab. 62).

Białko CaAro9CHp wykazuje najwyższą efektywność katalityczną względem α -ketoadypinianu. Uzyskana wartość $k_{kat} K_M^{-1} \alpha-KA$ dla białka CaAro9CHp jest porównywalna z wartościami $k_{kat} K_M^{-1} L-AA$ i $k_{kat} K_M^{-1} \alpha-KA$ białka CaAro8p (Tab. 62, Tab. 63).. Aż o rząd wielkości niższą wartość $k_{kat} K_M^{-1}$ uzyskano dla białka CaAro9CHp względem aromatycznych aminokwasów. Najwyższe powinowactwo enzym CaAro9CHp wykazuje względem α -KA, następnie, L-Trp, L-Tyr, i na końcu L-AA oraz L-Phe. Główną aktywnością *in vitro* białka CaAro9p jest aktywność AmAA, a duża różnica wartości parametrów kinetycznych względem α -KA i L-AA wskazuje na dominację kierunku biosyntezy L-AA. Białka CaAro9CHp i CaAro8p/CaAro8CHp katalizują reakcje z udziałem α -KA, L-Tyr i L-Trp z porównywalną efektywnością (zbliżone wartości parametru $k_{kat} K_M^{-1}$; Tab. 62, Tab. 63).

Białko CaYer152Cp nie posiada aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej, nie katalizuje też syntezy aminokwasów aromatycznych. Wynik ten jest zaskakujący. Analogiczne białko z *ScYer152Cp S. cerevisiae* wykazuje zdolność do tworzenia L-AA [King i in. 2009]. Ponadto porównując sekwencję aminokwasową białka CaYer152Cp z *C. albicans* z AmAA z *T. thermophilus* (TtLysNp), *H. sapiens* (hKATIIP), *B. taurus*, i *ScAro8p* (Rys. 67) stwierdzono, że posiada ono kluczowe reszty aminokwasowe w centrum aktywnym umożliwiające wiązanie tych substratów (tylko 2 odmienne reszty aminokwasowe na 8 istotnych (Tab. 40)). Pomimo tak niewielkiej różnicy, zamiana reszty Tyr czy Phe w centrum aktywnym znanych AmAA na resztę Leu124 w sekwencji CaYer152Cp z *C. albicans* może mieć kluczowe znaczenie dla aktywności białka CaYer152Cp. Grupa Rossi wykazała, że wystarczy zmiana tylko jednego aminokwasu Tyr142 w hKATIIP na Phe125 a powinowactwo enzymu zmienia się

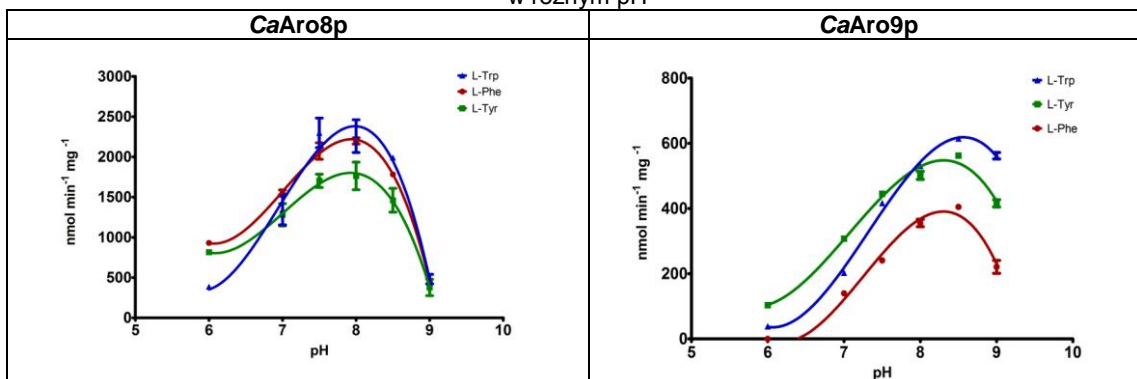
znacząco [Passera i in. 2011]. Ze względu na dużą niejednorodność preparatu enzymatycznego CaYer152Cp, nie wyliczono stałej katalitycznej k_{kat} (parametr k_{kat} przeliczany jest na stężenie enzymu w próbce: w preparacie enzymatycznym CaYer152Cp znane jest stężenie wszystkich białek w preparacie, a nie stężenie czystego enzymu), natomiast efektywność enzymu określono na podstawie parametru $V_{\text{max}} K_M^{-1}$. Najwyższą wartość $V_{\text{max}} K_M^{-1}$ uzyskano dla reakcji degradacji L-Phe. Natomiast z niższą efektywnością CaYer152Cp katalizuje reakcje rozkładu L-Tyr i L-Trp ($V_{\text{max}} K_M^{-1}_{\text{L-Phe}} = 0,030 \pm 0,026 [\text{min}^{-1}]$, $V_{\text{max}} K_M^{-1}_{\text{L-Tyr}} = 0,014 \pm 0,003 [\text{min}^{-1}]$, $V_{\text{max}} K_M^{-1}_{\text{L-Trp}} = 0,014 \pm 0,001 [\text{min}^{-1}]$) (Tab. 62, Tab. 63). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że białko CaYer152Cp jest aminotransferazą funkcjonującą jedynie w kierunku degradacji aminokwasów aromatycznych.

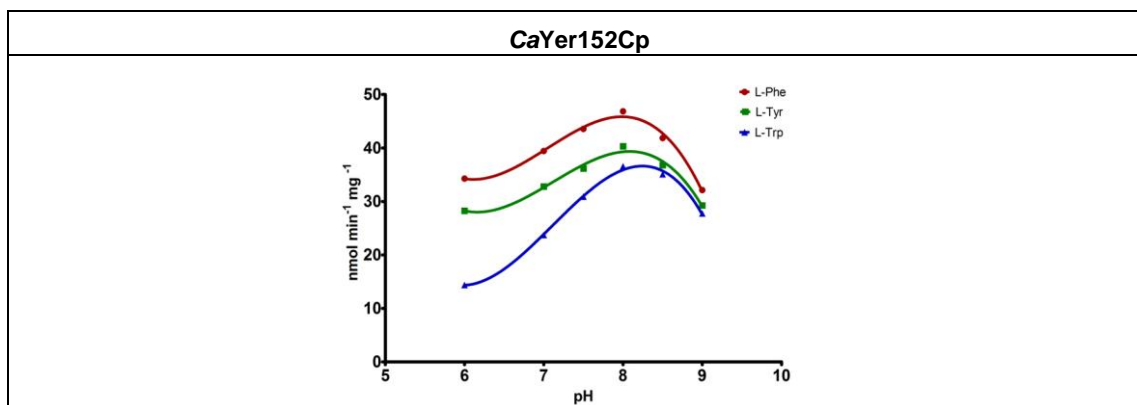
Analizując dane literaturowe zauważono, że białka CaAro9p i ScAro8p mają podobne właściwości katalityczne [Karsten i in. 2011]. Dominującą aktywnością tych enzymów jest aktywność w kierunku biosyntezy kwasu L- α -aminiadypinowego, a aktywność w kierunku degradacji kwasu L- α -aminoadypinowego i aminokwasów aromatycznych jest na niskim poziomie. W poprzednich latach, również zespół Brunke zauważył, że białko CgAro9p z *C. glabrata* odgrywa zbliżoną rolę do białka ScAro8p a nie do białka ScAro9p [Brunke i in. 2010]. Całkiem odmienne wyniki uzyskał natomiast zespół Urrestarazu, badając ekstrakty bezkomórkowe mutantów *S. cerevisiae* z usuniętymi genami ARO8 bądź ARO9 [Urrestarazu i in. 1998]. Wynika z nich, że faworyzowaną reakcją katalizowaną przez ScAro8p jest rozkład L-AA, nie zaś biosynteza L-AA jak by wynikało z wyników uzyskanych w badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez zespół Karsten [Karsten i in. 2011]. Białko CaAro8p natomiast jest białkiem bardziej uniwersalnym. Wykazuje wysoką efektywność katalityczną względem szerokiej liczby substratów. Podobną właściwość zauważono dla białka hKATIlp [Han i in. 2008a].

4.3.7 Określanie optimum pH działania enzymów

Optymalne pH działania enzymów wyznaczono poprzez przeprowadzenie szeregu reakcji degradacji L-Phe, L-Tyr, L-Trp z udziałem α -KG w różnym pH (Tab. 64).

Tab. 64 Porównanie szybkości katalizowanej reakcji enzymów CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp w różnym pH





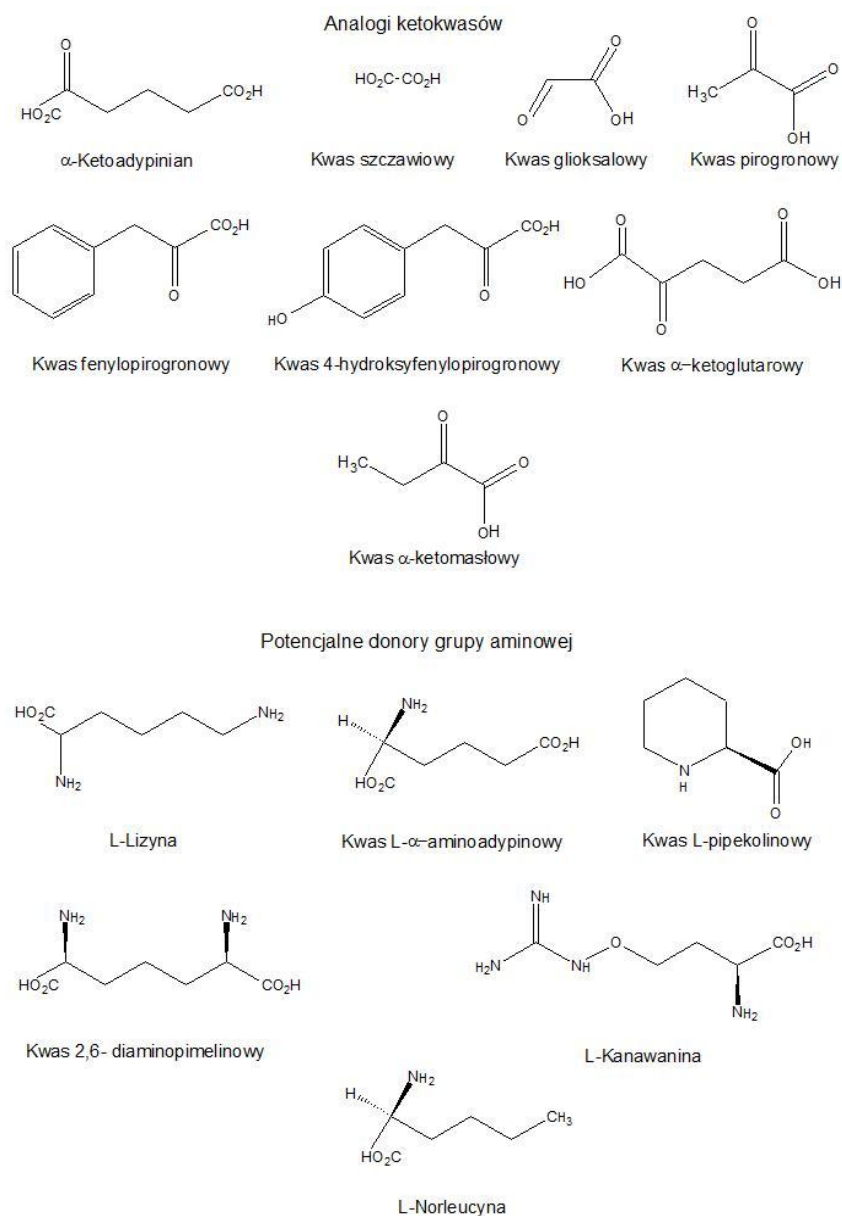
Optymalne pH działania *CaAro8p* i *CaYer152Cp* wyznaczono na 8, natomiast dla *CaAro9p* na 8,5 (Tab. 64). W przypadku AmAA z *S. cerevisiae* optymalne pH wynosi 8,5 natomiast dla KAT z nerki wołowej i szczurzej wynosi 7 [Deshmukh i Mungre 1989; Matsuda i Ogur 1969].

4.3.8 Inhibicja *CaAro8p* i *CaAro9p*

Sprawdzono wpływ potencjalnych inhibitorów na aktywność białek z *C. albicans* o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej, *CaAro8p* i *CaAro9p*, w reakcji degradacji L-Phe. Zgodnie ze wstępnymi założeniami badane enzymy są potencjalnym celem molekularnym w terapii przeciwgrzybowej. Sprawdzono wpływ analogów substratów: ketokwasów i potencjalnych donatorów grupy aminowej. Wybrano związki różniące się długością łańcucha węglowego i miejscem występowania grupy keto od rzeczywistych substratów AmAA (Rys. 48). Dane przedstawione w Tab. 65 wskazują, że aktywność białka *CaAro8p* nie jest hamowana przez obecność końcowego produktu szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego tj. L-lizynę (brak regulacji enzymu na zasadzie sprzężenia zwrotnego) ani przez jej analog L-kanawaninę. Wykazano, że słabymi inhibitorami enzymu są L-norleucyna (wartość stężenia inhibitora powodującego obniżenie aktywności o 50%, $IC_{50} = 2,8 \pm 1,31$ [mM]) i kwas szczawiowy ($IC_{50} = 6,3 \pm 1,01$ [mM]). Natomiast prekursor L-lizyny u bakterii, kwas 2,6-diaminopimelinowy i jego analog, kwas L-pipekolinowy, nie wykazują aktywności hamującej. Enzym *CaAro8p* wykorzystuje jako substraty kwas α -ketomasłowy i kwas glioksalowy (Tab. 65). Ze względu na zbyt wysokie wartości IC_{50} dla L-norleucyny i kwasu szczawiowego nie wyznaczano stałej inhibicji (K_i).

Tab. 65 Wpływ analogów substratów *CaAro8p* na aktywność enzymu w reakcji degradacji L-Phe. Do wyliczenia wartości IC_{50} użyto programu GraphPrism

Związek	IC_{50}
Kwas szczawiowy	$6,3 \pm 1,01$ [mM]
L-Norleucyna	$2,8 \pm 1,31$ [mM]
L-Kanawanina	Brak wpływu
L-Lizyna	Brak wpływu
Kwas 2,6-diaminopimelinowy	Brak wpływu
Kwas L-pipekolinowy	Brak wpływu
Kwas α -ketomasłowy	Substrat
Kwas glioksalowy	Substrat

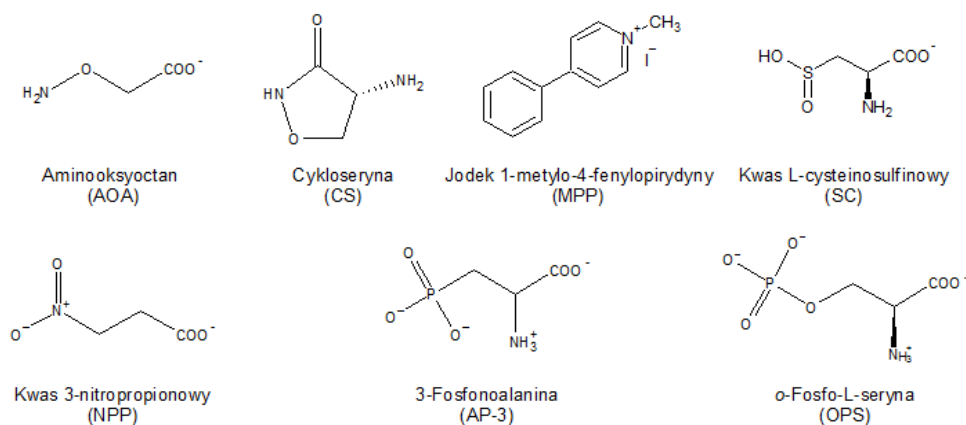


Rys. 48 Analogi substratów AmAA i potencjalne donory grupy aminowej

Kwas α -ketomasłowy i glioksalowy są również substratami dla ludzkiego enzymu hKATIIP. Uzyskane przez grupę Han wartości K_M dla tych ketokwasów są porównywalne z wartością uzyskaną dla kwasu α -ketoadypinowego [Han i in. 2008a]. Kwas α -ketomasłowy wykorzystywany jest też jako substrat przez KAT ze szczurzej nerki [Buchli i in. 1995]. Co ciekawe, inaczej niż dla CaAro8p, L-norleucyna jest również substratem KAT z nerki szczurzej [Deshmukh i Mungre 1989].

Sprawdzono również wpływ związków o znanej zdolności inhibicyjnej wobec aminotransferaz: aminooksyoctan (AOA), cykloseryna (CS), jodek 1-metylo-4-fenylopirydyny (MPP), sulfino-cysteina (SC), kwas 3-nitropropionowy (NPA), 3-fosfonoalanina (AP-3), α -fosfo-L-seryna (OPS) (Rys. 49) [Passera i in. 2011; Preuss i in. 2013] na aktywność białka CaAro8p w reakcji degradacji L-Phe. Wyznaczono wartości IC_{50} oraz K_{iAOA} (Tab. 66, Tab. 67).





Rys. 49 Potencjalne inhibitory CaAro8p

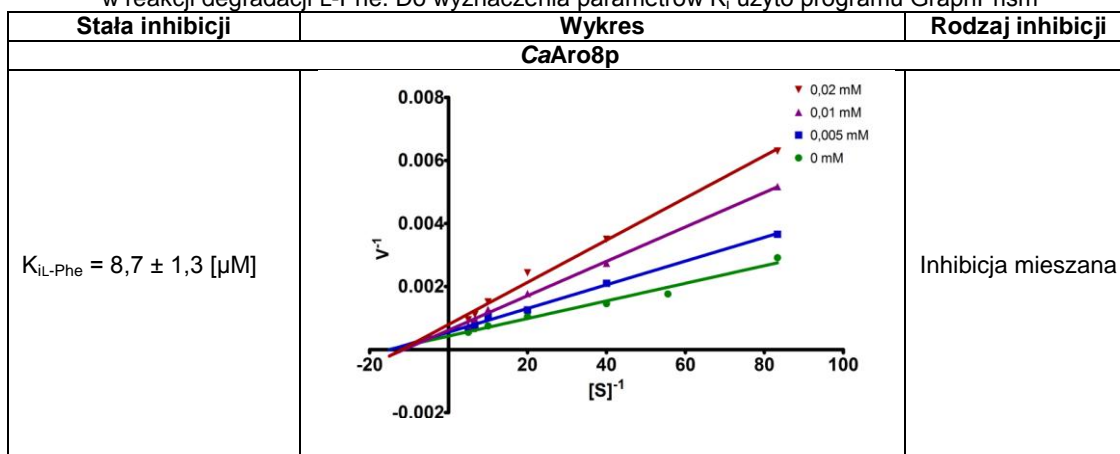
Tab. 66 Zestawienie wartości IC_{50} dla badanych inhibitorów względem CaAro8p. Wpływ inhibitorów badany w reakcji degradacji L-Phe. Do wyliczenia wartości IC_{50} użyto programu GraphPrism

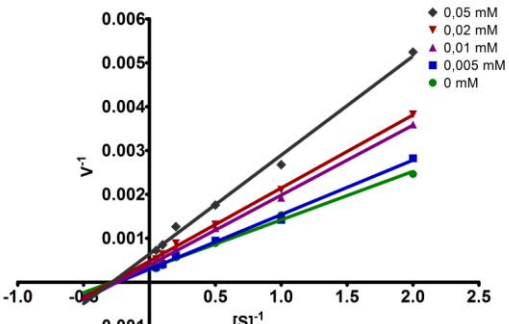
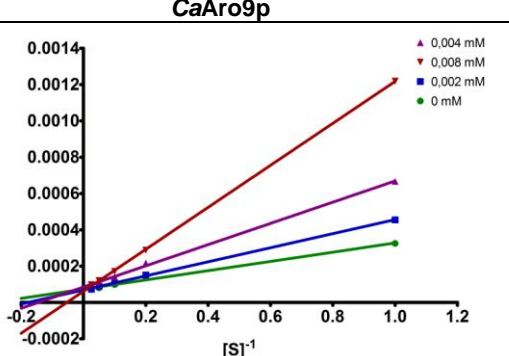
Nazwa	IC_{50}
AOA	$96,29 \pm 3,15$ [μ M]
MPP	$4,53 \pm 2,03$ [mM]
NPA	$10,78 \pm 1,66$ [mM]
OPS	$18,05 \pm 2,09$ [mM]

o-Fosfo-L-seryna (OPS), 3-fosfonoalanina (AP-3), cykloseryna (CS) i sulfincysteina (SC) nie wykazywały żadnego wpływu na aktywność białka CaAro8p. Związek AOA jest najbardziej skutecznym inhibitorem białka CaAro8p spośród badanych (Tab. 66). Wartość IC_{50} jest najniższa i wynosi $96,29 \pm 3,15$ [μ M]. Jeszcze niższą wartość IC_{50} , prawie o rząd wielkości, uzyskano dla związku AOA względem białka CaAro9p, $11,51 \pm 1,31$ [μ M]. Dla związku AOA wyznaczono wartości K_i względem L-feniloalaniny (L-Phe) i α -ketoglutaranu (α -KG) oraz określono rodzaj inhibicji (Tab. 67).

Wpływ większości inhibitorów i analogów substratów sprawdzono głównie na białku CaAro8p gdyż, jak wykazano we wcześniejszych badaniach (Roz. 4.2, Roz. 4.3.6), pełni ono najbardziej znaczącą funkcję w metabolizmie komórki.

Tab. 67 Zestawienie parametrów K_i dla związku AOA względem CaAro8p i CaAro9p. Wpływ AOA badany w reakcji degradacji L-Phe. Do wyznaczenia parametrów K_i użyto programu GraphPrism



$K_{i\alpha\text{-KG}} = 35,9 \pm 2,0 \text{ } [\mu\text{M}]$		Inhibicja niekompetytywna
$K_{i\text{L-Phe}} = 3,1 \pm 0,4 \text{ } [\mu\text{M}]$		Inhibicja kompetytywna
$K_{i\alpha\text{-KG}}$	Nie wyznaczono	

4.3.9 Próby otrzymania form krystalicznych białek CaAro8p i CaAro9p

Poznanie struktury III rzędowej białka może przyczynić się do zrozumienia funkcjonowania metabolizmu komórki czy mechanizmu reakcji katalizowanej przez enzym. Znajomość struktury trzeciorzędowej białka, może ułatwić zaprojektowanie przestrzennej struktury związku wiążącego się z miejscem aktywnym enzymu. Związek ten może okazać się inhibitorem tego białka a w przyszłości stać się również i lekiem.

Stosunkowo często najtrudniejszym etapem w badaniach struktury białek metodą rentgenograficzną jest uzyskanie kryształów odpowiedniej jakości. Krystalizacja białek to bardzo złożony proces. Trudności z uzyskaniem kryształu białka związane są z niezwykłą właściwością tych makromolekuł. Są to duże, dynamiczne cząsteczki złożone z kilku podjednostek, elastyczne, raczej niestabilne chemicznie i fizycznie, wrażliwe na temperaturę czy hydratację. Wraz ze zmianą właściwości środowiska w jakim się znajdują zmieniają się również właściwości cząsteczki białka – ładunek, konformacja. Ponadto każde białko ma unikalny skład aminokwasowy a przez to specyficzne właściwości fizyczne i chemiczne. Dlatego też niewiele informacji dostarczają nam doniesienia o krystalizacji enzymu o składzie aminokwasowym podobnym do badanego. Już pojedyncza zmiana jednego z parametrów np. temperatury wpływa na rozpuszczalność białka, stopień tworzenia zarodka krystalizacji i wzrost kryształu. W celu poznania struktury białka przy pomocy promieniowania rentgenowskiego potrzebny jest kryształ, w którym cząsteczki są precyzyjnie zorientowane w przestrzeni. Ponadto wielkość uzyskanego kryształu powinna się zawierać pomiędzy 50 μm a 0,5 mm. Rozmiar kryształu wpływa na ilość jednostek elementarnych co wiąże się z odpowiednim rozpraszaniem promieni rentgenowskich oraz z uzyskaniem wyniku o dobrej rozdzielczości. Również upakowanie i jednorodność kryształu wpływa na uzyskany efekt końcowy [Bergfors 1999].

Wysoka rozdzielczość analizy rentgenograficznej pozwala na zlokalizowanie pojedynczych atomów w strukturze białka [Wiencek 1999].

Bezpośrednio przed rozpoczęciem krystalizacji białka warto poświęcić trochę czasu na jak najlepsze poznanie jego właściwości na podstawie znanej sekwencji aminokwasowej. Można wykonać szereg czynności ułatwiających późniejsze planowanie metodyki krystalizacji. Istnieją programy, które klasyfikują białko w klasy krystalizacyjne. Na podstawie sekwencji aminokwasowej oraz dotychczasowych wyników krystalizacji innych białek program wyznacza parametry biochemiczne i biofizyczne a następnie przypisuje białku odpowiednią klasę krystalizacji. Jeśli któryś z wyznaczonych parametrów biochemicznych jest niski, wówczas prawdopodobieństwo uzyskania kryształu drastycznie spada. Znalezienie danych dotyczących optymalnych warunków przechowywania, warunków zachowania aktywności enzymu, pH działania pozwolą na wstępne oszacowanie optymalnych warunków pracy. Przed rozpoczęciem krystalizacji należy sprawdzić czy białko w danych warunkach zachowuje swoją aktywność. Ważne jest aby nastawiać próby krystalizacyjne zaraz po oczyszczeniu. Dłuższe przechowywanie może wpływać na niestabilność enzymów, utratę aktywności czy utworzenie się nowych form oligomerycznych. Dodanie do warunków krystalizacji substratów, ligandów, jonów metali potrzebnych do aktywności czy inhibitorów enzymów podobnych może wpłynąć na stabilizację badanego białka i szybszy efekt uzyskania pożądanego kryształu. Kluczowe znaczenie w procesie krystalizacji ma również czystość preparatu białkowego zarówno pod kątem zawartości zanieczyszczeń białkowych, monodispersyjności, homogenności postranslacyjnych modyfikacji czy obecności kwasów nukleinowych. Czystość preparatu białkowego oceniana ze względu na obecność białkowych zanieczyszczeń powinna wynosić więcej niż 90%. Typowymi stosowanymi metodami oczyszczania są chromatografia powinowactwa następnie chromatografia jonowymienna w celu pozbycia się kwasów nukleinowych i chromatografia wykluczania prowadząca do uzyskania pojedynczej formy oligomerycznej [Patric i in. 1999].

4.3.9.1 Analiza bioinformatyczna pod kątem zdolności do krystalizacji

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono próby krystalizacji białek o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej: CaAro8p i CaAro9p, natomiast dane rentgenograficzne i ich wstępna analiza zostały wykonane przez dr Kiliszek z zespołu prof. Rypniewskiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i promotora pomocniczego w moim przewodzie, dr Iwonę Gabriel z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

Znając sekwencje aminokwasową CaAro8p i CaAro9p wykonano analizę zdolności białek do krystalizacji i przypisano do odpowiedniej klasy krystalizacyjnej. W tym celu wykorzystano program XtalPred [Slabinski i in. 2007b], który porównuje biochemiczne i biofizyczne cechy analizowanych białek z odpowiadającymi rozkładami prawdopodobieństwa krystalizacji obliczonymi z TargetDB [Chen i in. 2004]. Program analizuje wprowadzoną sekwencję białka i przewiduje prawdopodobieństwo krystalizacji przypisując białko do jednej z pięciu kategorii krystalizacji: optymalnej, suboptymalnej, średniej, trudnej oraz bardzo trudnej. Przewidywanie



jest wykonywane przez połączenie indywidualnych prawdopodobieństw krystalizacji w jeden wynik. Jeśli któryś z wyznaczonych parametrów jest niski, prawdopodobieństwo krystalizacji drastycznie spada. Program analizuje 9 czynników sekwencji aminokwasowej:

- długość sekwencji,
- punkt izoelektryczny,
- indeks hydropatyczny GRAVY (suma wartości hydropatii wszystkich aminokwasów podzielona przez długość sekwencji aminokwasowej; służy do określania hydrofobowości białka co przekłada się na rozpuszczalność),
- długość najdłuższego nieuporządkowanego regionu,
- indeks niestabilności,
- przewidywany procent obecności formy kłębka statystycznego w drugorzędowej strukturze,
- ilość reszt aminokwasowych uczestniczących w tworzeniu przewidywanego kłębka statystycznego,
- przewidywana obecność transmembranowych helis,
- procent insercji w dopasowaniu wielu sekwencji (ang. *multiple alignment*).

Każdy z tych parametrów był przeliczany na prawdopodobieństwo krystalizacji.

Wyniki uzyskane z programu XtalPred dla białka CaAro8p:

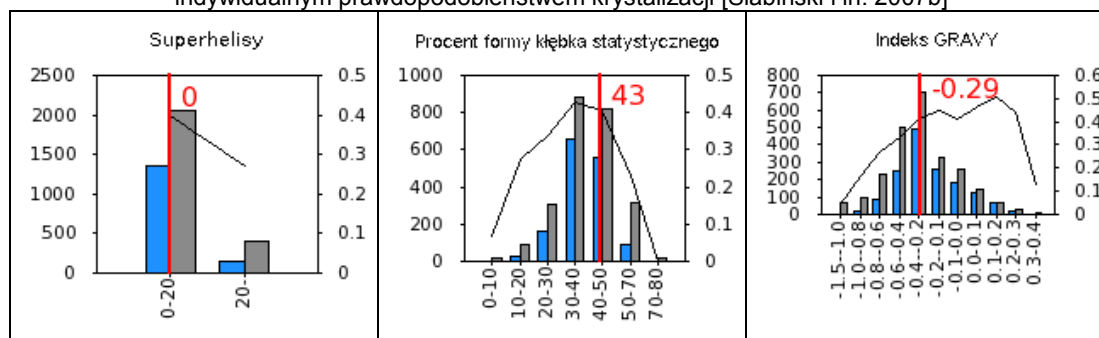
```

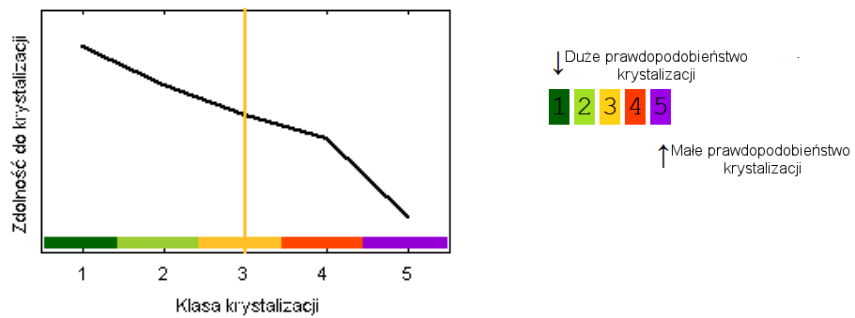
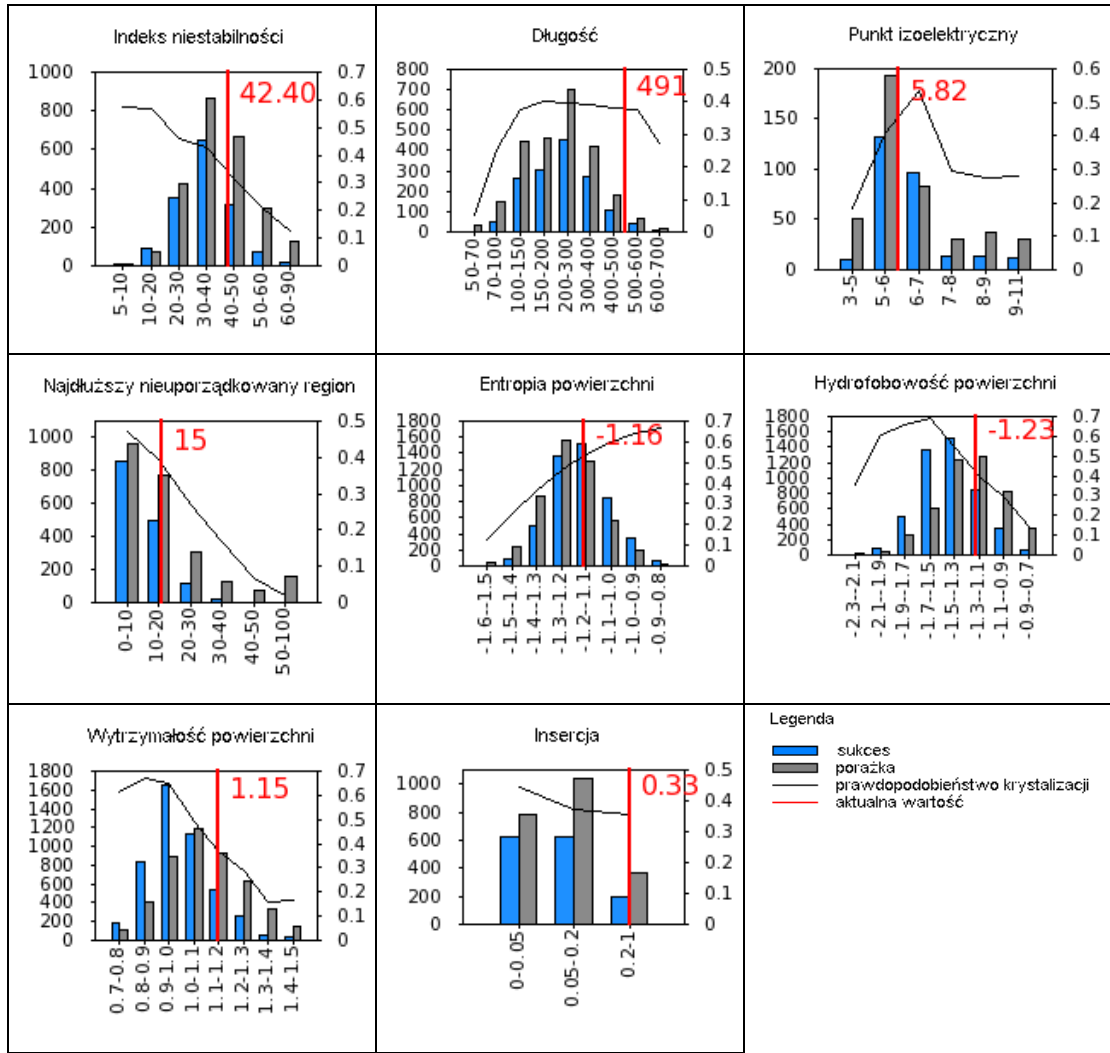
1...*..10...*..20...*..30...*..40...*..50...*..60...*..70...*..80...*..90...*..100
MISDTKPAKDLTHLLSNESHARQTSPLKGIFKYYKQPGITFLGGGLPLSDYFPFEKVTADIPTPSFGGIGAPIEGENKTTIEVFKKAADNVDPQIELA
...*..110...*..120...*..130...*..140...*..150...*..160...*..170...*..180...*..190...*..200
RSLQYGSTIFGSPEFLQFIKEHTDMVHKVPYENWDVIVSVGNTEAWDSTLRTFCSEKGDILVEEYTFSSALESANGQVNTIVPVTMDEFGIIEPKLEELMS
...*..210...*..220...*..230...*..240...*..250...*..260...*..270...*..280...*..290...*..300
RWVGNKPKFLYITICTGQNPITGSSLSAERRKQIYDIACKYDFLIIEDEPYFLQMETYTKDKAAREGKAVHDHDFLKAALVPSFISLDVEGRVVRLDSEFSK
...*..310...*..320...*..330...*..340...*..350...*..360...*..370...*..380...*..390...*..400
VLAPGLRLGWIVGQKDLLERYVRLHEVSVQNPISGLSEALANALLRWGHSGLYDLWLIGLRAEYTHKRDVAIDALDQFVPEKVESSFPNPVAGMFFVTILD
...*..410...*..420...*..430...*..440...*..450...*..460...*..470...*..480...*..490
SKHPKYKEFLEDPLKVEAAVHEQAIKQGCLLAFGSWFKAEQSSPPQKILPANPSHKTHIFFRGTAAVPLDQLVVGLEKFKGAVRAEFGL

```

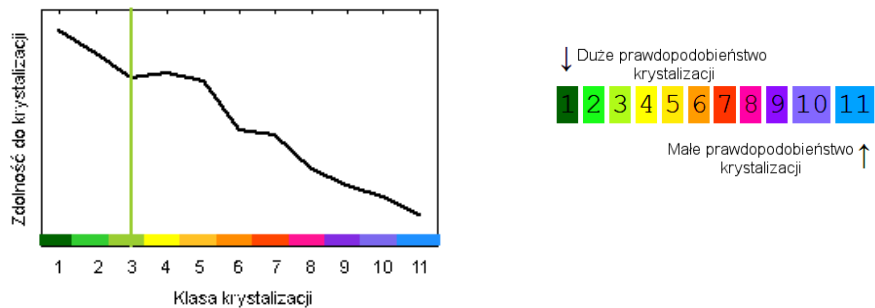
Rys. 50 Analiza sekwencji aminokwasowej CaAro8p pod względem parametrów istotnych ze względu na zdolność do krystalizacji białka. PĘTLE przewidziane na podstawie PSIPRED, **HELISY** przewidziane na podstawie PSIPRED, **β-KARTKI** przewidziane na podstawie PSIPRED, **REGIONY NIEUPORZĄDKOWANE** przewidziane na podstawie DISOPRED2, **KŁĘBKI STATYSTYCZNE** przewidziane na podstawie COILS, **HELISY BŁONOWE** przewidziane na podstawie TMHMM, **PEPTYDY SYGNALNE** przewidziane na podstawie SignalP. Program: XtalPred [Slabinski i in. 2007b]

Tab. 68 Parametry krystalizacji białka CaAro8p wyliczone przez program XtalPred z zaznaczonym indywidualnym prawdopodobieństwem krystalizacji [Slabinski i in. 2007b]

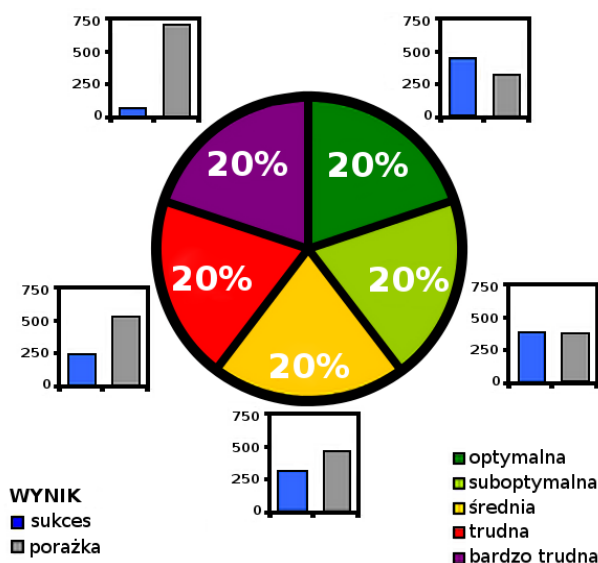




Rys. 51 Przepisanie klasy krystalizacji na podstawie cech biochemicznych i biofizycznych białka CaAro8p. Program: XtalPred [Słabinski i in. 2007b]



Rys. 52 Przepisanie klasy krystalizacji uwzględniając właściwości powierzchni makrocząsteczki białka CaAro8p. Program: XtalPred [Słabinski i in. 2007b]



Rys. 53 Wskaźnik proporcji sukcesów do porażek krystalizacji białka z podziałem na klasy krystalizacji [Slabinski i in. 2007a]

Na podstawie cech biochemicznych i biofizycznych białko CaAro8p zostało zakwalifikowane do 3 klasy zdolności do krystalizacji (skala 1-5). Oznacza to, że białko CaAro8p z dużym prawdopodobieństwem (41%) tworzy kryształy. Natomiast uwzględniając właściwości powierzchni makrocząsteczki m. in. entropię łańcuchów bocznych aminokwasów na powierzchni białka, hydrofobowość, odporność powierzchni (istotną szczególnie przy białkach globularnych) białko CaAro8p zostało również zakwalifikowane do 3 klasy (duże prawdopodobieństwo; skala 11 stopniowa).

Wyniki uzyskane z programu XtalPred dla białka CaAro9p:

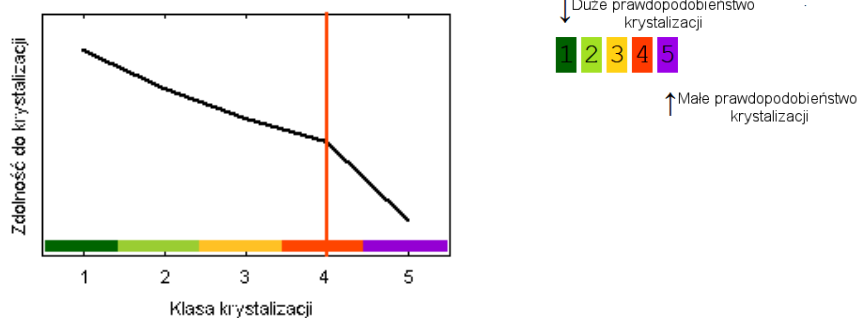
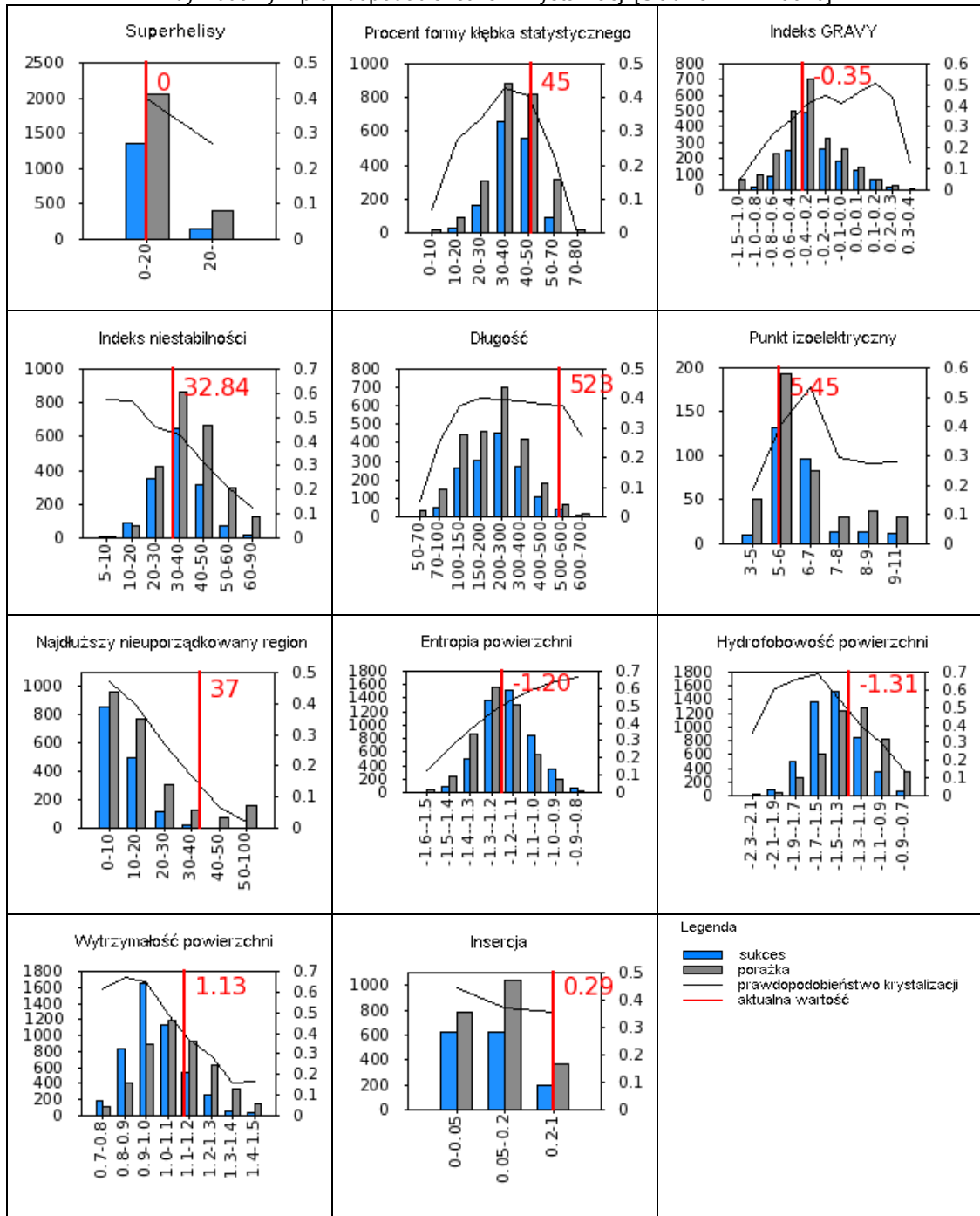
```

1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
MSDPTHLSKRAAGRISVHFTNAPSDKPPANFKPHEKPLALSYGMPNHGFFPDIDSIDVNLVDYPFQKITTPSTSSTAEEPPSSSLNGSENGHQTKTFF
...*...110...*...120...*...130...*...140...*...150...*...160...*...170...*...180...*...190...*...200
SSIHTPQSTVHISRHTDPKLIDLARGLQYAAVEGHAPLLQFARDFIIRTHKPNYDDWNVFITGASDGLNKAADVFLDDGDVILVEEFTFSPFLRFSDN
...*...210...*...220...*...230...*...240...*...250...*...260...*...270...*...280...*...290...*...300
AGAKAVPVKINFDNDSGDIDLTQFVDLLENWEKHYPNLPKPKALYTIATGQNPTGFTQSEFRKKIYDLAVKYDFAIEDDPYGYLTLPKYEPKNIGGSG
...*...310...*...320...*...330...*...340...*...350...*...360...*...370...*...380...*...390...*...400
SGNNELKNDLEIDDYLNHLIPSYLELDTTGRVLRVETFSKLFAPGLRLGFIVGHKEVIDAVKNYSDVVNRGASGLTQIVNNVIQENFKGVDGWLEWIL
...*...410...*...420...*...430...*...440...*...450...*...460...*...470...*...480...*...490...*...500
KMRLNYSYRKDLLLSIFESQAYKKGYVDVIDPKAGMVFFKINLPKDVDVLQQMKLLLWKLISYGILVVPGYNMIVDLEFSKDRSNFFRLCYALANNDE
...*...510...*...520...
EILESGKRLTDAVYEFFSNGLEF

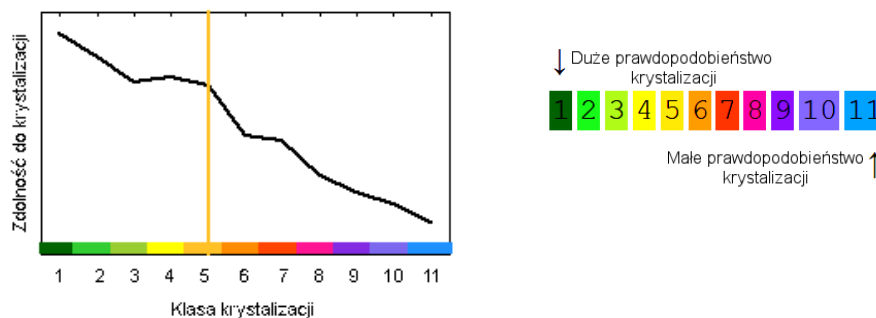
```

Rys. 54 Analiza sekwencji aminokwasowej CaAro9p pod względem parametrów istotnych ze względu na zdolność do krystalizacji białka. PEŁTLE przewidziane na podstawie PSIPRED, **HELISY** przewidziane na podstawie PSIPRED, **β-KARTKI** przewidziane na podstawie PSIPRED, **REGIONY NIEUPORZĄDKOWANE** przewidziane na podstawie DISOPRED2, **KŁĘBK**I STATYSTYCZNE przewidziane na podstawie COILS, **HELISY BŁONOWE** przewidziane na podstawie TMHMM, **PEPTYDY SYGNALNE** przewidziane na podstawie SignalP. Program XtalPred [Slabinski i in. 2007b]

Tab. 69 Parametry krystalizacji białka CaAro9p wylczone przez program XtalPred z zaznaczonym indywidualnym prawdopodobieństwem krystalizacji [Slabinski i in. 2007b]



Rys. 55 Przepisanie klasy krystalizacji na podstawie cech biochemicznych i biofizycznych białka CaAro9p. Program XtalPred [Slabinski i in. 2007b]



Rys. 56 Przypisanie klasy krystalizacji uwzględniając właściwości powierzchni makrocząsteczki białka CaAro9p. Program XtalPred [Słabinski i in. 2007b]

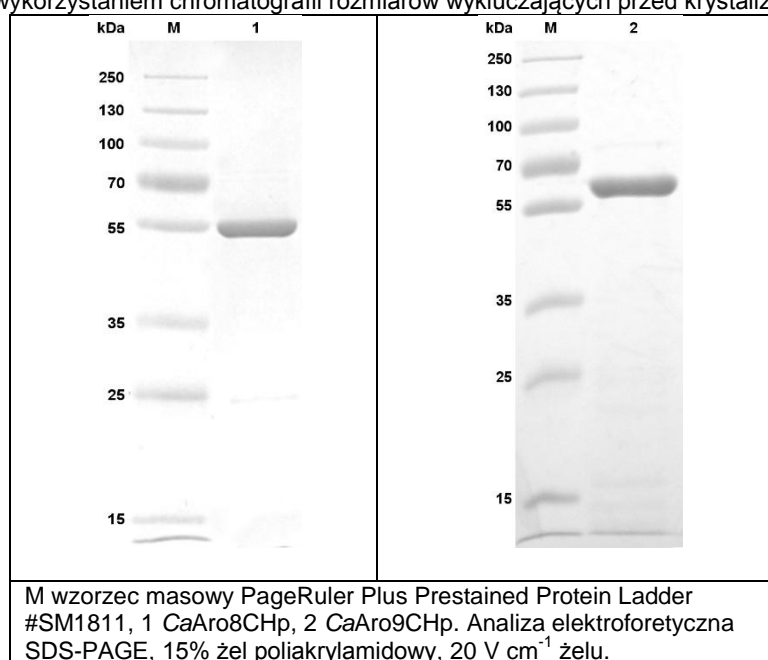
Na podstawie cech biochemicznych i biofizycznych przewidywana zdolność do krystalizacji białka CaAro9p wynosi 31% (klasa 4 w skali 1-5), a uwzględniając właściwości powierzchni makrocząsteczki białko to zostało zakwalifikowane do klasy 5. Co oznacza, że białko CaAro9p trudniej tworzy kryształy niż CaAro8p. Według danych uzyskanych z XtalPred kluczowe znaczenie dla klasyfikacji białka CaAro9p miał najdłuższy nieuporządkowany region (niskie indywidualne prawdopodobieństwo krystalizacji).

4.3.9.2 Optymalizacja krystalizacji

Do otrzymania kryształu białka niezbędne jest uzyskanie preparatu białkowego o wysokiej czystości $\geq 90\%$, rozumianej pod kątem obecności kwasów nukleinowych, zanieczyszczeń niebiałkowych i białkowych. Ważne jest również zachowanie jednorodności konformacyjnej. Obecność oligomerów, agregatów, klasterów może negatywnie wpłynąć na uzyskanie odpowiedniego kryształu, mogą tworzyć się wówczas różne skupiska białkowe, niespecyficzne oddziaływania, które uniemożliwią utworzenie zarodka kryształu [McPherson 1999]. Wzajemne oddziaływanie różnorodnych parametrów krystalizacji powoduje, że ciężko jest przewidzieć ich indywidualny wpływ na końcowy efekt. Uzyskanie kryształu wiąże się z opracowaniem warunków zmniejszenia rozpuszczalności białka w roztworze poprzez modyfikację rozpuszczalnika. Opiera się to na wielokrotnym zmienianiu parametrów krystalizacji bądź metod krystalizacji. Rozpuszczalność musi zmniejszać się bardzo powoli, w przeciwnym wypadku może dojść do wytrącenia białka. Ponadto należy uważać na przesylenie, na zbyt duże stężenie białka. Wówczas może dojść do obecności zbyt wielkiej ilości zarodków kryształu, przez co, ze względu na zbyt gwałtowny proces krystalizacji, wytworzą się sklezione agregaty.

Krystalizacji poddawano preparaty białek o czystości powyżej 95% (Tab. 70). Białka typu dzikiego oczyszczano przy pomocy chromatografii jonowymiennej (Roz. 3.2.16) natomiast białka z domeną fuzyjną heksaHis oczyszczano przy pomocy chromatografii metalopowinowactwa (Roz. 3.2.15). W celu uzyskania wysokiej czystości preparatu jednorodnego konformacyjnie (optymalny stosunek oligomerów) przeprowadzono ponowne oczyszczanie przy pomocy chromatografii rozmiarów wykluczających (Roz. 3.2.17).

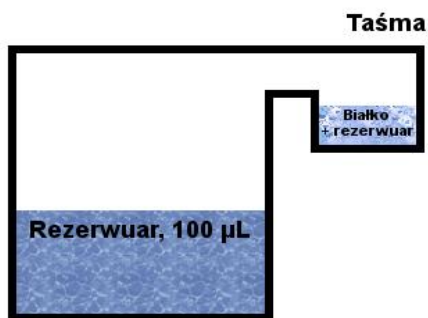
Tab. 70 Sprawdzenie efektywności oczyszczania białek rekombinantowych CaAro8p i CaAro9CHp z wykorzystaniem chromatografii rozmiarów wykluczających przed krystalizacją



Optymalizowano stężenie białka dozowanego do kolumny Superdex 200 stosowanej do chromatografii rozmiarów wykluczających. W wyższych stężeniach białko może tworzyć różne formy oligomeryczne, co utrudnia uzyskanie preparatu jednorodnego konformacyjnie. Każde z poddawanych krystalizacji białek (CaAro8CHp, CaAro8p, CaAro9CHp) tworzyło jedną formę oligomeryczną w zakresie badanych stężeń. Bezpośrednio przed nastawianiem prób krystalizacyjnych filtrowano preparaty białkowe przez filtr Amicon Ultra Centrifugal Filters 0,5 mL z punktem odcięcia 10 kDa w celu pozbycia się zanieczyszczeń i powstałych agregatów białkowych. Białka poddawane krystalizacji znajdowały się w buforze, w którym przeprowadzana była chromatografia rozmiarów wykluczających, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl. Białka najczęściej krystalizują w fizjologicznym pH, w takich warunkach zmniejsza się możliwość wystąpienia zjawiska denaturacji. Warto też wspomnieć, że nie ma związku pomiędzy pH białka a pH krystalizacji, czasami zmiana pH o 0,1 jednostki powoduje zahamowanie procesu zarodkowania [Ries-Kautt i Ducruix 1992; Zeppezauer 1971]. Próby do krystalizacji nastawiano tego samego dnia, bądź dzień później (wówczas białko było przechowywane w 4°C). Krystalizację nastawiano w temperaturze pokojowej. Jest to najczęściej stosowana temperatura do krystalizacji. Temperatura ma wpływ na rozpuszczalność białka, niższa prowadzi do zwolnienia procesu narastania kryształu i umożliwia uzyskanie bardziej uporządkowanej struktury [Pusey i Gernert 1988].

Optymalizowano również metodę krystalizacji. Próby nastawiano z zastosowaniem metody kropli wiszącej bądź kropli siedzącej (Rys. 57, Rys. 58). Nastawianie prób z zastosowaniem metody kropli wiszącej wymaga zastosowania większej ilości warunku do krystalizacji, trwa dłużej, ale umożliwia uzyskanie większych kryształów. Natomiast metoda kropli siedzącej umożliwia automatyzację procesu, umożliwia sprawdzenie większej ilości warunków w krótszym czasie, jest bardziej ekonomiczna. Próby krystalizacyjne nastawiano ręcznie bądź

z zastosowaniem robota do krystalizacji typu Gryphon Art. Robinson w Pracowni Instytutu Chemii Bioorganicznej (PICBio) PAN w Poznaniu.



Rys. 57 Schemat krystalizacji białka metodą kropli siedzącej



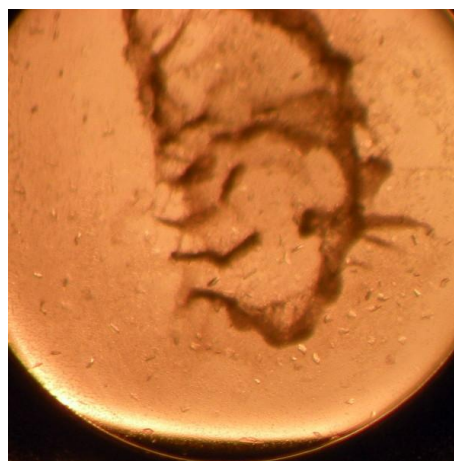
Rys. 58 Schemat krystalizacji białka metodą kropli wiszącej

Krystalizację nastawiano dla różnego stężenia białka między 5 a 30 mg mL⁻¹. Białka w tym zakresie stężeń były stabilne i nie ulegały wytrąceniu. Próby krystalizacyjne nastawiano w różnych stosunkach preparatu białkowego do rezerwuaru 1:1, 2:1, 1:2. Wykorzystywano gotowe zestawy do krystalizacji, m. in. Hampton Research Index, Crystal Screen, Crystal Screen 2, PEG Ion Screen, Grid Screen, MDL Morpheus I i II, Clear Strategy Screen I i II, JCSG. Nastawiono ≥15 tys. prób. Krystalizacji poddawano białka CaAro8CHp, CaAro8p, CaAro9CHp. Uzyskano kryształy dla wszystkich enzymów. Na początku do krystalizacji wybrano białka zawierające domenę hekshaHis, która umożliwia szybsze i łatwiejsze oczyszczanie. Dzięki takiemu podejściu można było uzyskać dużą czystość preparatu białkowego, duże stężenie białka w próbce oraz można było tego samego dnia nastawić próby krystalizacyjne. Podjęto próby lecz nie optymalizowano krystalizacji białka CaAro9p ponieważ uzyskano kryształy o dobrej rozdzielczości dla białka CaAro9CHp.

Białko CaAro8CHp krystalizowało w warunku z zestawu Hampton Grid Screen 2,9 M malonian sodu pH 6 oraz w warunku z zestawu Hampton Index 0,2 M siarczan litu, 0,1 M HEPES pH 7,5, 25% w/v PEG 3,350 (Rys. 59, Rys. 60).

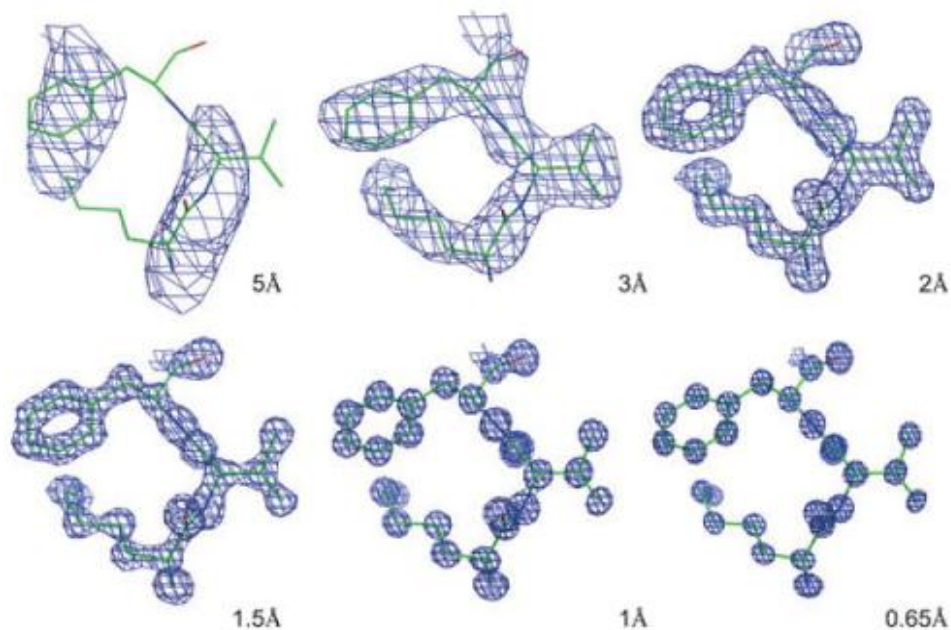


Rys. 59. Kryształy CaAro8CHp, metoda kropli siedzącej 2,9 M malonian sodu pH 6



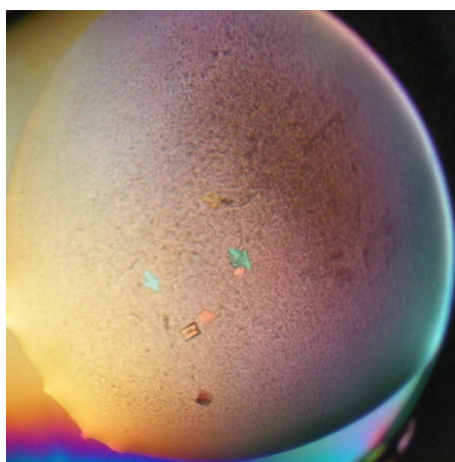
Rys. 60 Kryształy CaAro8CHp, metoda kropli siedzącej 0,2 M siarczan litu, 0,1 M HEPES pH 7,5, 25% w/v PEG 3350

Uzyskane kryształy rozpraszały promieniowanie rentgenowskie do rozdzielczości $\geq 3\text{\AA}$. Taki wynik umożliwiał jedynie na określenie ogólnej struktury białka, niemożliwe było określenie sekwencji aminokwasowej (Rys. 61). Dążono więc do uzyskania kryształu białka, który rozpraszałby promieniowanie rentgenowskie do rozdzielczości $< 2\text{\AA}$. Optymalizowano stężenie preparatu białkowego, pH warunku, stosunek preparatu białkowego do rezerwuaru, skład warunku. Stosowano też dodatek ligandów i substratów (PLP, α -KG, L-Phe, L-AA, PhePi), które mogą stabilizować strukturę enzymu, powodować zmianę konformacji czy spowodować połączenie się dwóch podjednostek enzymu [Patric i in. 1999]. Dla białka CaAro8CHp nie uzyskano jednak lepszego wyniku.



Rys. 61 Rysunek obrazujący mapy gęstości elektronowej w cząsteczce białka obliczone na podstawie danych o różnej rozdzielczości [Wlodawer i in. 2008]

Podjęto próbę krystalizacji białka CaAro8p. Białko krystalizowało w warunku firmy Hampton 0,2 M chlorek magnezu, 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 25% w/v PEG 3350. Uzyskano rozdzielczość $< 2\text{\AA}$ (Rys. 62).



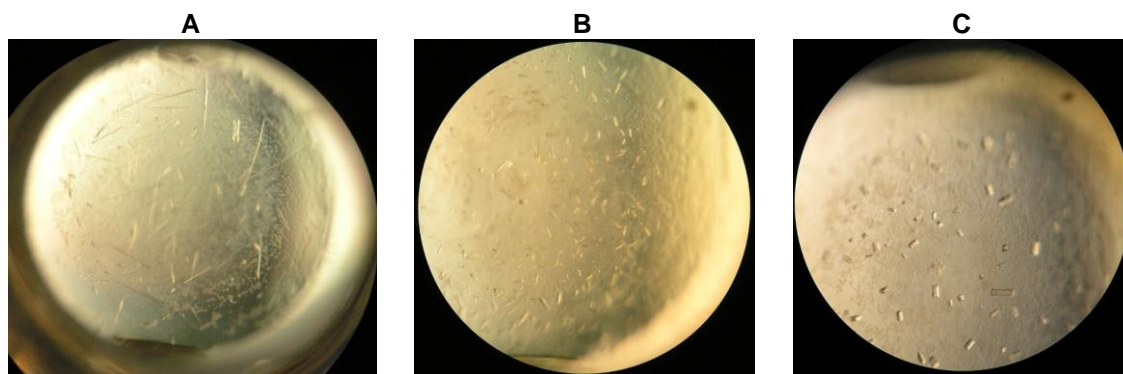
Rys. 62 Kryształy CaAro8p, metoda kropli siedzącej, $4,5\text{ mg mL}^{-1}$ białka, 0,2 M chlorek magnezu, 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 25% w/v PEG 3350

W celu poznania struktury centrum aktywnego enzymu stosowano do krystalizacji dodatek ligandów i substratów (PLP, α -KG, L-Phe, L-AA, PhePi). Uzyskano dane rentgenograficzne z dwóch kryształów białka CaAro8p:

- bez związanych ligandów w strukturze (rozdzielczość 1,96 Å),
- ze związanym PLP i PhePi (rozdzielczość 1,80 Å).

Związane ligandy wprowadzano do struktury kryształu poprzez: nasączenie już powstałego kryształu (dodanie roztworu ligandu do kropli z kryształem) bądź kokrystalizację (wykonywaną przez promotora pomocniczego w moim przewodzie dr Iwonę Gabriel w PICBio PAN w Poznaniu).

Dla białka CaAro9CHp uzyskano kryształy w trzech podobnych warunkach z zestawu MDL Morpheus zawierających 0,06 M chlorek magnezu, 0,06 M chlorek wapnia 12,5% v/v MPD (2-metylo-2,4-pentanodiol), 12,5% PEG 1000, 12,5% w/v PEG 3350 różniących się rodzajem i pH buforów: 0,1 M imidazol-MES pH 6,5, 0,1 M HEPES-MOPS pH 7,5, 0,1 M Tris-BICINE, pH 8,5 (Rys. 63).



Rys. 63 Kryształy CaAro9CHp, metoda kropli siedzącej, 9 mg mL⁻¹ białka, 0,06 M chlorek magnezu, 0,06 M chlorek wapnia, 12,5% v/v MPD (2-metylo-2,4-pentanodiol), 12,5% PEG 1000, 12,5% w/v PEG 3350 A. 0,1 M imidazol-MES pH 6,5, B. 0,1 M HEPES-MOPS pH 7,5, C. 0,1 M Tris-BICINE, pH 8,5

Uzyskano dane rentgenograficzne z dwóch kryształów białka CaAro9CHp:

- ze związanym PLP (rozdzielczość 2,23 Å),
- ze związanym PLP, PhePi i L-AA (rozdzielczość 2,60 Å),

w warunku z 0,1 M Tris-BICINE, pH 8,5.

Kryształy pojawiały się w ciągu tygodnia od nastawienia prób do krystalizacji. Białko CaAro9CHp wykryzalizowało ze związanym PLP pomimo braku dodatku tego ligandu do próby krystalizacyjnej. Podobną sytuację zaobserwowała grupa Bulfer w przypadku białka ScAro8p [Bulfer i in. 2013]. Cząsteczka PLP pochodzi z zasobów komórki gospodarza, świadczy to o silnym wiązaniu PLP do cząsteczki białka CaAro9CHp.

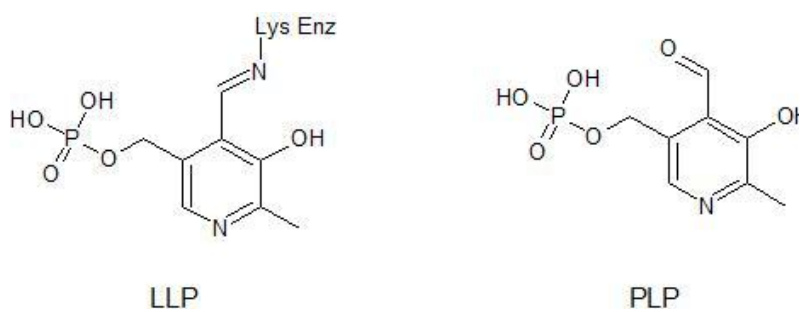
4.3.9.3 Podsumowanie wyników krystalizacji

Tab. 71 Wstępna charakterystyka uzyskanych kryształów białek rekombinantowych CaAro8p i CaAro9CHp

	CaAro8p	CaAro8p +PLP, PhePi	CaAro9CHp +PLP	CaAro9CHp +PLP, PhePi, L-AA
Rozdzielczość (Å)	1,96	1,80	2,23	2,60
R_{faktor} (%)	0,1820	0,1678	0,1736	0,2036
R_{free} (%)	0,2449	0,2212	0,2376	0,2710

	CaAro8p	CaAro8p +PLP, PhePi	CaAro9CHp +PLP	CaAro9CHp +PLP, PhePi, L-AA
RMSDs długość wiązania (Å)	0,0178	0,0197	0,0147	0,0121
RMSDs kąt wiązania (°)	1,8659	1,9773	1,7136	1,5747
Środowisko krystalizacji	0,2M MgCl ₂ , 0,1M Bis-Tris, 25% PEG 3350, pH5,5	0,2M MgCl ₂ , 0,1M Bis-Tris, 25% PEG 3350, pH5,5	0,06 M MgCl ₂ , 0,06 M CaCl ₂ , 0,1 M Tris: BICINE, pH 8,5, 12,5% v/v MPD (2-Methyl-2,4- pentanodiol), 12,5% PEG 1000, 12,5% w/v PEG 3350	0,06 M MgCl ₂ , 0,06 M CaCl ₂ , 0,1 M Tris : BICINE, pH 8,5, 12,5% v/v MPD (2-Methyl-2,4- pentanodiol), 12,5% PEG 1000, 12,5% w/v PEG 3350
Stężenie białka	4,5 mg mL ⁻¹	8 mg mL ⁻¹	9,5 mg mL ⁻¹	9,5 mg mL ⁻¹
Ligandy w strukturze	Brak	Łańcuch A: LLP Łańcuch B: PLP, PhePi	Łańcuch A: LLP Łańcuch B: LLP	Łańcuch A: LLP, L-AA Łańcuch B: LLP, PhePi
Stężenie ligandu	-	0,35 mM PLP 0,33 mM PhePi	Nie dodawano	0,3 mM L-AA 0,3 mM PhePi
Struktura oligomeryczna	Dimer	Dimer	Dimer	Dimer
Cząsteczki rozpuszczalnika w strukturze	Bis-Tris	Bis-Tris, Tris	MPD	MPD, Bicine

W obu kryształach białka CaAro8p związana została cząsteczka Bis-Tris pochodząca z buforu do krystalizacji (Tab. 71). Po wykrystalizowaniu jeden z kryształów CaAro8p nasączono PLP i PhePi. W łańcuchu A zaobserwowano wiązanie pomiędzy Lys300 a PLP (LLP) (Rys. 64) natomiast w łańcuchu B zaobserwowano strukturę ketiminy PLP i L-Phe, która mogła powstać np. z powodu zanieczyszczenia PhePi fenyloalaniną bądź wykorzystaniem przez enzym aminokwasu pozostałego w próbce po dezintegracji komórek *E. coli*. W tym samym kryształach oprócz Bis-Tris związana została cząsteczka Tris pochodząca z buforu stosowanego do oczyszczania białka.



Rys. 64 Struktury PLP i PLP związanego z L-Lys enzymu (LLP)

W obu kryształach CaAro9CHp oba łańcuchy zawierają związaną cząsteczkę PLP z Lys340 (LLP) (Tab. 71). W kryształach, z którym przeprowadzana była kokryształizacja, łańcuch A dodatkowo związał cząsteczkę kwasu L- α -aminoadypinowego, natomiast łańcuch B fenylopirogonian. Zaobserwowano ponadto tylko jedną resztę L-His z domeny histydynowej. Wiązanie przez jedno białko dwóch różnych substratów świadczy o konformacyjnej asymetrii dimeru. Podobną sytuację zaobserwowano dla ScAro8p gdzie jeden łańcuch związał LLP natomiast w drugim znajdowała się cząsteczka PMP [Bulfer i in. 2013] czy w glutamino -1 - semialdehydowej aminomutazie (GSAM) z *Synechococcus* [Hennig i in. 1997]. Asymetryczne

miejsca aktywne bądź pół asymetryczne zostały również opisane dla alaninowej i asparaginowej aminotransferazy [Harris i Bayley 1975; Burnett i in. 1980].

Wszystkie uzyskane struktury są obecnie udokładniane, więc przedstawienie końcowych struktur nie jest jeszcze możliwe.

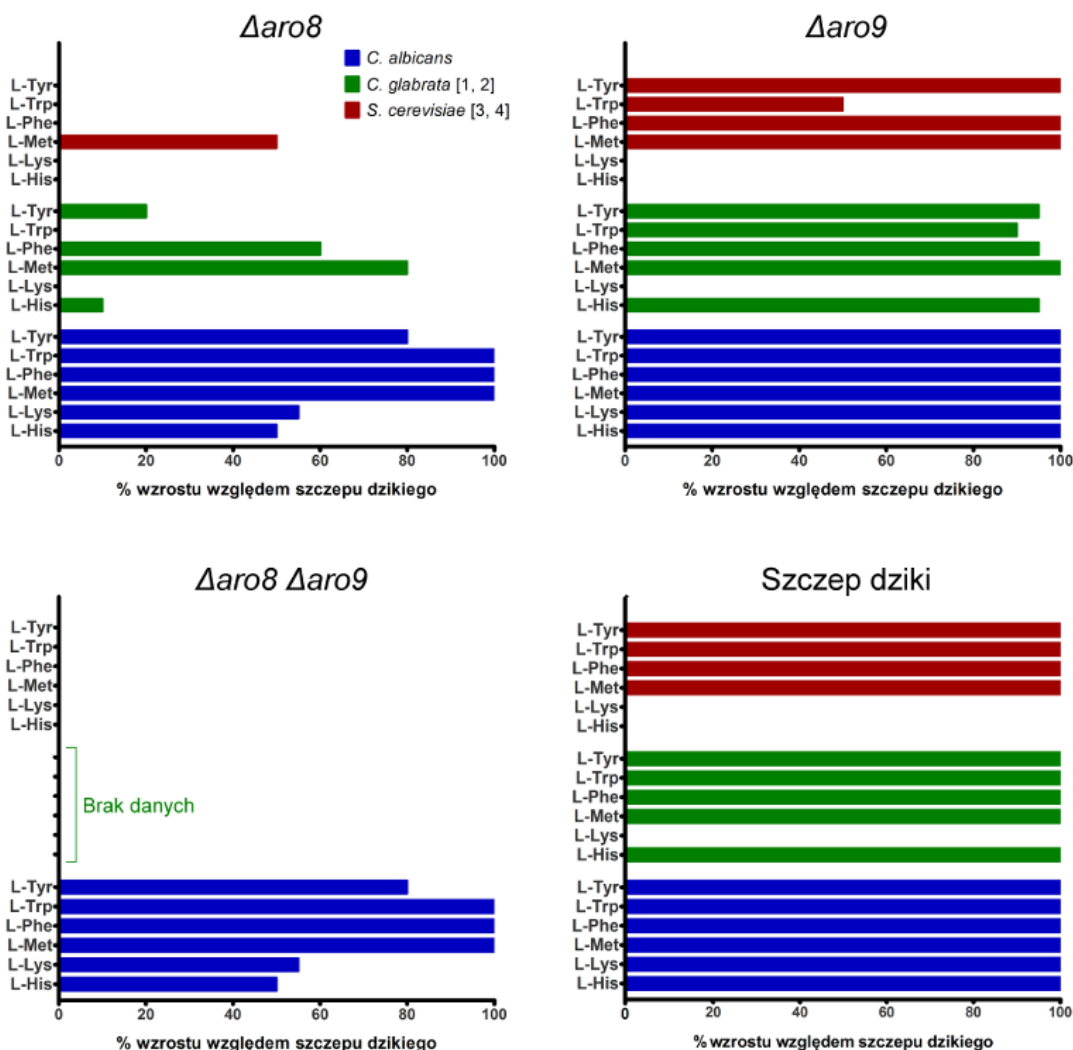
4.4 Dyskusja

Istotnym elementem przeżywalności mikroorganizmów jest zdolność do wykorzystywania różnorodnych składników odżywczych w celu pozyskania azotu i węgla, pierwiastków niezbędnych do prawie wszystkich biosyntetycznych procesów. Główne patogeny grzybowe w procesie ewolucji wykształciły odmienne szlaki metaboliczne umożliwiające im bytowanie w niesprzyjających warunkach. *C. albicans* wyróżnia się unikalną zdolnością przetrwania, może wykorzystywać 20 podstawowych aminokwasów jako źródło azotu [Brunke i in. 2014]. Możliwość ta jest jednym z czynników wirulencji tego drobnoustroju. Ten fakultatywny patogen może istnieć jako komensal jamy ustnej, przewodu pokarmowego i dróg moczowo-płciowych, ale może też być obecny w innych zewnątrzkomórkowych (obieg krwi, tkanki) i wewnątrzkomórkowych mikrośrodkach (wnętrze uszkodzonych komórek nabłonka i śródbłonka) [Brock 2009]. Unikalna zdolność *C. albicans* do wykorzystywania różnorodnych aminokwasów jako źródło azotu może być związana z aktywnością aminotransferaz.

W niniejszej pracy doktorskiej zidentyfikowano pięć genów kodujących enzymy o potencjalnej aktywności aminoadypinowej/aromatycznej aminotransferazy *ARO8*, *ARO9*, *BNA31*, *BNA32*, *YER152C*. Przedstawione badania wykazują, że enzymy Aro8p i Aro9p pełnią inną rolę w metabolizmie komórki *C. albicans* niż w *S. cerevisiae* czy *C. glabrata*. Szczep *C. albicans* $\Delta aro8 \Delta aro9$ nie jest auksotroficzny względem żadnego aminokwasu, podczas gdy usunięcie genów *ARO8* i *ARO9* w *S. cerevisiae* powoduje auksotrofię względem aminokwasów aromatycznych [Urrestarazu i in. 1998] (schemat podsumowujący wpływ delekcji genów *ARO8* i *ARO9* na szybkość wzrostu analizowanych szczepów Rys. 65).

Usunięcie genu *ARO8* bądź *ARO9* w komórce *C. albicans* nie powoduje zaburzenia wzrostu tego szczepu na pożywce YNB z L-Phe czy L-Trp, a nieznaczne różnice w poziomie wzrostu w stosunku do szczepu referencyjnego zaobserwowano na pożywce YNB z L-Tyr (Rys. 36). Całkiem odmienną sytuację podają dane literaturowe dla *C. glabrata*. Mutant *Cg* $\Delta aro8$ rośnie bardzo wolno na wszystkich tych pożywkach, natomiast szczep *Cg* $\Delta aro9$ wykazuje niewielkie opóźnienie wzrostu w stosunku do szczepu referencyjnego. Mutant *Cg* $\Delta aro8$, w porównaniu do szczepu referencyjnego, mniej efektywnie wykorzystuje też L-histydynę i L-metioninę jako źródło azotu [Brunke i in. 2010]. Dane literaturowe podają, że mutant *S. cerevisiae* $\Delta aro8$ jest niezdolny do wzrostu na pożywce YNB z L-Trp, L-Tyr, L-Phe, L-Kyn, podczas gdy mutant $\Delta aro8 \Delta aro9$ jest dodatkowo auksotroficzny względem L-Met [Iraqi i in. 1998; Urrestarazu i in. 1998]. Potwierdzono wyłączność białek ScAro8p i ScAro9p w roli aromatycznych aminotransferaz w komórce *S. cerevisiae* [Urrestarazu i in. 1998]. Grupa Urrestarazu zasugerowała, że ScAro8p z *S. cerevisiae* pełni istotną rolę w biosyntezie L-Phe i L-Tyr, a ScAro9p jest głównie odpowiedzialne za degradację L-Trp. W przypadku zaburzenia funkcjonowania białka ScAro8p

z *S. cerevisiae*, ScAro9p przejmuje jego rolę w biosyntezie L-Phe i L-Tyr [Urrestarazu i in. 1998].



Rys. 65 Poziom wzrostu szczepów delecyjnych $\Delta aro8$, $\Delta aro9$, $\Delta aro8 \Delta aro9$ i szczepu dzikiego *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae* na pożywce minimalnej YNB z różnym źródłem azotu. Opracowanie na podstawie wyników własnych oraz literatury [1, 2] Brunke i in. 2010, Brunke i in. 2014, [3, 4] Iraqui i in. 1998, Urrestarazu i in. 1998

Białko CgAro8p z *C. glabrata* jest również kluczowe w degradacji L-Trp. Szczep Cg $\Delta aro8$ jest praktycznie niezdolny do wzrostu na pożywce YNB z L-Trp jako jedynym źródłem azotu, ponadto usunięcie genu *ARO8* powoduje zahamowanie pigmentacji na pożywce z tryptofanem, co może mieć kluczowe znaczenie dla wirulencji *C. glabrata* [Brunke i in. 2010]. Pigmentacja bowiem pozwala na zabezpieczenie komórki grzyba przed reakcją obronną organizmu. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazują natomiast, że aminotransferazy CaAro8p, CaAro9p z *C. albicans* nie są kluczowe w degradacji tryptofanu, gdyż mutanty pozbawione tych enzymów nie wykazują żadnego defektu wzrostu na pożywce minimalnej z tym aminokwasem. Ponadto niska wartość $k_{kat} K_m^{-1}$ uzyskana dla enzymów CaAro8p i CaAro9p względem L-Trp, może wskazywać na istnienie innych aminotransferaz

w komórce *C. albicans* odpowiedzialnych za utylizację L-Trp, które wykazują wyższą efektywność katalizowanej reakcji. Białko CaBna3p nie jest jednak jednym z nich. Szczepy *CaΔbna31*, *CaΔbna32* czy *CaΔaro8Δbna31Δbna32* rosną na pożywce YNB z L-Trp identycznie jak szczep dziki. Te obserwacje dowodzą, że przy wyższym stężeniu L-Trp w komórce (milimolarnym), białka CaAro8p i CaAro9p wspomagają degradację tego aminokwasu, natomiast główną rolę w utylizacji L-Trp pełni niezidentyfikowana dotąd aminotransferaza. Ta sama aminotransferaza może być zaangażowana w biosyntezę Trp. W drożdżach piekarniczych tryptofan jest metabolizowany poprzez dwie drogi: szlak Ehrlich prowadzący do uzyskania indolo-3-etanolu (typowy dla metioniny, aromatycznych aminokwasów i rozgałęzionych aminokwasów, w którym pierwszy krok katalizowany jest przez ScAro8p i ScAro9p) [Hazelwood i in. 2008] lub przez szlak kinurenowy prowadzący do uzyskania NAD⁺ [Panozzo i in. 2002]. Białko CaBna3p w *C. albicans* (tak jak i inne przebadane aminotransferazy) nie jest samodzielnie odpowiedzialne za biosyntezę, czy degradację któregośkolwiek z białkowych aminokwasów, a badania fenotypu uzyskanych mutantów nie pozwoliły na zrozumienie jego roli w komórce. CaBna3p, tak jak ScBna3p, jest prawdopodobnie zaangażowane w szlak kinurenowy transformacji tryptofanu do NAD⁺, jednakże CaBna3p nie bierze udziału w biosyntezie żadnego białkowego aminokwasu. Pomimo obecności genu *BNA3* w dwóch kopiach *BNA31* i *BNA32* w genomie *C. albicans*, przeprowadzone testy nie wykazały istotnej roli białka w metabolizmie komórki. Również w *S. cerevisiae* rola białka ScBna3p nie jest do końca jasna. Białko ScBna3p było początkowo traktowane jako formamidaza N -formylokinureninowa (FKF) katalizująca drugi krok szlaku kwasu kinurenowego [Panozzo i in. 2002], ale późniejsze badania wykazały, że wykazuje ono funkcje KAT [Wogulis i in. 2008] oraz może katalizować reakcję AmAA [King i in. 2009]. Badania fenotypu mutantów *S. cerevisiae* pozbawionych genu *BNA3* dowodzą istnienie innych białek w komórce posiadających aktywność KAT [Panozzo i in. 2002]. Badania grupy Urrestarazu (1998) wykazują, że rolę tę mogą pełnić białka ScAro9p i ScAro8p. Z kolei badania dotyczące regulacji szlaku biosyntezy NAD⁺ z *S. cerevisiae* dowodzą powiązanie białka ScBna3p z innymi szlakami metabolicznymi [Bedalov i in. 2003].

Badania fenotypu wykazały, że enzymy CaAro8p, CaAro9p, CaBna3p, CaYer152Cp nie pełnią głównej roli w szlaku degradacji czy biosyntezy rozgałęzionych aminokwasów, L-Leu, L-Ile i L-Val. Skonstruowane mutanty z usuniętymi genami *ARO8*, *ARO9*, *BNA31*, *BNA32*, *YER152C* nie wykazują defektu wzrostu na pożywkach minimalnych gdzie jedynym źródłem azotu są wspomniane aminokwasy. Inaczej jest natomiast w komórce *S. cerevisiae*. Usunięcie genów *ARO8* i *ARO9* z genomu drożdży piekarniczych powoduje spowolnienie ich wzrostu na pożywce z jedynym źródłem azotu w postaci leucyny [Urrestarazu i in. 1998]. Natomiast szczep *T. thermophilus ΔlysN*, z usuniętym enzymem TlLys4Np o aktywności AmAA, rośnie wolniej od szczepu dzikiego na pożywce minimalnej a dodatek leucyny, izoleucyny lub waliny do pożywki powoduje zwiększenie szybkości wzrostu mutantu [Miyazaki i in. 2004].

W organizmach grzybowych zawierających wszystkie enzymy szlaku Ehrlicha (np. *S. cerevisiae*), pierwszy krok szlaku degradacji L-Met katalizowany jest przez enzymy

Aro8p i Aro9p. Drugim sposobem utylizacji L-Met jest wykorzystanie tego aminokwasu do produkcji poliamin, spermin i spermidyn. W tym cyklicznym szlaku metionina jest ponownie rekonstruowana przez transamncję 4-metylotio-2-oksobytyranu katalizowaną przez Aro8p, Aro9p i aminotransferazy Bat1p i Bat2p [Pirkov i in. 2008]. Grupa Brunke (2010) potwierdziła istotną rolę białka CgAro8p w metabolizmie metioniny w komórce *C. glabrata*. Mutant *CgΔaro8* wykazywał wolniejszy wzrost na pożywce minimalnej z metioniną jako źródło azotu [Brunke i in. 2010]. Wyniki dotyczące *C. albicans* przedstawione w rozprawie doktorskiej wskazują natomiast, że wzrost skonstruowanych szczepów pozbawionych genów *ARO8*, *ARO9*, *BNA31*, *BNA32*, *YER152C* na pożywce minimalnej z metioniną jako źródło azotu jest identyczny jak wzrost szczepu dzikiego. Żaden z 5 analizowanych enzymów nie jest zaangażowany w katabolizm metioniny w *C. albicans*.

W roku 2010 grupa Brunke wykazała, że degradacja histydyny w *C. glabrata* jest wyłącznie zależna od aktywności enzymu CgAro8p. Umiejętność wykorzystania L-His jako źródła azotu odróżnia *C. glabrata* od *S. cerevisiae*. Drożdże piekarnicze są niezdolne do wzrostu na pożywce YNB z L-His [Brunke i in. 2010; Large 1986]. W niniejszej pracy wykazano, że w *C. albicans*, podobnie jak w *C. glabrata*, białko CaAro8p pełni ważną rolę w metabolizmie L-His. Usunięcie genu *ARO8* z *C. albicans* powoduje zahamowanie wzrostu szczepu mutanta o ok. 50% w stosunku do szczepu dzikiego na pożywce YNB z L-His. Mutant *C. glabrata Δaro8* natomiast był praktycznie niezdolny do wzrostu na pożywce YNB z L-His [Brunke i in. 2010; Brunke i in. 2014]. CaAro8p z *C. albicans* jest istotnym, ale nie jedynym enzymem odpowiedzialnym za katabolizm histydyny, a CaAro9p, CaBna3p i CaYer152Cp nie uczestniczą w tym procesie. W związku z tym, że drożdże, w tym *C. albicans*, nie posiadają genów kodujących aminolizy histydynowe (enzymy kluczowe w katabolizmie histydyny w bakteriiach i innych eukariotach) [Brunke i in. 2014], można przypuszczać, że w *C. albicans* inne aminotransferazy, nie przebadane w tej pracy, mogą być odpowiedzialne za degradację L-His.

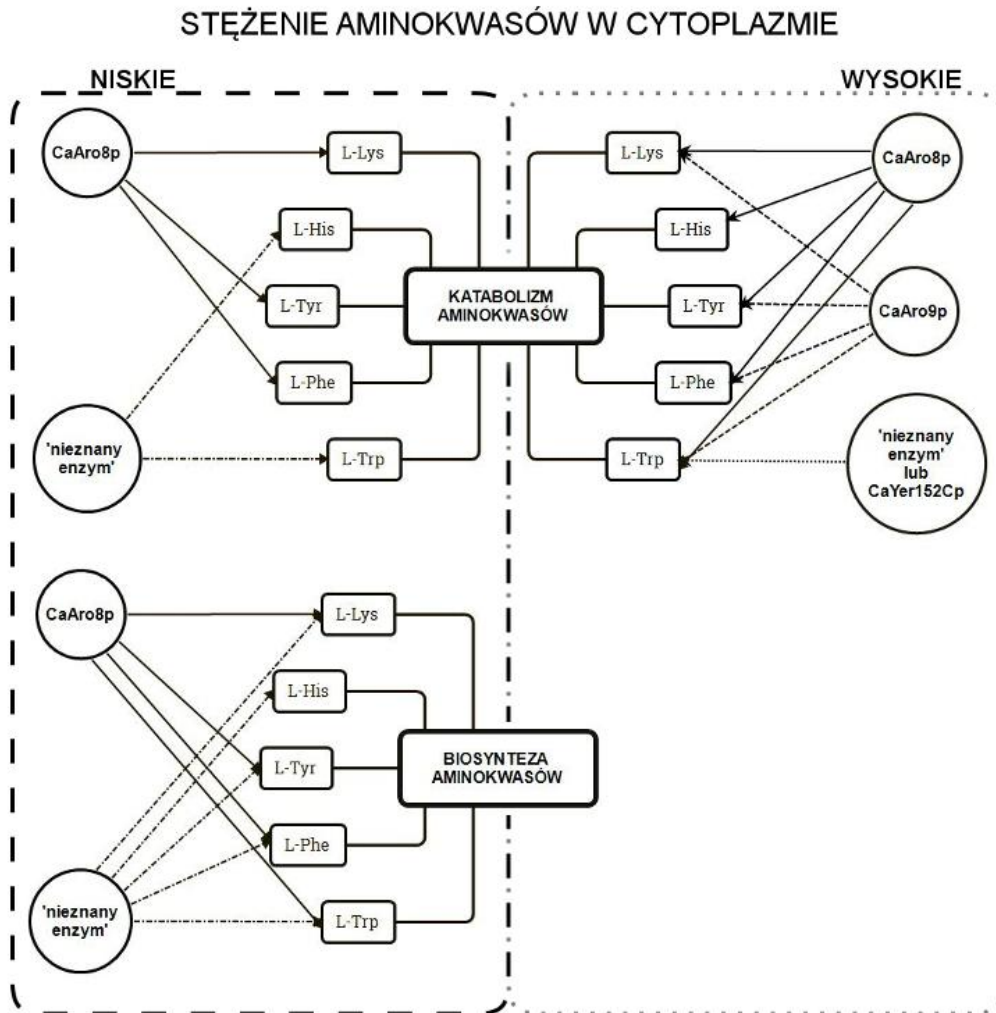
Przebadane aminotransferazy z *C. albicans* pełnią specyficzną i unikalną rolę w metabolizmie L-Lys. Badania kinetyczne wykazały, że białka CaAro8p oraz CaAro9p posiadały aktywność AmAA, jednakże mutanty *CaΔaro8*, *CaΔaro9*, *CaΔaro8Δaro9* nie były auksotroficzne względem L-Lys. Zupełnie inne wyniki uzyskano we wcześniejszych latach w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej badając enzymy katalizujące dwa początkowe kroki szlaku L-AA. Mutanty *C. albicans* pozbawione genów *LYS21* i *LYS22* kodujących izoformy syntazy homocytrynowej czy genu *LYS4* kodującego homoakonitazę wykazywały auksotrofię względem L-Lys [Kur i in. 2010; Gabriel i in. 2014]. Dalsze analizy wykazały, że mutanty *CaΔlys21*, *CaΔlys22* i *CaΔlys4* były zdolne do utylizacji L-AA, intermediatu biosyntezy L-lizyny, co niwelowało ich auksotrofię. Szczep *T. thermophilus* z usuniętym genem *LYSN* kodującym białko o aktywności AmAA nie wykazywał auksotrofii względem L-Lys, ale rósł wolniej na podłożu minimalnym od szczepu dzikiego [Miyazaki i in. 2004]. Natomiast dodatek L-lizyny czy kwasu L- α -aminoadypinowego do pożywki (związków, do których wytworzenia niezbędna jest AmAA) powodował zwiększenie szybkości wzrostu tego szczepu. Nie uzyskano takiego efektu podczas dodania kwasu α -ketoadypinowego (związku,

z którego AmAA wytwarza kwas L- α -aminoadypinowy). Taki wynik potwierdził rolę białka TlLysNp jako α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Ponadto wskazywał na obecność jeszcze jednego enzymu o tej aktywności. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały, że mutanty *C. albicans* pozbawione genu *ARO8* były zdolne do wzrostu na pożywce YNB z L-AA, a różnice we wzroście pomiędzy nimi a szczepem dzikim były statystycznie nieistotne. Dowodzi to wysokiej uniwersalności substratowej aminotransferaz. W przypadku usunięcia jednego enzymu, drugi przejmuje jego rolę. Odmienną sytuację zaobserwowano na pożywce YNB z L-Lys jako jedynym źródłem azotu. Mutant *Ca Δ aro8* rósł wolniej od szczepu dzikiego na pożywce YNB z L-Lys, ale defekt wzrostu mutantów z usuniętym genem *ARO8* na pożywce YNB z L-Lys jest mniejszy, niż na pożywce YNB z L-His. Efektywność kinetyczna *CaAro8p* względem L-Lys i L-His wskazuje jednak na dominującą rolę tego enzymu w katabolizmie L-Lys. Parametry kinetyczne enzymu *CaAro8p*, w szczególności wysokie powinowactwo do L-AA (niskie K_M), potwierdzają jego ważną rolę w degradacji L-Lys. Z kolei mutant *Ca Δ aro9* nie wykazywał żadnego defektu wzrostu na pożywce YNB z L-Lys, białko *CaAro9p* natomiast było zdolne do katalizowania reakcji AmAA zarówno w kierunku degradacji jak i biosyntezy kwasu L-AA. Na podstawie przedstawionych wyników stwierdzić można, że główną rolę w degradacji L-Lys w komórce *C. albicans* pełni białko *CaAro8p*, a wspomagającą, w sytuacjach nadmiaru L-Lys w komórce, białko *CaAro9p*. Unikalną rolę białka *CaAro8p* w tym procesie potwierdza fakt, że *C. glabrata* i *S. cerevisiae* nie są zdolne do wykorzystania L-Lys jako źródła azotu [Brunke i in. 2014] pomimo obecności genu *ARO8* w genomie oby tych szczepów.

Podsumowując przedstawione wyniki wykazują, że białko *CaAro8p* jest najbardziej wszechstronną aminotransferazą spośród przebadanych. Jest zaangażowane w katabolizm L-histydyny, L-lizyny, aromatycznych aminokwasów jak również w biosyntezę L-lizyny, L-feniloalaniny i L-tyrozyny. *CaAro9p* jest mniej ważnym enzymem, uczestniczącym w katabolizmie aromatycznych aminokwasów i L-lizyny, pełni rolę wspomagającą w sytuacji nadmiernej ilości wspomnianych aminokwasów w komórce. Pomimo, że dane literaturowe wskazują, że gen *YER152C* jest silnie zakonserwowany w genomach komórek drożdży, co sugeruje, że pełni istotną rolę w metabolizmie [Hébert i in. 2011] to przeprowadzone w niniejszej pracy badania *in vivo* nie pozwoliły na odkrycie roli białka *CaYer152Cp* w komórce, natomiast jego katalityczne właściwości względem aromatycznych aminokwasów mają marginalne znaczenie. Białko *CaBna3p* jest prawdopodobnie zaangażowane w kinurenowy szlak transformacji L-tryptofanu do NAD^+ ale nie bierze udziału w biosyntezie żadnego białkowego aminokwasu. Żadna z badanych aminotransferaz nie jest jedyną odpowiedzialną za degradację czy biosyntezę pojedynczego białkowego aminokwasu. Żadna z badanych aminotransferaz nie jest też bezpośrednio powiązana z patogennością szczepu *C. albicans* co wykazały testy transformacji morfologicznej Y \rightarrow M i sprawdzenie zdolności do wytwarzania biofilmu. Jak wspomniano wcześniej, możliwość wykorzystania szerokiego spektrum aminokwasowego jako źródła składników odżywczych w organizmie gospodarza jest wyraźnie korzystne dla grzybów chorobotwórczych [Brock 2009]. Wyniki przedstawionych badań

potwierdzają wszechstronność aminotransferaz *C. albicans* stanowiącą podstawę dla żywieniowej elastyczności tego ludzkiego patogenu.

Na podstawie uzyskanych danych zasugerowano model roli CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp w metabolizmie L-Lys, L-His i aromatycznych aminokwasów (Rys. 66)



Rys. 66 Sugerowany model roli CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp w metabolizmie L-Lys, L-His i aromatycznych aminokwasów

5 PODSUMOWANIE

1. W genomie *C. albicans* zidentyfikowano pięć genów kodujących enzymy o przypuszczalnej aktywności AmAA ARO8, ARO9, YER152C oraz BNA3 (występujący w dwóch kopiach: BNA31 i BNA32).

2. Skonstruowano mutanty delecyjne: *CaΔaro8*, *CaΔaro9*, *CaΔbna31*, *CaΔbna32*, *CaΔyer152C*, *CaΔaro8 Δaro9*, *CaΔaro8 Δbna31*, *CaΔaro8 Δbna32*, *CaΔaro8 Δyer152C*, *CaΔaro8 Δbna31 Δbna32*. Mutanty z usuniętym genem ARO8 wykazywały nieznaczne zahamowanie wzrostu na podłożu minimalnym z dodatkiem L-Lys, L-His i L-Tyr, co oznacza że produkt tego genu, czyli enzym CaAro8p, odgrywa istotną rolę w szlaku degradacji tych aminokwasów, jednak nie jest jedynym enzymem w komórce wykazującym taką aktywność. Pozostałe mutanty były w stanie wykorzystywać jako jedyne źródło azotu wszystkie z 19 przebadanych aminokwasów, z efektywnością równą szczepowi wyjściowemu.

3. Sprawdzone wpływ inhibitora aminotransferaz AOA na wzrost analizowanych mutantów. Uzyskane wyniki wykazały, że degradacja L-Lys jest całkowicie zależna od obecności aminotransferaz, CaAro8p, CaAro9p oraz prawdopodobnie także innych, nieprzebadanych w tej pracy. Natomiast biosynteza L-Lys nie zależy od CaAro8p ani od innej badanej aminotransferazy.

4. Usunięcie genów kodujących enzymy CaAro8p, CaAro9p, CaBna3p, CaYer152Cp nie wpłynęło na przeżywalność szczepu *C. albicans* w warunkach *in vitro*, ani na jego podstawowe procesy biochemiczne. Testy *in vitro* wykazały, że enzymy te nie miały również wpływu na zjadliwość badanego szczepu (zdolność transformacji morfologicznej Y → M, zdolność do wytwarzania biofilmu).

5. Zoptymalizowano nadprodukcję białek CaAro8p, CaAro8CHp, CaAro9p, CaAro9CHp, CaYer152Cp, CaYer152CHp. Stopień nadprodukcji mieścił się w zakresie 9-32% wszystkich białek. Nie uzyskano nadprodukcji CaBna3p i CaBna3CHp w komórkach *E. coli*.

6. Zoptymalizowano oczyszczanie białek rekombinantowych za pomocą chromatografii metalopowinowactwa dla białek z domeną fuzyjną oligoHis (CH) oraz za pomocą chromatografii jonowymiennej dla białek typu dzikiego.

7. Przy pomocy filtracji żelowej oraz elektroforezy w warunkach natywnych wykazano, że białka CaAro8CHp, CaAro9CHp i CaYer152CHp mogą występować zarówno w formie monomeru i dimeru.

8. Wykazano, że białka CaAro8CHp, CaAro9CHp są enzymami PLP zależnymi.

9. Białka CaAro8p i CaAro9p katalizują reakcje α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Oba enzymy wykazują powinowactwo do L-feniloalaniny, L-tyrozyny i L-tryptofanu. CaAro8p katalizuje reakcje z udziałem L-histydyny i L-kinureny oraz katalizuje reakcje rozkładu i syntezy aromatycznych aminokwasów. Domena oligoHis na C końcu nie zmieniła parametrów kinetycznych białek CaAro8p i CaAro9p natomiast wprowadzenie domeny

oligoHis całkowicie zaburzyło funkcje katalityczne białka CaYer152Cp. Białko CaAro8p wykazuje najwyższą efektywność katalityczną względem kwasu L- α -aminoadypinowego i α -ketoadypinianu. Enzym ten katalizuje biosyntezę i degradację kwasu L-AA z równą efektywnością. Białko CaAro9CHp wykazuje najwyższą efektywność katalityczną względem α -ketoadypinianu. Białko CaYer152Cp jest aminotransferazą funkcjonującą jedynie w kierunku degradacji aminokwasów aromatycznych.

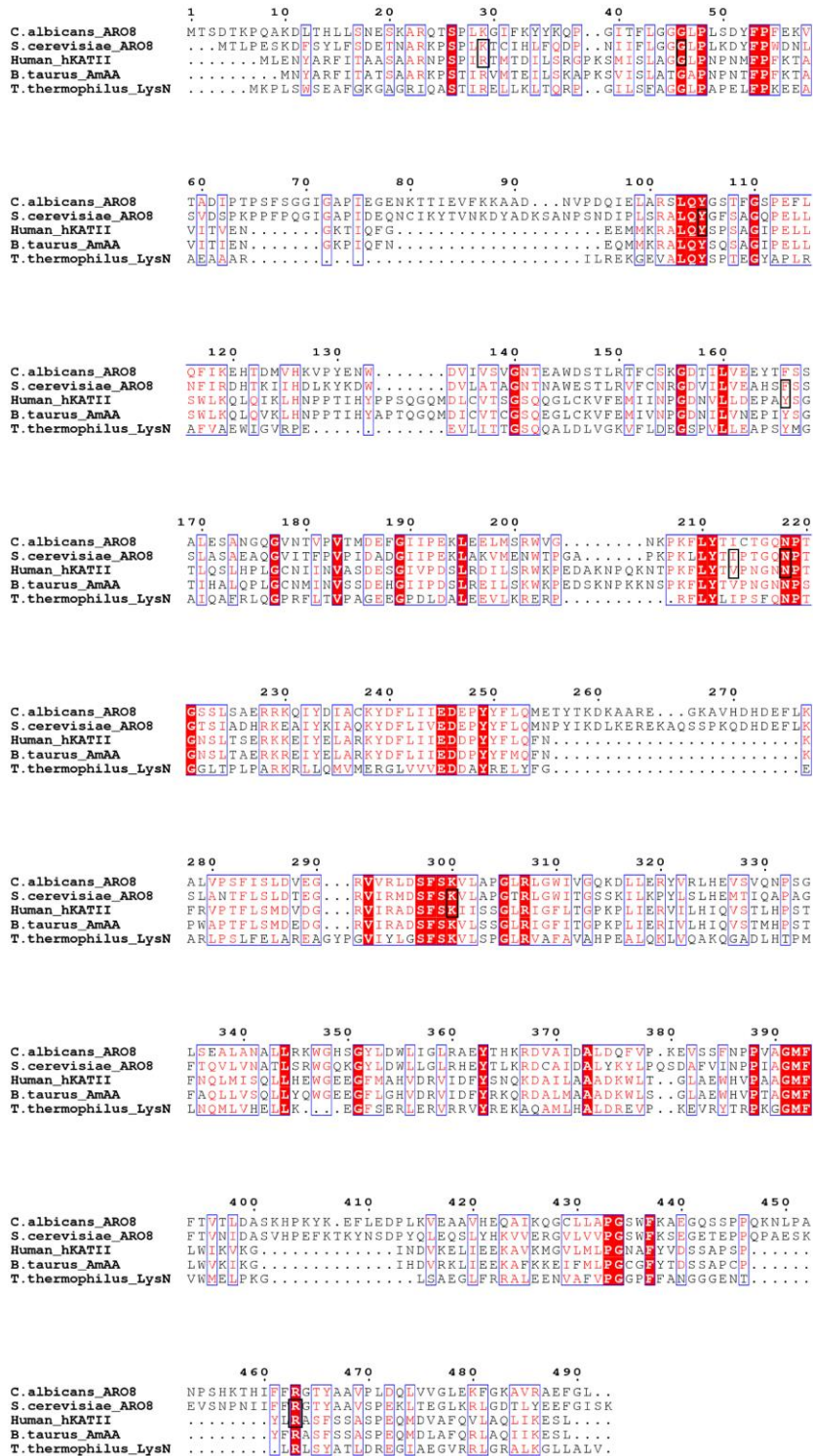
10. Optymalnym pH działania enzymów CaAro8p i CaYer152Cp jest pH 8, natomiast dla CaAro9p pH 8,5.

11. Aktywność białka CaAro8p nie jest hamowana przez obecność końcowego produktu szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego tj. L-lizynę (brak regulacji enzymu na zasadzie sprzężenia zwrotnego). Związek AOA jest najbardziej skutecznym inhibitorem białka CaAro8p i CaAro9p spośród badanych.

12. Uzyskano dane rentgenograficzne z dwóch kryształów białka CaAro8p: bez związanych ligandów w strukturze oraz ze związanym PLP i PhePi. Uzyskano również dane rentgenograficzne z dwóch kryształów białka CaAro9CHp: ze związanym PLP oraz ze związanym PLP, PhePi i L-AA. Wszystkie uzyskane struktury są obecnie udokładniane, więc przedstawienie końcowych struktur nie jest jeszcze możliwe.

ZAŁĄCZNIK 1

A)



Rys. 67 Porównanie sekwencji aminokwasowej białek A) CaAro8p, B) CaAro9p, C) CaBna3p, D) CaYer152Cp z *C. albicans* z sekwencjami znanych α -aminotransferaz L- α -aminoadypinowch. Zakonserwowane reszty zaznaczono jako białe litery na czerwonym tle, podobne reszty aminokwasowe zaznaczono na czernono, najbardziej istotne reszty biorące udział w wiązaniu PLP i substratów w hKATIIp i ScAro8p zaznaczono na czarno [Rossi i in. 2008; Han *et al.*, 2009; Bulfer i in. 2013]. Zastosowano programy ClustalW [Larkin i in. 2007] i ESPript [Robert & Gouet 2014] do wygenerowania porównania

B)

```

1      10      20      30      40
C.albicans_ARO9      .....MSDFTHLISKRAAGRTSVHFTNAPS DKPPANFKPHEKPTIASYGP
S.cerevisiae_ARO9    MTAGSAPPVDYITSLKKNFQPFLLSRIVENRSLKSFDA.....SDISDDVIELAGGMP
S.cerevisiae_ARO8    MTL.....PESKDFSYLFSDETNAKPKSPFL...LDFLHFOPPNLIIFLGGGMP
Human_hKATII        .....MLENYARFTTASARNPSPFHTM...TDLISRGPKSMISLAGGMP
B.taurus_AmAA       .....MNYARFIIATSAARPKPSTIRVM...TEIILSKAPKVISLISLATGMP
T.thermophilus_LysN .....MKPLS.....WSEAFGKGAGRIQASTI....RELKLTQRPGLISFAGGMP

50     60     70     80     90     100
C.albicans_ARO9      NHGFFIDSDVNIVDYPPFKITTPSTSSSTAEPEPPSSSLNGSENGHQTKPTPSSIHPT
S.cerevisiae_ARO9    NERFFIEISMDLKIISKVFFNDNPKWHNSF.....LHFKVDFVSRINRPAFSD...ETESNND
S.cerevisiae_ARO8    LKDYFWDNLISVDSPPKPPFQGIAPIDEQN.....CIKYT
Human_hKATII        NPNMFFFKTAVITVENG.....
B.taurus_AmAA       NPNTFFFKTAVITVENG.....
T.thermophilus_LysN APFLFFKEEAEAAARI.....

110    120    130    140    150
C.albicans_ARO9      QSTVHISRHTDPKLIIDLARGLQAAVEGHAPTLQFARDFIIRTHKPNYD.....DWN
S.cerevisiae_ARO9    .TTAH..LDLGSPELPLARSFQAEIKGLPPLHFFVDFVSRINRPAFSD...ETESNND
S.cerevisiae_ARO8    VNKDYADKSAIPSNIDIPISRALQAFSAQOPELNFRDRHTKTIHDLKFK....DWD
Human_hKATII        .....KTIQFGEEMKRRALQSPSAGIPELISWIKQIQIKLHNPPTIHYPPSQGQMD
B.taurus_AmAA       .....KPIQFNEQMMKRRALQSPSAGIPELISWIKQIQIKLHNPPTIHYPPSQGQMD
T.thermophilus_LysN .....LREKGEVALQVSPTEGYAPLRAPVAEWIGVR.....PEE

160    170    180    190    200    210
C.albicans_ARO9      VFTTIGASDGNKAAADVFLDDGDVTLVVEEFTFSFFLRFSDNAAKAVVPVKIN..FDNDSD
S.cerevisiae_ARO9    VILSCSNDSEKVFETICDESTTVMIEEFTFTAMSNVEATCAKVIIPKMNITPDRBSQ
S.cerevisiae_ARO8    VLATAGTNNAWESLDRVFCNRGDVILVEAHSISSSLASAEAOVITFPFPI....DAD
Human_hKATII        LCVTSGSQGLCKVEMINPQDNVLDPEASGTLQSLHPLCNINVAS.....DES
B.taurus_AmAA       LCVTSGSQGLCKVEMINPQDNVLDPEASGTLQSLHPLCNINVAS.....DEH
T.thermophilus_LysN VVLTIGSQQAIDLVLGKVFLDGSPVLLREAPSYMGAIQAFRLQPRFLTPA....GSE

220    230    240    250    260    270
C.albicans_ARO9      GIDLTFQVLDLENWEK.HY..PNLPKRALYTTATGQNPFGFTOSLEFRKKIYDLAVRYD
S.cerevisiae_ARO9    GLDVTLTQLLDNWSITGPI..KDLNKREVTATGQNPFGFTOSLEFRKKIYDLAVRYD
S.cerevisiae_ARO8    GIDLPKLRVLDNWSITGPI..KDLNKREVTATGQNPFGFTOSLEFRKKIYDLAVRYD
Human_hKATII        GIVPDSLRDILSRWKPEDAKNPKNTPEFLYTPNGNNGPNSLTSERKREIYELARKYD
B.taurus_AmAA       GIDPDSLRDILSRWKPEDAKNPKNTPEFLYTPNGNNGPNSLTSERKREIYELARKYD
T.thermophilus_LysN GDDLDALEEVLK.....RERPRFLYLPSPQNPFGGLTPLPAKRRLIQVMVERG

280    290    300    310    320    330
C.albicans_ARO9      FAITEDDPYGYITLPKYEKPNIGSGSGNNELKNDLEIDDYLNHLPSTYLEDLTD...G
S.cerevisiae_ARO9    FLIVEDDPYGYIYFSPYNQPEPLE...NPYHSSDLTTERYLNDFLKKSFLLDLD...A
S.cerevisiae_ARO8    FLIVEDDPYGYIYFSPYNQPEPLE...NPYHSSDLTTERYLNDFLKKSFLLDLD...A
Human_hKATII        FLIVEDDPYGYIYFSPYNQPEPLE...NPYHSSDLTTERYLNDFLKKSFLLDLD...G
B.taurus_AmAA       FLIVEDDPYGYIYFSPYNQPEPLE...NPYHSSDLTTERYLNDFLKKSFLLDLD...G
T.thermophilus_LysN LVVVEDDPAEYRELYFGE.....ARLPSLFEELARAGYF

340    350    360    370    380
C.albicans_ARO9      RVLRVETFSKIFAPGIRGFTVGHKEVIDAVKNYSVVNRGASGLTCTIVNNVITQE...
S.cerevisiae_ARO9    RVLRLTFSKIFAPGIRGFTVGHKEVIDAVKNYSVVNRGASGLTCTIVNNVITQE...
S.cerevisiae_ARO8    RVLRMDSFSKIVLAPGIRGFTVGHKEVIDAVKNYSVVNRGASGLTCTIVNNVITQE...
Human_hKATII        RVLRADFSKIFISSGIRGFTVGHKEVIDAVKNYSVVNRGASGLTCTIVNNVITQE...
B.taurus_AmAA       RVLRADFSKIFISSGIRGFTVGHKEVIDAVKNYSVVNRGASGLTCTIVNNVITQE...
T.thermophilus_LysN RVLVYGSFSKIVLAPGIRGFTVGHKEVIDAVKNYSVVNRGASGLTCTIVNNVITQE...

390    400    410    420    430
C.albicans_ARO9      .....NFKGVDGWIIEWILKMRNLVSYRFDLLLYSTIFESQAYKKGYVDVIDPRKGMFV
S.cerevisiae_ARO9    NLSLSLMSKREAFEGWJRWIMQIASKNHRKNLTLKALVETESYQAGQFTVMBSA...GMFV
S.cerevisiae_ARO8    .....WGQKYLHWLGLRHEVTLKNDCAIDALYKLP..QSDAFVINDP...GMFV
Human_hKATII        .....WGEBFMAHVDRVIDFVSNQKDAI LA AADK...WLTGLAEWHVPAAGMFI
B.taurus_AmAA       .....WGEBFGLGHVDRVIDFVRKQNDALMAAADK...WLTGLAEWHVPAAGMFI
T.thermophilus_LysN .....GFSERLERRVRRVYRERQAAMLHALDREVP...KEVRYTRPRKGMFV

440    450    460    470    480
C.albicans_ARO9      TFKINLP.....KDVVDLQMKMLDLWKLISYGLLVVVGYNMTVD.....LE
S.cerevisiae_ARO9    IIKINWGNFD.....RPDDLQOMDILDKFLLKNGVKVVI...GYKMAVC.....PN
S.cerevisiae_ARO8    TVNIDASVHPEFKTKYNSDPYOLEQSILYHKVVERGVLVVVG...GWFKSEGETEPPQPAESKE
Human_hKATII        WVKIRGIN.....DVRKLEEKAKKKEIFMLPGCGFYDSS.....
B.taurus_AmAA       WVKIRGIN.....DVRKLEEKAKKKEIFMLPGCGFYDSS.....
T.thermophilus_LysN WMELPKGL.....SAEGFRRALENNVAFVVG...GPFVFANGG.....

490    500    510    520
C.albicans_ARO9      FSKDRSNFSLICYALANNDDETLESKRITDAVYVFFSNGLEF
S.cerevisiae_ARO9    YSKQNSDFRLTIAYARDDQLIEASKRIGSGIKKFFDNYKS.
S.cerevisiae_ARO8    VSNPNIIFFRGTAAV..SPKLTLEGLKRLGDTLYEFEGISK..
Human_hKATII        ...APSPVIRASFSSA..SPQMDVAFQVLAQLIKRESL.....
B.taurus_AmAA       ...APCPYIRASFSSA..SPQMDLAFORLAQIKRESL.....
T.thermophilus_LysN ...GENHILRSYATLIDRQGIAEGVRLIGRAIKRGLLALV...
```

C)

```

1          10          20          30          40          50
C.albicans_BNA3 MLRRLPFTRQLVTTTRAMASKSTDPTSLHNPYFYQKPGQKDTWSTINEATAAQ.....
S.cerevisiae_BNA3 .....MKQRFRIQFTNLMSTSRPKVANK.YFTONTAKDWWSLTNEAAK.....
S.cerevisiae_ARO8 .....MTLPESKDFSYLFSDETNAARKPSPIKTCIHLFQ..DPNIIIFLGGELPLKDYFPWDL
Human_hKATII .....MLENYARFITAASAARNPSPIKRTMTDILSRGPKSMISLAGLPPNPMFPFKTA
B.taurus_AmAA .....MNYARFITATSAAARKPSPIRVMTEILSKAPKSVISLATGAPNPNTFPFKTA
T.thermophilus_LysN .....MKPLSGWSEAFGKGAAGRIQASTIRRELLKLTQ..RPGQLSFAAGLUPAPELFFPKEEA

60          70          80          90          100
C.albicans_BNA3 ...AQ.....QESGEPVNLGQGFSSYNP.PEFAINAVEEALT..KPOFNQYAHARGNPN
S.cerevisiae_BNA3 ...AAN..NSKNOGRELINLGGFFSYSP.PQFAIKEAQKALD..IPMVNOVSPTRGRPS
S.cerevisiae_ARO8 SVDSPKPPFPQGIQAPIDEQ..NCIKYTVNKDYADKSANPSNDIPLSRALQVPSAQQPES
Human_hKATII VITVEN.....GK.....TIQFGEEMMKRALQVPSAQQPES
B.taurus_AmAA VITVEN.....GK.....PIQFNEQMMKRALQVPSAQQPES
T.thermophilus_LysN AEAAAR.....L.....ILREKGEVALQVPSAQQPES

110         120         130         140         150
C.albicans_BNA3 LKQVAEHYSRSY.....GRAVGVDEVQITPCANEGMFAIFFAFLTPGDEVIVFVFF
S.cerevisiae_BNA3 LNSLTKLYSPIY.....NTELKAENVTVPCANEGILSLCLMGLLNAQDEVIVFVFF
S.cerevisiae_ARO8 LNFIRDHTKIHDLY.....KWDVLAAPAGNINAWESTLRVFCNRQDQVILVVAHSF
Human_hKATII LSWLKQLQIKLHNPPTIHYPPSQGMDLGVNCSQQGLCKVFEIINPQDNLVLEFAL
B.taurus_AmAA LSWLKQLQVQLHNPPTIHYAPQCGMDICVHCGSGEGCKVFEIIVNRCNIIIVNEIY
T.thermophilus_LysN LRAFLVAEWIGV.....RPEVLLITGSGQAQLDLVGKVFLEDEGSPVILLEASVY

160         170         180         190         200         210
C.albicans_BNA3 DQYIPNVEMTCAKIKYVSIKYPKFDNE.VVTGQDWEIDWELNNAITDKTKIIVTNTFH
S.cerevisiae_BNA3 DQYIPNIELCGCKVYVYVFINPPKELDQR.NTRGEEWTFIDFQFEKAITSKTRAVIINTFH
S.cerevisiae_ARO8 SSSLASAEAAQVITFPVPIDADGIIPEKLAKVMENWTPGA.....PKPKLIVTTPCQ
Human_hKATII SGTLQSLHPLCCNIIINVASDESGIVPDSLRLDILSRWKKPEDAKNP.QKNTPKFLIYVTPGN
B.taurus_AmAA SGTIHALQPLCCNMINVSSDEHGIIPDSLREILSKWKKPEDSKNP.KKNSPKFLIYVTPNGN
T.thermophilus_LysN MGAIQAFRLCCPRFLTVPAGEEGPDLDALEEVLRKJ.....ERPRFLIYVTPSFO

220         230         240         250         260
C.albicans_BNA3 NPIGKVFTTEELYKTCGLAVEHNLTLVSDDEVYENLYYTDKFPFPAAL.....
S.cerevisiae_BNA3 NPIGKVFTREELTTCNLCVKNHVVIISDEVYSHLYFTDSFTRIALT.....
S.cerevisiae_ARO8 NPIGTSIADHRKEATYKIAQKYDFLIVDEDPYVFLQMNPIYKDLKEREKAQSSPKQDHDE
Human_hKATII NPIGNSLTSEKKEIYELARKYDFLIIEDDPYVFLQFNKF.....
B.taurus_AmAA NPIGNSLTAERKREIYELARKYDFLIIEDDPYVFMFNKP.....
T.thermophilus_LysN NPIGGLTLPARKRRLQVMVMERGLVVVEDDAYRELYFGEA.....

270         280         290         300
C.albicans_BNA3 .....PQLPEL.....AERTITVGSAGKSF AATGWRVGYIQG.PANLIKPVTAAHTRIC
S.cerevisiae_BNA3 .....SPEI.....GQLTLTVGSAGKSF AATGWRIGWVLSLNAELLSYAKAATRIC
S.cerevisiae_ARO8 FLKSLANTFLSLDT...EGRVIRMDSPSK.VLAPGRLGWITGSSKILKPYLS.LHEMTI
Human_hKATII .....RVPTFLSMDV...DGRVIRADSPSK.IISSGRIGLFTGPKPLIERVVL.HIQVST
B.taurus_AmAA .....WAPTFLSMDV...DGRVIRADSPSK.VLSSGRIGLFTGPKPLIERVVL.HIQVST
T.thermophilus_LysN .....RLPQLPELAREAGYPGVLYLGSFSK.VLSPGRVAFVAHPEALQKLVQAKQVQAD

370         380         390         400         410         420
C.albicans_BNA3 EGGYFVLVNLDSKVKIPADYEPFGTISDRGTLDFKLAAYWLTKIIGVVGHPTPEFLTEWNRK
S.cerevisiae_BNA3 EGYFVLVNDPSKVKIPEDYYPPEILNKG.KDFRISHWLINELGVVAAPTEFYIKEH...
S.cerevisiae_ARO8 IAGMFTVNDASVHPEFKT...KYNSDPYQLRQSLYHKKVVERGVLVNPSWPKSEGETE
Human_hKATII AAGMFLWIKVGIN.....DVKELIEKAVKMGVLMVPCNAFYVDSAP
B.taurus_AmAA TAGMFLWIKVGIN.....DVKELIEKAVKMGVLMVPCNAFYVDSAP
T.thermophilus_LysN KGMFLVWMLPKGL.....SAGELFRRALLENVAFVGGFFFANGGGE

430         440         450
C.albicans_BNA3 .....GNLENCVRFVCKDDSVIEDAVERLKHLDKDYI.....
S.cerevisiae_BNA3 .....EKAENLLRFVCKDDAYLQNAVERLKHLDKDYI.....
S.cerevisiae_ARO8 PPQPAESKEVSNPIIFRRTYAAVSPKLTTEGLKRLGGTLEEFGISK
Human_hKATII .....SPVLEASFSASPEQMDVAFQVLAQILKESSL...
B.taurus_AmAA .....CPYFRASFSASPEQMDLAFQVLAQILKESSL...
T.thermophilus_LysN .....NTRLRSYATLDRREGLAEGVRRLLGRALKGLLALV.

```

D)

```

                                     1      10      20
C.albicans_YER152C .....MINKFFKGHITRELLDVEITADS
S.cerevisiae_YER152C .....MKYKINFFKGBSSRLLPREAVIQ
T.thermophilus_LysN ...MKPLSWSEAFGRGAGRIQASTIRELLKLTQ...RPGILRFAGGAPAPELFPKREAAEA
S.cerevisiae_ARO8  MTLFESKDFSYLPSDETARAKPSIIRTCIHLFQ...DPMITFLGGGALDKYFDWDLISVD
Human_hKATII      ...MLENYARFITAASARNPSPITMTDILSRGPKMISLAGCAPNPNMPEPKTAVIT
B.taurus_AmA     ...MNYARFITAASARKPSTIRVMTEILSKAPKSVISLATCAPNPNMPEPKTAVIT

                                     30      40      50      60
C.albicans_YER152C YKRV.....LLSDYLSYDTPN...NOIPFLCYGTDPEQNLDFREVIT
S.cerevisiae_YER152C T.AA.....ILGPEFREYNDPY...NRHPLVGSDBGALWVREQ
T.thermophilus_LysN AAR.....ILREKQVAALVYGTQVAFRAFV
S.cerevisiae_ARO8  SPKPPFPQIGAPIDEQNCIKYTVNKDYADKSANPSNDIPLSRALYGFSGQPELJLNFIT
Human_hKATII      VEN.....GK.....TIQFGEEMMKRALYGFSGQPELJLNSM
B.taurus_AmA     IEN.....GK.....FIQFNEQMMKRALYGFSGQPELJLNSM

                                     70      80      90      100
C.albicans_YER152C AQWVNK...KFGA.....QVSDPNCINLTCARFYGNLTSVTSP...KITQRVTVVT
S.cerevisiae_YER152C CTFLND...QLFKFENGARSRTRADYLNLNNGAGSYGMNLNLLQTTLPHNGYTRQAFITIT
T.thermophilus_LysN AEWIGV.....RPEEVLTITGSAQALDLV.....KVFIDE
S.cerevisiae_ARO8  RDHFKIHDLYK.....RMDLATAINAMGSSIL.....RFDVFN
Human_hKATII      KQLQIKLHNFTHVPPS...QGMDLCTGCGSEGLCKV.....EMTVNP
B.taurus_AmA     KQLQVKLHNFPTIHYAPT...QGMDLCTGCGSEGLCKV.....EMTVNP

                                     110     120     130     140     150     160
C.albicans_YER152C FTYFLINSCFVVDGDDRDITATEETHN.....GKYSIDLVLVQQIQKYSQDLFVPHD
S.cerevisiae_YER152C FTYFLINSCFVVDGDDRDITATEETHN.....GKYSIDLVLVQQIQKYSQDLFVPHD
T.thermophilus_LysN FTYFLINSCFVVDGDDRDITATEETHN.....GKYSIDLVLVQQIQKYSQDLFVPHD
S.cerevisiae_ARO8  GDVILVE...AHSSSSLASAEAGVITFPVPIDADGILPRLAKVMENWTPG.....
Human_hKATII      GDVILVE...EPLISGTLHSLQPLGCNINVSDEHGIFPDRDILSRWKPE.....
B.taurus_AmA     GDVILVE...EPLISGTLHSLQPLGCNINVSDEHGIFPDRDILSRWKPE.....

                                     170     180     190     200     210     220
C.albicans_YER152C DINVFPPDVRGTRKYYRFVYLVDFEINPSCGLNYTLETQKVEIARXYDLLLISDQVVE
S.cerevisiae_YER152C STTEMIQPKLTKKYYRYVYVYVDFEINPSCGLNYTLETQKVEIARXYDLLLISDQVVE
T.thermophilus_LysN .....ERPRFLVLEDFNPTGLITPLPARKRLLQVMVERGLVVEVDAVR
S.cerevisiae_ARO8  .....A.....PKPKLVLEDFNPTGLITPLPARKRLLQVMVERGLVVEVDAVR
Human_hKATII      .....DARKNPKKVPKPKLVLEDFNPTGLITPLPARKRLLQVMVERGLVVEVDAVR
B.taurus_AmA     .....DSKNPKKSPKPKLVLEDFNPTGLITPLPARKRLLQVMVERGLVVEVDAVR

                                     230     240     250     260
C.albicans_YER152C FLDYTDISK...PLPR.....LN.....Q...LDKAGATKYNTISNAITFSKTIAP
S.cerevisiae_YER152C FLDYTDISK...PLPR.....LN.....Q...LDKAGATKYNTISNAITFSKTIAP
T.thermophilus_LysN FLDYTDISK...PLPR.....LN.....Q...LDKAGATKYNTISNAITFSKTIAP
S.cerevisiae_ARO8  FLQFNK...PLPR.....LN.....Q...LDKAGATKYNTISNAITFSKTIAP
Human_hKATII      FLQFNK...PLPR.....LN.....Q...LDKAGATKYNTISNAITFSKTIAP
B.taurus_AmA     FLQFNK...PLPR.....LN.....Q...LDKAGATKYNTISNAITFSKTIAP

                                     270     280     290     300     310
C.albicans_YER152C CRVGVQETATPKVVDQ...ITGS...RSGT...NQLSTLVVADIKTGTI...DEIAKFKNV
S.cerevisiae_YER152C CRVGVQETATPKVVDQ...ITGS...RSGT...NQLSTLVVADIKTGTI...DEIAKFKNV
T.thermophilus_LysN CRVGVQETATPKVVDQ...ITGS...RSGT...NQLSTLVVADIKTGTI...DEIAKFKNV
S.cerevisiae_ARO8  CRVGVQETATPKVVDQ...ITGS...RSGT...NQLSTLVVADIKTGTI...DEIAKFKNV
Human_hKATII      CRVGVQETATPKVVDQ...ITGS...RSGT...NQLSTLVVADIKTGTI...DEIAKFKNV
B.taurus_AmA     CRVGVQETATPKVVDQ...ITGS...RSGT...NQLSTLVVADIKTGTI...DEIAKFKNV

                                     320     330     340     350     360
C.albicans_YER152C YKVERVAVLKESIAKYIPQDTQV...YGDGCVVWVVPSPANC.....FDVY
S.cerevisiae_YER152C YKVERVAVLKESIAKYIPQDTQV...YGDGCVVWVVPSPANC.....FDVY
T.thermophilus_LysN YKVERVAVLKESIAKYIPQDTQV...YGDGCVVWVVPSPANC.....FDVY
S.cerevisiae_ARO8  YKVERVAVLKESIAKYIPQDTQV...YGDGCVVWVVPSPANC.....FDVY
Human_hKATII      YKVERVAVLKESIAKYIPQDTQV...YGDGCVVWVVPSPANC.....FDVY
B.taurus_AmA     YKVERVAVLKESIAKYIPQDTQV...YGDGCVVWVVPSPANC.....FDVY

                                     370     380     390     400
C.albicans_YER152C AKLARKQNVVLAGGSHPEVITGDKR.....NWGQHCVRHSISYITTEBQQGIRI
S.cerevisiae_YER152C AKLARKQNVVLAGGSHPEVITGDKR.....NWGQHCVRHSISYITTEBQQGIRI
T.thermophilus_LysN FRRALLENVAVFVPGSPFANGGGE.....NWGQHCVRHSISYITTEBQQGIRI
S.cerevisiae_ARO8  YHKVVERGVVAVFVPGSPFANGGGE.....NWGQHCVRHSISYITTEBQQGIRI
Human_hKATII      EEKAVKMGVLLVPLGNAFYVDSAP.....SPYLRASFSASPEQMDVAFVQ
B.taurus_AmA     EEKAVKMGVLLVPLGNAFYVDSAP.....SPYLRASFSASPEQMDVAFVQ

                                     410
C.albicans_YER152C WGELE.....
S.cerevisiae_YER152C FGAVCKSHAITNNITM
T.thermophilus_LysN LGRALRGLLALV...
S.cerevisiae_ARO8  LGRALRGLLALV...
Human_hKATII      LAQLIKESL...
B.taurus_AmA     LAQLIKESL...

```

BIBLIOGRAFIA

- Al-Samarrai T. H., Jones W. T., Harvey D., Kirk C. A., Templton M. 2013. Effect of 4% glycerol and low aeration on result of expression in *Escherichia coli* of Cin3 and three *Venturia inaequalis* EST's recombinant proteins. *J Mol Biol* 3:1-9.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Aoki T., Yamamoto M., Hosseini-Mazinani S. M., Koshikawa N., Sugimoto K., Arisawa M. 1996. Antifungal azoxybacilin exhibits activity by inhibiting gene expression of sulfite reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 40:127-132.
- Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K., Baratin D., Csardi G., de Castro E., Duvaud S., Flegel V., Fortier A., Gasteiger E., Grosdidier A., Hernandez C., Ioannidis V., Kuznetsov D., Liechti R., Moretti S., Mostaguir K., Redaschi N., Rossier G., Xenarios I., Stockinger H. 2012. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40:597-603.
- Bain J. M., Stubberfield C., Gow N. A. 2001. Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett* 204:323-328.
- Baldwin R. L. 1986. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8069-8072.
- Basu T., Poddar R. K. 1994. Effect of ethanol on *Escherichia coli* cells. Enhancement of DNA synthesis due to ethanol treatment. *Folia Microbiol (Praha)* 39:3-6.
- Bedalov A., Hirao M., Posakony J., Nelson M., Simon J. A. 2003. NAD⁺-dependent deacetylase Hst1p controls biosynthesis and cellular NAD⁺ levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23:7044-7054.
- Bergfors T. 1999. Protein crystallization strategies, techniques and tips. A laboratory manual. *Internat Univ Line, California* 83-84.
- Berman J., Sudbery P. E. 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 12:918-930.
- Blakwell J. R., Horgan R. 1991. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* 295:10-12.
- Bondaryk M., Kurzątkowski W., Staniszevska M. 2013. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Post Derm Alergol* 30:293-301.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brock M., 2009. Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol* 12:371-376.
- Brunke S., Seider K., Almeida R. S., Heyken A., Fleck C. B., Brock M., Barz D., Rupp S., Hube B. 2010. *Candida glabrata* tryptophan-based pigment production via the Ehrlich pathway. *Mol Microbiol* 76:25-47.
- Brunke S., Seider K., Richter M. E., Bremer-Streck S., Ramachandra S., Kiehnopf M., Brock M., Hube B. 2014. Histidine degradation via an aminotransferase increases the nutritional flexibility of *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 13:758-765.
- Buchli R. D., Alberatu-Giani P., Malherbe C., Köhler C., Broger A., Cesura A. M. 1995. Cloning and functional expression of a soluble form of kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase from rat kidney. *J Biol Chem* 270:29330-29335.
- Bulfer S. L., Brunzelle J. S., Trievel R. C. 2013. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* Aro8, a putative α -aminoadipate aminotransferase. *Protein Sci* 10:1417-1424.
- Burnett G., Marcotte P., Walsh C. 1980. Mechanism-based inactivation of pig heart L-alanine transaminase by L-propargylglycine. Half-site reactivity. *J Biol Chem* 255:3487-3491.
- Butler G., Rasmussen M. D., Lin M. F., Santos M. S., Sakthikumar S., Munro C. A., Cuomo C. A. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 7247:657-662.
- Casqueiro J., Gutiérrez S., Banuelos O., Hijarrubia M. J., Martin J. F. 1999. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the lys2 gene leads to penicillin overproduction. *J Bacteriol* 181:1181-1188.

- Cernicka J., Subik J. 2006. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* 27:403–408.
- Chang A., Neofytos D., Horn D. 2008. Candidemia in the 21st Century. *Future Microbiol* 4:463-472.
- Chaskes S., Cammer M., Nieves E., Casadevall A. 2014. Pigment production on L-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* 9:e91901.
- Chaskes S., Frases S., Cammer M., Gerfen G., Casadevall A. 2008. Growth and pigment production on D-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 46:255–264.
- Chen H., Huang H., Li X., Tong S., Niu L., Teng M. 2009. Crystallization and preliminary X-Ray diffraction analysis of ARO9, an aromatic aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Pept Lett* 16:450–453.
- Chen L., Oughtred R., Berman H. M., Westbrook J. 2004. TargetDB: a target registration database for structural genomics projects. *Bioinformatics* 20: 2860–2862.
- Chen Y., Song J., Sui S., Wang D. N., 2003. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 32:221–231.
- Cheng S., Nguyen M. H., Zhang Z., Jia H., Handfield M., Clancy C. J. 2003. Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus. *Infect Immun* 71:6101–6103.
- Chhetri G., Kalita P., Tripathi T. 2015. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX* 2:385–391.
- Ciszewski M., Czekaj T. 2014. Grzybicze zakażenia szpitalne - narastające zagrożenie. *Nowa Med* 2:73-76.
- Claros M. G., Vincens P. 1996. Computational method to predict mitochondrial proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779-786.
- Cole M. F., Bowen W. H., Zhao X. J., Cihlar R. L. 1995. Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 126:177–180.
- Cui F. J., Li Y., Xu Z. H., Xu H. Y., Sun K., Tao W. Y. 2006. Optimization of the medium composition for production of mycelia biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresour Technol* 97:1209–1216.
- Davis B. D. 1952. Biosynthetic interrelations of lysine, diaminoipimelic acid and threonine in mutant of *Escherichia coli*. *Nature* 169:534-536.
- Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. 1970. Data for biochemical research. *University Press, Oxford*.
- Dereeper A., Audic S., Claverie J. M., Blanc G. 2010. BLAST-EXPLORER helps you building data sets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol* 10:8.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J. F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J. M., Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:465-469.
- Deshmukh D. R., Mungre S. M. 1989. Purification and properties of 2-amino adipate : 2-oxoglutarate aminotransferase from bovine kidney. *Biochem J* 261:761-768.
- Dombek K. M., Ingram L. O. 1984. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* 157:233–239.
- Dršata J., Boušová I., Maloň P. 2005. Determination of quality of pyridoxal-5'-phosphate enzyme preparations by spectroscopic methods. *J Pharm Biomed Anal* 37:1173–1177.
- Dynowska M., Ejdys E., Kisicka I. 2004. Susceptibility to antifungal agents of yeastlike fungi and yeasts isolated from people with multifocal infections. *Mikol Lek* 11:15–19.
- Dzierżanowska D., Dąbkowska M., Garczewska B. 2003. Patomechanizm i obraz kliniczny zarażeń grzybiczych. *Grzybice narządowe. Med Prakt* 7-12.
- Eshkol N., Sendovski M., Bahalul M., Katz-Ezov T., Kashi Y., Fishman A. 2009. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J Appl Microbiol* 106:534-542.
- Espinel-Ingroff A. 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 25:101–106.

- Etschmann M. M., Sell D., Schrader J. 2005. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng* 92: 624-634.
- Etschmann M., Bluemke W., Sell D., Schrader J. 2002. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:1-8.
- Fanning S., Mitchell A. 2012. P. Fungal biofilms. *PLoS Pathog* 8:e1002585.
- Fazius F., Zaehle C., Brock M. 2013. Lysine biosynthesis in microbes: relevance as drug target and prospects for β -lactam antibiotics production. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3763–72.
- Finkel J. S., Mitchell A. P. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 9:109-18.
- Fonzi W. A., Irwin M.Y. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134:717–728.
- Gabriel I., Kur K., Laforce-nesbitt S. S., Pulickal A. S., Bliss J. M. 2014. Phenotypic consequences of *LYS4* gene disruption in *Candida albicans*. *Yeast* 8:299–308.
- Gabriel I., Vetter N. D., Palmer D. R. J., Milewska M. J., Wojciechowski M., Milewski S. 2013. Homoisocitrate dehydrogenase from *Candida albicans*: properties, inhibition, and targeting by an antifungal pro-drug. *FEMS Yeast Res* 13:143–155.
- Galloway C. A., Sowden M. P., Smith H. C. 2003. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques* 34:524–530.
- Garczewska B., Kamińska W., Dzierzanowska D. 2008. Phenotype and genotype characterization of *Candida albicans* strains isolated from patients hospitalized at the Children's Memorial Health Institute. *Med Dośw Mikrobiol* 60:231–241.
- Garrad R. C., Schmidt T. M., Bhattacharjee J. K. 1994 Molecular and functional analysis of the *LYS1* gene of *Candida albicans*. *Infect Immun* 62:5027-5031.
- Goh D. L., Patel A., Thomas G. H., Salomons G. S., Schor D. S., Jakobs C., Geraghty M. T. 2002. Characterization of the human gene encoding alpha-amino adipate aminotransferase (AADAT). *Mol Genet Metab* 76:172–80.
- Goldman G. H., da Silva Ferreira M. E., dos Reis Marques E., Savoldi M., Perlin D., Park S., Godoy Martinez P. C., Goldman M. H., Colombo A. L. 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50:25–32.
- Gottesman S. 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 30:465–506.
- Granner D. K., Tomkins G.M. 1970. Tyrosine aminotransferase (rat liver). *Methods Enzymol* 17: 633 – 637.
- Grodberg J., Dunn J.J. 1988. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170:1245–1253.
- Gualco L., Debbia E. A., Bandettini R. Pescetto L., Cavallero A., Ossi M. C., Schito A. M., Marchese A. 2007. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *Int J Antimicrob Agents* 29:179–184.
- Guo S., Bhattacharjee J. K. 2003. Molecular characterization of the *Candida albicans* *LYS5* gene and site-directed mutational analysis of the PPTase (Lys5p) domains for lysine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 224:261-267.
- Guo S., Bhattacharjee J. K. 2006. Novel lysine biosynthetic gene sequences (*LYS1* and *LYS5*) used as PCR targets for the detection of the pathogenic *Candida* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:416-420.
- Guo S., Garrad R. C., Bhattacharjee J. K. 2006. Functional analysis through site-directed mutations and phylogeny of the *Candida albicans* *LYS1*-encoded saccharopine dehydrogenase. *Mol Genet Genomics* 275:74–80.
- Han Q., Cai T., Tagle D. A., Robinson H., Li J. 2008a. Substrate specificity and structure of human amino adipate aminotransferase/kynurenine aminotransferase II. *Biosci Rep* 28:205–215.
- Han Q., Li J., Li J.. 2004. pH dependence, substrate specificity and inhibition of human kynurenine aminotransferase I. *Eur J Biochem* 271:4804–4814.
- Han Q., Robinson H., Li J. 2008b. Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II. *J Biol Chem* 283:3567–3573.

- Harris H. E., Bayley P. M. 1975. The binding of 8-anilino-naphthalene-1-sulphonate to cytoplasmic aspartate aminotransferase from pig heart. *Biochem J* 145: 125–128.
- Hayashi H., Inoue K., Nagata T., Kuramitsu S., Kagamiyama H. 1993. *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase: characterization and comparison with aspartate aminotransferase. *Biochemistry* 45:12229–12239.
- Hayashi H., Mizuguchi H., Kagamiyama H. 1998. The imine-pyridine torsion of the pyridoxal 5'-phosphate Schiff base of aspartate aminotransferase lowers its pKa in the unliganded enzyme and is crucial for the successive increase in the pKa during catalysis. *Biochemistry* 43:15076-15085.
- Hayashi H., Mizuguchi H., Miyahara I., Nakajima Y., Hirotsu K., Kagamiyama H. 2003. Conformational change in aspartate aminotransferase on substrate binding induces strain in the catalytic group and enhances catalysis. *J Biol Chem* 278:9481-9488.
- Hayashi M. N., Hayashi M. 1985. Cloned DNA sequences that determine mRNA stability of bacteriophage phi X174 in vivo are functional. *Nucleic Acids Res* 13:5937-5948.
- Hazelwood L. A., Daran J. M., van Maris A. J. A., Pronk J. T., Dickinson, J. R. 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74:2259–2266.
- Hébert A., Casaregola S., Beckerich, J.-M. 2011. Biodiversity in sulfur metabolism in hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* 11:366–378.
- Hennig M., Grimm B., Contestabile R., John R. A., Jansonius J. N. 1997. Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an alpha2-dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4866–4871.
- Horbach R., Graf A., Weihmann F., Antelo L., Mathea S., Liermann J. C., Opatz T., Thines E., Aguirre J., Deising H. B. 2009. Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity. *Plant Cell* 21:1–18.
- Hua D., Xu P. 2011. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnol Adv* 29:654-660.
- Ingram L. O. 1986. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends Biotechnol* 4:40–44.
- Ingram L. O., Buttke T. M. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Adv Microb Physiol* 25:253–300.
- Iraqi I., Vissers S., Cartiaux M., Urrestarazu A. 1998. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet* 257:238–248.
- Jacobsen I. D., Wilson D., Wächtler B., Brunke S., Naglik J. R., Hube B. 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:85- 93.
- Jafari-nodoushan A. A., Kazemi A., Mirzaii F., Dehghani M. 2008. Fluconazole susceptibility profile of *Candida* isolates recovered from patients specimens admitted to Yazd Central Laboratory. *Iran J Pharm Res* 7:69–75.
- Jäger J., Moser M., Sauder U., Jansonius J. N. 1994. Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms. *J Mol Biol* 239:285-305.
- Jhamb K., Sahoo D. K. 2012. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresour Technol* 123:135-143.
- Jones P., Binns D., Chang H.-Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A. F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S.-Y., Lopez R., Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236-1240.
- Kallen R. G., Korpela T., Martell A. E., Matsushima Y., Metzler C. M., Metzler D. E., Morozov Y. V., Ralston I. M., Savin F. A., Torchinsky Y. M., Ueno H. 1985. Transaminase (Christen P., Metzler D., Eds.) Chapter 2, *Wiley*
- Kamai Y., Maebashi K., Kudoh M., Makimura K., Naka W., Uchida K., Yamaguchi H. 2004. Characterization of mechanisms of fluconazole resistance in a *Candida albicans* isolate from a Japanese patient with chronic mucocutaneous candidiasis. *Microbiol Immunol* 48: 937–943.
- Karsten W. E., Reyes Z. L., Bobyk K. D., Cook P. F., Chooback L. 2011. Mechanism of the aromatic aminotransferase encoded by the Aro8 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 516:67–74.

- King R. D., Rowland J., Oliver S. G., Young M., Aubrey W., Byrne E., Liakata M., Markham M., Pir P., Soldatova L. N., Sparkes A, Whelan K. E., Clare A. 2009. The automation of science. *Science (New York, N. Y.)* 5923:85–89.
- Kingsbury J. M., Yang Z., Ganous T. M., Cox G. M., McCusker J. H. 2004. Novel chimeric spermidine synthase-saccharopine dehydrogenase gene (SPE3-LYS9) in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 3:752–763.
- Kirsch D. R., Whitney R. R. 1991. Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* 59:3297–3300.
- Kowanko I. C., Ferrante A., Harvey D. P., Carman K. L. 1991. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation. *Clin Exp Immunol* 83:225–230.
- Kradolfer P., Niederberger P., Htitter R. 1982. Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch Microbiol* 133:242–248.
- Krajewska-Kułał E., Lewko J., Rolka H., Łukaszuk C., Karczewski J., Niczyporuk W., Zachowicz A. 2000. Grzybicze zakażenia szpitalne - narastający problem. *Mikol Lek* 7:159-163.
- Krämer H. J., Podobinska M., Bartsch A., Battmann A., Thoma W., Bernd A., Kummer W., Irlinger B., Steglich W., Mayser P. 2005. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* 6:860–865.
- Krysiak L. 2011. Stop zakażeniom szpitalnym. *Gazeta Lek* 248: 42-43.
- Kumamoto C. A., Vines M. D. 2005. Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7:1546-1554.
- Kur K., Gabriel I., Morschhäuser J., Barchiesi F., Spreghini E., Milewski S. 2010. Disruption of homocitrate synthase genes in *Candida albicans* affects growth but not virulence. *Mycopathologia* 170:397–402.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Large P. 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2:1–34.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lay J., Henry L. K., Clifford J., Koltin Y., Bulawa C. E., Becker J. M. 1998. Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* 66:5301-5306.
- Li F., Wu L., Cao B., Hang Y., Li X., Liu Y. 2013. Surveillance of the prevalence, antibiotic susceptibility, and genotyping characterization of invasive candidiasis in a teaching hospital in China between 2006 to 2011. *BMC Infect Dis* 13:353.
- Li Y. F., Bao W. G. 2007. Why do some yeast species require niacin for growth? Different modes of NAD⁺ synthesis. *FEMS Yeast Res* 7:657–664.
- Liebmann B., Muhleisen T., Muller M., Hecht M., Weidner G., Braun A., Brock M., Brakhage A. 2004. Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. *Arch Microbiol* 181:378–383.
- Lo H. J., Köhler J. R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G. R. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90:939-49.
- Machowinski A., Kramer H. J., Hort W., Mayser P. 2006. Pityriacitrin – a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* 49:388–392.
- Madurawe R. D., Chase T. E., Tsao E. I., Bentley W. E. 2000. Recombinant lipoprotein antigen against Lyme Disease expressed in *E. coli*: fermentor operating strategies for improved yield. *Biotechnol Prog* 16:571–576.
- Makhatadze G. I., Privalov P. L. 1995. Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem* 47:307–425.
- Maleszka R., Adamski Z. 2001. Leki przeciwgrzybicze w codziennej praktyce lekarskiej. *Przew Lek* 3:48-56.

- Marković-Housley Z., Schirmer T., Hohenester E., Khomutov A. R., Khomutov R. M., Karpeisky M. Y., Sandmeier E., Christen P., Jansonius J. N. 1996. Crystal structures and solution studies of oxime adducts of mitochondrial aspartate aminotransferase. *Eur J Biochem* 236:1025–1032.
- Matsuda M., Ogur M. 1969. Enzymatic and physiological properties transaminase of the yeast. *J Biol Chem* 244:5153–5158.
- Matthews R. C. 1994. Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiology* 140:1505-1511.
- Mawal M. R., Mukhopadhyay A., Deshmukh D. R. 1991 Purification and properties of kynurenine aminotransferase from rat kidney. *Biochem J* 279:595-599.
- Mayser P., Schafer U., Kramer H. J., Irlinger B., Steglich W. 2002. Pityriacitrin – an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 294:131–134.
- Mayser P., Wenzel M., Kramer H. J., Kindler B. L., Spiteller P., Haase G. 2007. Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med Mycol* 45:519–524.
- Mayser P., Wille G., Imkampe A., Thoma W., Arnold N., Monsees T. 1998. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41:265–271.
- McManus B. A., Coleman D. C. 2013. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol* 21:166-178.
- McPherson A. 1999. Crystallization of biological macromolecules. *Cold Spring Harbor Laboratory New York* 31-331.
- Mehta P. K., Christen P. 1993. Homology of pyridoxal-5'-phosphate-dependent aminotransferases with the COBC (cobalamin synthesis), NIFS (nitrogen fixation), PABC (P-aminobenzoate synthesis) and MALY (abolishing endogenous induction of the maltose system) gene products. *Eur J Biochem* 211:373– 376.
- Mei J., Min H., Lü Z. 2009. Enhanced biotransformation of l-phenylalanine to 2-phenylethanol using an in situ product adsorption technique. *Process Biochem* 44:886-890.
- Milewska M. J., Prokop M., Gabriel I., Wojciechowski M., Milewski S. 2012. Antifungal activity of homoaconitate and homoisocitrate analogs. *Molecules* 17:14022–14036.
- Mirzadeh K., Martínez V., Toddo S., Guntur S., Herrgård M. J., Elofsson A., Nørholm M. H. H., Daniel O. 2015. Enhanced protein production in *Escherichia coli* by optimization of cloning scars at the vector–coding sequence junction daley. *ACS Synthetic Biology* 18:959-965.
- Mitchell H. K., Houlahan M. B. 1948. An intermediate in the biosynthesis of lysine in *Neurospora*. *J Biol Chem* 174:883-887.
- Miyazaki T., Miyazaki J., Yamane H., Nishiyama M. 2004. α -Amino adipate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *Microbiology* 150:2327–2334.
- Mondello F., De Bernardis F., Girolamo A., Salvatore G., Cassone A. 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azolesusceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 51:1223–1229.
- Nakai T., Okada K., Akutsu S., Miyahara I., Kawaguchi S., Kato R., Kuramitsu S., Hirotsu K. 1999. *Thermus thermophilus* HB8 aspartate aminotransferase and its complex with maleate. *Biochemistry* 38:2413-2424.
- Nakatani Y., Fujioka M., Higashino K. 1970. α -Amino adipate aminotransferase of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 198:219–228.
- Nathan C. F. 1989. Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* 73:301-306.
- Nawrot U., Nowicka J., Juszczak K., Gusin B. 2005. Susceptibility to antifungal agents of *Candida species* isolated from pediatric and adult patients with haematological diseases. *Mycoses* 48:385–390.
- Newbury S. F., Smith N. H., Robinson E. C., Hiles I. D., Higgins C. F. 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* 48:297-310.
- Nishida H., Nishiyama M. 2000. What is characteristic of fungal lysine synthesis through the α -amino adipate pathway? *J Mol Evol* 51:299 –302.
- Okamoto A., Nakai Y., Hayashi H., Hirotsu K., Kagamiyama H. 1998. Crystal structures of *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a substrate recognition site constructed by rearrangement of hydrogen bond network. *J Mol Biol* 280:443-461.

- Ou J., Wang L., Ding X., Du J., Zhang Y., Chen H. 2004. Stationary phase protein over production is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 314:174–180.
- Ouchi T., Tomita T., Miyagawa T., Kuzuyama T., Nishiyama M. 2009. Dual roles of a conserved pair, Arg23 and Ser20, in recognition of multiple substrates in α -amino adipate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Biochem Biophys Res Commun* 388:21–27.
- Palmer D. R., Balogh H., Ma G., Zhou X., Marko M., Kaminskyj S. G. 2004. Synthesis and antifungal properties of compounds which target the α -amino adipate pathway. *Pharmazie* 59:93–98.
- Panozzo C., Nawara M., Suski C., Kucharczyka R., Skoneczny M., Becam A. M., Rytka J., Herbert C. J. 2002. Aerobic and anaerobic NAD⁺ metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 517:97–102.
- Papon N., Courdavault V., Clastre M., Bennett R. J. 2013. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog* 9:e1003550.
- Pappas P. G., Kauffman C. A., Andes D., Clancy C. J., Marr K. A., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A. C., Schuster M. G., Vazquez J. A., Walsh T. J., Zaoutis T. E., Sobel J. D. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:503–535.
- Passera E., Campanini B., Rossi F., Casazza V., Rizzi M., Pellicciari R., Mozzarelli A. 2011. Human kynurenine aminotransferase II - reactivity with substrates and inhibitors. *FEBS J* 278:1882–1900.
- Passowicz-Muszyńska E., Jankowska R., Weryńska B. 2007. Nowe leki przeciwgrzybicze stosowane w terapii grzybic głębokich. *Mikol Pol* 14:137–141.
- Patrick D. S., Stewart P. F., Baldock M. 1999. Practical experimental design techniques for automatic and manual protein crystallization. *J Cryst Growth* 196: 665–673.
- Perron-Savard P., De Crescenzo G., Moual H. 2005. Dimerization and DNA binding of the *Salmonella enterica* PhoP response regulator are phosphorylation independent. *Microbiology* 151:3979–3987.
- Pfaller M. A., Diekema D. J., Gibbs D. L., Newell V. A., Ellis D., Tullio V., Rodloff A., Fu W., Ling T. A. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 48:1366–1377.
- Pierce C. G., Uppuluri P., Tristan A. R., Wormley F. L. Jr., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J. L. 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 3:1494–1500.
- Pirkov I., Norbeck J., Gustafsson L., Albers E., 2008. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J* 275:4111–4120.
- Preuss J., Hort W., Lang S., Netsch A., Rahlfs S., Lochnit G., Jortzik E., Becker K., Mayser P. A. 2013. Characterization of tryptophan aminotransferase 1 of *Malassezia furfur*, the key enzyme in the production of indolic compounds by *M. furfur*. *Exp Dermatol* 22:736–741.
- Przyjałkowski W. 2006. Zakażenia grzybicze ośrodkowego układu nerwowego. (w) Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia, red. Dzierżanowska D. *α -medica Press Bielsko Biała* 154–165.
- Pusey M. L., Gernert K. 1988. A method for rapid liquid-solid phase solubility measurements using the protein lysozyme. *J Cryst Growth* 88:419–424
- Reuss O., Vik A., Kolter R., Morschhäuser J. 2004. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341:119–127.
- Ries-Kautt M., Ducruix A. 1992. Phase diagrams w crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. *Oxford Univ. Press, London/New York* 200–225.
- Robbins N., Uppuluri P., Nett J., Rajendran R., Ramage G., Lopez-Ribot J. L., Andes D., Cowen L. E. 2011. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog*. 7:e1002257.
- Robert X., Gouet P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new END script server. *Nucleic Acids Res* 42:320–324.
- Romagnoli G., Knijnenburg T., Liti G., Louis E. J., Pronk J. T., Daran J M. 2015. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 gene, encoding an aromatic amino acid transaminase, enhances phenylethanol production from glucose. *Yeast* 28:29–45.
- Rosano G. L., Ceccarelli E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172.

- Rossi F., Garavaglia S., Montalbano V., Walsh M. A., Rizzi M. 2008a. Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II, a drug target for the treatment of schizophrenia. *J Biol Chem* 283:3559–3566.
- Rossi F., Schwarcz R., Rizzi M. 2008b. Curiosity to kill the KAT (kynurenine aminotransferase): structural insights into brain kynurenic acid synthesis. *Curr Opin Struct Biol* 18:748–755.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 grudnia 2011 r. w sprawie listy czynników alarmowych, rejestrów zakażeń szpitalnych i czynników alarmowych oraz raportów o bieżącej sytuacji epidemiologicznej szpitala. Dz. U. 2011 nr 294 poz. 1741.
- Rząd K., Gabriel I. 2015. Characterization of two aminotransferases from *Candida albicans*. *Acta Biochim Pol* 62:903–912.
- Sambrook J. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *ColdSpring Harbor Laboratory Press NY*.
- Santos M. A., Tuite M. F. 1995. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23:1481–1486.
- Sasse C., Schillig R., Dierolf F., Weyler M., Schneider S., Mogavero S., Rogers D., Morschhäuser J. 2011. The transcription factor Ndt80 does not contribute to Mrr1⁺, Tac1⁺, and Upc2⁺ mediated fluconazole resistance in *Candida albicans*. *PLoS ONE* 9:e25623.
- Saville S. P., Lazzell A. L., Monteagudo C., Lopez-Ribot J. L. 2003. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2:1053-1060.
- Schein C., Noteborn M. 1988. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat Biotechnol* 6:291-294.
- Schellman J. A. 1997. Temperature, stability and the hydrophobic interaction. *Biophys J* 73:2960–2964.
- Schöbel F., Jacobsen I. D., Brock M. 2010. Evaluation of lysine biosynthesis as an antifungal drug target: biochemical characterization of *Aspergillus fumigatus* homocitrate synthase and virulence studies. *Eukaryot Cell* 9:878–893.
- Schoondermark-Stolk S. A., Jansen M., Veurink J. H., Verkleij A. J., Verrips C. T., Euverink G.-J. W., Boonstra J., Dijkhuizen L. 2006. Rapid identification of target genes for 3-methyl-1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:237–246.
- Seong K., Hou Z., Tracy M., Kistler H. C., Xu J.-R. 2005. Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the wheat scab fungus *Fusarium Graminearum*. *Phytopathology* 95:744–750.
- Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 189:8746–8749.
- Shen L., Nishimura Y., Matsuda F., Ishii J., Kondo A. 2016. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. *J Biosci Bioeng* 122:34-39.
- Shepherd M. G. 1985. Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect Immun* 50:541-544.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J., Higgins D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
- Sivaraman S., Kirsch J. F. 2006. The narrow substrate specificity of human tyrosine aminotransferase—the enzyme deficient in tyrosinemia type II. *FEBS J* 273:1920–1929.
- Skrodenienė E., Dambrauskienė A., Vitkauskienė A. 2006. Susceptibility of yeasts to antifungal agents in Kaunas University of Medicine Hospital. *Medicina (Kaunas)* 42:294–299.
- Skrzypek M. S., Binkley J., Binkley G., Miyasato S. R., Simison M., Sherlock G. 2011. *Candida* Genome Database <http://www.candidagenome.org/>
- Slabinski L., Jaroszewski L., Rodrigues A. P. C., Rychlewski L., Wilson I. A., Lesley S. A., Godzik A. 2007a. The challenge of protein structure determination—lessons from structural genomics. *Protein Sci* 16:2472-2482.
- Slabinski L., Jaroszewski L., Rychlewski L., Wilson I. A., Lesley S. A., Godzik A. 2007b. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* 24:3403-3405.
- Smith D. L., Almo S. C., Toney M. D., Ringe D. 1989. 2.8 angstrom resolution crystal structure of an active-site mutant of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28:8161–8167.

- Staab J. F., Sundstrom P. 2003. *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol* 11:69–73.
- Stewart P. D. S., Baldock P. F. M. 1999. Practical experimental design techniques for automatic and manual protein crystallization. *J Cryst Growth* 196: 665–673.
- Stradomska T. J. 2006. Wykrywanie metabolitów w diagnostyce grzybic układowych. (w) Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia, red. Dzierżanowski D. *α-medica Press Bielsko-Biala* 71–78.
- Studier F. W. 2005. Protein production by auto induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41:207–234.
- Studier F. W. 2014. Stable expression clones and autoinduction for protein production in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 1091:17–32.
- Studier F. W., Moffatt B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113–130.
- Sung M. H., Tanizawa K., Tanaka H., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Soda K. 1990. Purification and characterization of thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus species*. *J Bacteriol* 172:1345-1351.
- Tabor S., Richardson C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1074-1078.
- Tang C. M., Smith J. M., Arst H. N., Holden D. W. 1994. Virulence studies of *Aspergillus nidulans* mutants requiring lysine or p-aminobenzoic acid in invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 62:5255–5260.
- Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523–533.
- Tobes C., Mason M. 1977. α -Amino adipate aminotransferase and kynurenine aminotransferase. Purification, characterization, and further evidence for identity. *J Biol Chem* 252:4591- 4599.
- Tomita T., Miyagawa T., Miyazaki T., Fushinobu S., Kuzuyama T., Nishiyama M. 2009. Mechanism for multiple-substrates recognition of α -amino adipate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Proteins* 75:348-359.
- Toney M. D., Kirsch J. F. 1993. Lysine 258 in aspartate aminotransferase: enforcer of the Circe effect for amino acid substrates and general-base catalyst for the 1,3-prototropic shift. *Biochemistry* 32:1471–1479.
- Tsunoda Y., Sakai N., Kikuchi K., Katoh S., Akagi K., Miura-Ohnum J., Tashiro Y., Murata K., Shibuya N., Katoh E. 2005. Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 42:268-277.
- Umemura I., Yanagiya K., Komatsubara S., Sato T., Tosa T. 1994. Purification and some properties of alanine aminotransferase from *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:283–287.
- Uden G., Becker S., Bongaerts J., Holighaus G., Schirawski J., Six S. 1995. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 164:81–90.
- Urrestarazu A., Vissers S., Iraquiel, Grenson M. 1998. Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol Gen Genet* 257:230–237.
- Vashishtha A. K., West A. H., Cook P. F. 2008. Overall kinetic mechanism of saccharopine dehydrogenase (l -glutamate forming) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 47:5417–5423.
- Vasina J. A., Baneyx F. 1997. Expression of aggregation – prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. *Protein Expr Purif* 9:211–218.
- Vasquez J. R., Evin L. B., Higaki J. N., Craik C. S. 1989. An expression system for trypsin. *J Cell Biochem* 39: 265-276.
- Velasco E., Bigni R. 2008. A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:1071-1078.
- Vera A., Gonzalez-Montalban N., Aris A., Villaverde A. 2007. The conformational quality of insoluble recombinant protein is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng* 96:1101–1106.
- Vogel H. J. 1960. Two modes of lysine synthesis among lower fungi: evolutionary significance. *Biochim Biophys Acta* 41:172-174.

- Vogel H. J. 1965. Lysine biosynthesis and evolution. (w) Handbook of Evolving Genes and Proteins, red. Bryson V. *Academic Press New York* 25–40.
- Vuralhan Z., Luttk M. A., Tai S. L., Boer V. M., Morais M. A., Schipper D., Almering M. J., Kötter P., Dickinson J. R., Daran J. M. 2005. Physiological characterization of the *ARO10*-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 71:3276-3284.
- Vuralhan Z., Morais M. A., Tai S. L., Piper M. D., Pronk J. T. 2003. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 69:4534-4541.
- Wallach D. P. 1961. Studies on the GABA pathway II. The lack of effect of pyridoxal phosphate on GABA-KGA transaminase inhibition induced by aminooxyacetic acid. *Biochem Pharmacol* 8:328–331.
- Ward D. E., Kengen S. W. M., van der Oost J., de Vos W.M. 2000. Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine production. *J Bacteriol* 182:2559-2566.
- Warzocha K., Seferyńska I. 2006. Zakażenia grzybicze w hematologii. (w) Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia, red. Dzierżanowska D. *α-medica Press Bielsko Biała* 137–153.
- Wiencek J. M. 1999. New strategies for protein crystal growth. *Annu Rev Biomed Eng* 1:505–534
- Wlodawer A., Minor W., Dauter Z., Jaskolski M. 2008. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 275:1–21.
- Wogulis M., Chew E. R., Donohoue P. D., Wilson D. K. 2008. Identification of formyl kynurenine formamidase and kynurenine aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae* using crystallographic, bioinformatic and biochemical evidence. *Biochemistry* 47:1608–1621.
- Wong J., Ray W. J., Kornilova A. Y. 2011. Development of a microplate fluorescence assay for kynurenine aminotransferase. *Anal Biochem* 409:183 -188.
- Wu J., Filutowicz M. 1999. Hexahistidine (His6) – tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol* 46:591–599.
- Wybenga G. G., Crismaru C. G., Janssen D. B., Dijkstra B. W. 2012. Structural determinants of the β -selectivity of a bacterial aminotransferase. *J Biol Chem* 287:28495–28502.
- Xess I., Jain N., Hasan F., Mandal P., Banerjee U. 2007. Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. *Infection* 35:256-259.
- Xu H., Andi B., Qian J., West A. H., Cook P. F. 2006. The α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochem Biophys* 46:43–64.
- Yamaki H., Yamaguchi M., Imamura H., Suzuki H., Nishimura T., Saito H., Yamaguchi H. 1990. The mechanism of antifungal action of (S)-2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331: the inhibition of homoserine dehydrogenase in *S. cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 168:837-845.
- Yang Y. L., Ho Y. A., Cheng H. H., Ho M., Lo H. J. 2004. Susceptibilities of *Candida species* to amphotericin B and fluconazole: The emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:60–64.
- Zabriskie T. M., Jackson M. D. 2000. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat Prod Rep* 17:85–97.
- Zeppezauer M. 1971. Formation of large crystals. *Methods Enzymol* 22:253–266.
- Zheng X., Wang Y., Wang Y. 2004. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J* 23:1845-1856.

SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1 Schemat reakcji szlaku kwasu L- α -aminoadypinowego biosyntezy L-lizyny. Enzymy biorące udział w szlaku: 1 syntaza homocytrynianową EC 4.1.3.21, 2 homoakoniataza EC 4.2.1.36, 3 dehydrogenaza homoizocytrynianową EC 1.1.1.87, 4 α -aminotransferaza L- α -aminoadypinowa EC 2.6.1.39, 5 reduktaza α -aminoadypinowa EC 1.2.1.31, 6 reduktaza sacharopiny EC 1.5.1.10, 7 dehydrogenaza sacharopiny (tworząca L-lizynę) EC 1.5.1.7 [Rząd i Gabriel 2015].....	14
Rys. 2 Podsumowanie danych literaturowych dotyczących wpływu delecji genów kodujących enzymy szlaku L-AA na organizm gospodarza. [1] Gabriel i in. 2014, [2] Horbach i in. 2009, [3] Kingsbury i in. 2004, [4] Kur i in. 2010, [5] Liebmman i in. 2004; [6] Schöbel i in. 2010, [7] Tang i in. 1994.....	16
Rys. 3 Inhibitory enzymów szlaku L-AA wykazujące działanie przeciwgrzybowe [na podstawie Milewska i in. 2012 i Palmer i in. 2004].....	17
Rys. 4 Zestawienie danych literaturowych dotyczących możliwości wykorzystania enzymów szlaku L-AA w chemoterapii przeciwgrzybowej i diagnostyce. [1] Gabriel i in. 2013, [2] Guo i Bhattacharjee 2006, [3] Milewska i in. 2012.....	18
Rys. 5 Znaczenie kwasu L- α -aminoadypinowego w biosyntezie antybiotyków β -laktamowych [na podstawie Fazius i in. 2013].....	19
Rys. 6 Szlak Ehrlicha w <i>S. cerevisiae</i> , katabolizm fenyloalaniny do fenyloetanolu. ScAro8p- aromatyczna aminotransferaza I, α -aminotransferaza kwasu L- α -aminoadypinowego, ScAro9p – aromatyczna aminotransferaza II, ScAro10p- dekarboksylaza fenylopirogrotonianowa, ScSfa1p –dehydrogenaza formaldehydowe, ScAdh5p, ScAdh4p- dehydrogenazy etanolowe IV i V [na podstawie: Brunke i in. 2010; Hazelwood i in. 2008; Shen i in. 2016].....	20
Rys. 7 Szlak Ehrlicha u <i>C. glabrata</i> , katabolizm tryptofanu do tryptofanolu [na podstawie Brunke i in. 2010].....	21
Rys. 8 Reakcja katalizowana przez α -aminotransferazę kwasu L- α -aminoadypinowego.....	22
Rys. 9 Reakcja katalizowana przez kinureninową aminotransferazę [na podstawie King i in. 2009].....	23
Rys. 10 Struktura ScAro8p z <i>S. cerevisiae</i> . N-terminalny koniec, mała i duża domena podjednostki C zaznaczone odpowiednio na kolor ciemno niebieski, morski i fioletowy, natomiast z podjednostki D na kolor jasno pomarańczowy, ciemno pomarańczowy i żółty [Bulfer i in. 2013].....	25
Rys. 11 Związek PPA, analog substratu AmAA, połączenie kwasu L- α -aminoadypinowego z fosforanem pirydoksalu [na podstawie Han i in. 2008b].....	27
Rys. 12 Schemat mechanizmu reakcji katalizowanej przez AmAA zaproponowany na podstawie badań kinetycznych, spektralnych i wpływu pH na aktywność enzymu [na podstawie Karsten i in. 2011].....	28
Rys. 13 Schemat reakcji szlaku kwasu kinurenowego u <i>S. cerevisiae</i> . Enzymy biorące udział w szlaku: 1 ScBna2p 2,3 -dioksygenaza tryptofanowa, 2 ScBna7p formamidaza fomylokinureninowa, 3 ScBna3p aminotransferaza kinureninowa, 4 ScBna4p monooksydaza kinureninowa, 5 ScBna1p dioksygenaza kwasu 3- hydroksyantralinowego, 6 ScBna5p kinureninaza, 7 ScBna6p fosforybosylotransferaza chinolinowa, 8 ScNpt1p fosforybosylotransferaza nikotynowa [na podstawie Wogulis i in. 2008].....	30
Rys. 14 Podsumowanie danych literaturowych dotyczących wpływu delecji genów kodujących enzymy o aktywności AmAA na organizm gospodarza. [1] Brunke i in. 2010, [2] Miyazaki i in. 2004, [3] Panozzo i in. 2002, [4] Romagnoli i in. 2015, [5] Urrestarazu i in. 1998.....	32
Rys. 15 Krzywa wzorcowa $A_{595} = f(C_{BSA})$ dla albuminy wołowej, BSA.....	45
Rys. 16 Schemat klonowania produktu PCR do plazmidu pET101/D-TOPO®.....	47
Rys. 17 Schemat przeprowadzanej mutagenyzy ukierunkowanej.....	50
Rys. 18 Krzywa wzorcowa kolumny Superdex 200 10/300 do filtracji żelowej $\log MW = f(V_e V_{dek}^{-1})$	54
Rys. 19 Schemat reakcji katalizowanych przez aromatyczne aminotransferazy.....	56
Rys. 20 Schemat reakcji katalizowanej przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową. Biosynteza kwasu L- α -aminoadypinowego.....	57
Rys. 21 Schemat drugiego etapu reakcji oznaczania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę kwasu glutaminowego.....	58
Rys. 22 Schemat reakcji katalizowanych przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową. Degradacja kwasu L- α -aminoadypinowego.....	58

Rys. 23 Schemat reakcji katalizowanej przez kinureninową aminotransferazę. Biosynteza kwasu kinurenowego.....	58
Rys. 24 Schemat przygotowania kaset nokautującej według metody SAT1-flipper	61
Rys. 25 Schemat kasety nokautującej stosowanej do usuwania genu <i>ARO8</i> . upAro8 – sekwencja przed genem <i>ARO8</i> (ang. <i>upstream</i>), dARO8 – sekwencja za genem <i>ARO8</i> (ang. <i>downstream</i>), <i>FLP</i> - gen kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę, <i>SAT1</i> - gen oporności na nourseotrycynę, <i>FTR</i> miejsce rozpoznania dla rekombinazy <i>FLP</i>	63
Rys. 26 Schemat przedstawiający kolejne etapy postępowania prowadzące do usunięcia genu <i>ARO8</i> z genomu <i>C. albicans</i> z wykorzystaniem metody SAT1-flipper. A) Rekombinacja homologiczna prowadząca do wymiany genu <i>ARO8</i> na kasetę nokautującą; B) Indukcja ekspresji genu kodującego miejscowo-specyficzną rekombinazę <i>FLP</i> ; C) Fragment genomu szczepu CaARO8M2, mutant heterozygotyczny (<i>aro8Δ-1::FTR/ARO8-2</i>). W celu usunięcia genu na drugim allelu, należy powtórzyć etapy od A do C uzyskując zmutowany szczep CaARO8M4 (<i>aro8Δ -1::FRT/aro8Δ -2::FTR</i>).....	65
Rys. 27 Schemat przygotowania kaset do komplementacji genów według metody SAT1-flipper	67
Rys. 28 Schemat kasety do komplementacji genu <i>ARO8</i> . up- <i>ARO8-d</i> – sekwencja przed genem <i>ARO8</i> (ang. <i>upstream</i>), gen <i>ARO8</i> i sekwencja za genem <i>ARO8</i> (ang. <i>downstream</i>), dARO8 – sekwencja za genem <i>ARO8</i> (ang. <i>downstream</i>), <i>FLP</i> - gen kodujący miejscowo-specyficzną rekombinazę, <i>SAT1</i> - gen oporności na nourseotrycynę, <i>FTR</i> miejsce rozpoznania dla rekombinazy <i>FLP</i>	69
Rys. 29 Schemat przedstawiający kolejne etapy postępowania prowadzące do komplementacji genu <i>ARO8</i> w genomie zmutowanego szczepu <i>C. albicans Δaro8</i> z wykorzystaniem metody SAT1-flipper. A) Rekombinacja homologiczna prowadząca do fragmentów <i>upstream</i> i <i>downstream</i> genu <i>ARO8</i> na kasetę do komplementacji; B) Indukcja ekspresji genu kodującego miejscowo-specyficzną rekombinazę <i>FLP</i> ; C) Fragment genomu szczepu CaARO8K2 z wprowadzonym ponownie genem <i>ARO8</i> na jednym allelu, mutant heterozygotyczny (<i>ARO8-1/ aro8Δ-2::FTR</i>).....	70
Rys. 30 Porównanie sekwencji aminokwasowej (aa) białek CaAro9p (A) i CaBna3p (B) po translacji w komórkach <i>E. coli</i> i <i>C. albicans</i> . Uwidoczniono różnice w sekwencji aa białka CaAro9p gdzie w miejscu Ser198 i Ser374 znajduje się Leu198 i Leu374, natomiast w sekwencji aa białka CaBna3p w miejscu Ser371 znajduje się Leu371. Programy: Translate [Artimo i in. 2012], Clustal Omega [Sievers i in. 2011] oraz ESPrit [Robert i Gouet 2014].....	74
Rys. 31 Porównanie sekwencji aminokwasowej (aa) białek CaAro8p, CaAro9p, CaBna3p, CaYer152Cp z sekwencją aa białka ScAro8p. Zakonserwowane reszty zaznaczono jako białe litery na czerwonym tle, podobne reszty aminokwasowe zaznaczono na czerwono, czarną ramką zaznaczono różnicę w sekwencji aa CaBna31p i CaBna32p. Zastosowano programy ClustalW [Larkin i in. 2007] i ESPrit [Robert & Gouet 2014] do wygenerowania porównania	76
Rys. 32 Drzewo filogenetyczne badanych białek CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp i CaBna3p i AmAA z innych organizmów. Program: Phylogeny.fr [Dereeper i in. 2008; Dereeper i in. 2010]	79
Rys. 33 Schemat postępowania w przypadku usuwania genu metodą SAT1-FLP na przykładzie genu <i>ARO8</i>	81
Rys. 34 Przykład izolacji kasety nokautującej ARO8M1 z plazmidu pARO8M1 do usuwania genu <i>ARO8</i> . M marker BioLabs, 1 trawienie enzymami <i>Apal</i> i <i>SacI</i> plazmidu pARO8M1 w celu izolacji kasety nokautującej ARO8M1 (8617 pz). 2% żel agarozowy, rozdział przy 10 V cm ⁻¹ długości żelu, przez 60 min	83
Rys. 35 Etapy usuwania genu <i>ARO8</i> metodą SAT1-FLP.....	84
Rys. 36 Zestawienie szybkości wzrostu mutantów delecyjnych na podłożu minimalnym z dodatkiem różnego źródła azotu. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm, po 48 h inkubacji w 30°C. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB	87
Rys. 37 Kinetyka wzrostu szczepu dzikiego <i>C. albicans</i> SC5314 i skonstruowanych mutantów delecyjnych w pożywce YNB zawierającej L-Lys, L-His, L-Tyr jako źródło azotu (10 mM) lub siarczan amonu (SA) (10 mM). Gęstość optyczna zawiesin komórkowych była mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB.....	88
Rys. 38 Wzrost mutantów delecyjnych na stałym podłożu YNB z L-His, L-Lys, L-Tyr lub siarczanem amonu (10 mM) jako źródłami azotu. Płytki inkubowano 48 h w 30°C	89
Rys. 39 Wzrost szczepu <i>C. albicans</i> SC5314 i skonstruowanych mutantów na pożywce YNB zawierającej L-Lys (10 mM) lub kwas L-α-aminoadypinowy (5 mM) jako źródło azotu. Gęstość optyczna została mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm po 48 h inkubacji w 30°. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB	89

Rys. 40 Wzrost szczepu referencyjnego <i>C. albicans</i> SC5324 i szczepów zmutowanych na pożywce minimalnej YNB z różnym stężeniem źródła azotu L-His, L-Lys, L-Tyr. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm, po 48 h inkubacji w 30°C. SC5314 - szczep referencyjny, K- kontrola negatywna, pożywka YNB.....	90
Rys. 41 Wpływ kwasu aminoksyoctowego (AOA) na wzrost <i>C. albicans</i> SC5314 i analizowanych mutantów w pożywce minimalnej YNB z dodatkiem siarczanu amonu (SA) i w pożywce bogatej (YEPG). Przerzywane linie, brak dodatku AOA, linie ciągłe, dodatek 10 mM AOA. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm.....	91
Rys. 42 Wpływ kwasu aminoksyoctowego (AOA) na wzrost <i>C. albicans</i> SC5314 i analizowanych mutantów na pożywce minimalnej YNB z dodatkiem różnych aminokwasów jako źródło azotu. Przerzywane linie, brak dodatku AOA, linie ciągłe, dodatek 10 mM AOA. Gęstość optyczna mierzona spektrofotometrycznie przy 531 nm	92
Rys. 43 Wybrane wyniki obrazujące zmianę formy morfologicznej skonstruowanych mutantów. Podłoże stałe SLAD i YEPG + 10 % v/v płodowa surowica bydłęca (FBS), inkubacja 7 dni 30°C	94
Rys. 44 Optymalizacja nadprodukcji CaBna3p i CaBna3CHp (ok. 51 kDa) w komórkach <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS. M wzorzec masowy PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811, 1 (5) CaBna3p (CaBna3CHp), stężenie induktora IPTG 0,05 mM, gęstość optyczna komórek w chwili dodawania induktora do hodowli OD ₆₀₀ = 0,5, temperatura nadprodukcji 37°C, czas nadprodukcji 6 h , pożywka LB, 2 (6) CaBna3p (CaBna3CHp), stężenie induktora IPTG 0,05 mM, gęstość optyczna komórek w chwili dodawania induktora do hodowli OD ₆₀₀ = 0,5, temperatura nadprodukcji 30°C, czas nadprodukcji 18 h , pożywka LB, 3 (7) CaBna3p (CaBna3CHp), stężenie induktora IPTG 0,05 mM, gęstość optyczna komórek w chwili dodawania induktora do hodowli OD ₆₀₀ = 0,5, temperatura nadprodukcji 37°C, czas nadprodukcji 6 h , pożywka LB + 1% glukozy, 4 (8) CaBna3p (CaBna3CHp), temperatura nadprodukcji 30°C, czas nadprodukcji 18 h, pożywka autoindukcyjna. 10% żel poliakrylamidowy, 20 V cm ⁻¹ żelu.....	103
Rys. 45 Optymalizacja nadprodukcji białka. Podjęte działania (zaznaczone na zielono <input checked="" type="checkbox"/>) i zaproponowane kolejne rozwiązania. [1] Mirzadeh i in. 2015, [2] Tsunoda i in. 2005, [3] Hayashi i Hayashi 1985, [4] Newbury i in. 1987, [5] Vasquez i in. 1989, [6] Blakwell i Horgan 1991, [7] Chhetri i in. 2015.....	105
Rys. 46 Wyznaczanie masy cząsteczkowej zdenaturowanych białek CaAro8CHp, CaAro9CHp, CaYer152CHp na podstawie krzywej wzorcowej pasm białkowych wzorca masowego PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #SM1811	111
Rys. 47 Schemat mechanizmu reakcji katalizowanej przez α -aminotransferazę L- α -aminoadypinową [na podstawie Karsten i in. 2011]	113
Rys. 48 Analogi substratów A _{MAA} i potencjalne donory grupy aminowej.....	125
Rys. 49 Potencjalne inhibitory CaAro8p.....	126
Rys. 50 Analiza sekwencji aminokwasowej CaAro8p pod względem parametrów istotnych ze względu na zdolność do krystalizacji białka. PEŁTLE przewidziane na podstawie PSIPRED, HELISY przewidziane na podstawie PSIPRED, β -KARTKI przewidziane na podstawie PSIPRED, REGIONY NIEUPORZĄDKOWANE przewidziane na podstawie DISOPRED2, KŁĘBK I STATYSTYCZNE przewidziane na podstawie COILS, HELISY BŁONOWE przewidziane na podstawie TMHMM, PEPTYDY SYGNALNE przewidziane na podstawie SignalP. Program: XtalPred [Slabinski i in. 2007b]	129
Rys. 51 Przypisanie klasy krystalizacji na podstawie cech biochemicznych i biofizycznych białka CaAro8p. Program: XtalPred[Slabinski i in. 2007b].....	130
Rys. 52 Przypisanie klasy krystalizacji uwzględniając właściwości powierzchni makrocząsteczki białka CaAro8p. Program: XtalPred [Slabinski i in. 2007b].....	130
Rys. 53 Wskaźnik proporcji sukcesów do porażek krystalizacji białka z podziałem na klasy krystalizacji [Slabinski i in. 2007a]	131
Rys. 54 Analiza sekwencji aminokwasowej CaAro9p pod względem parametrów istotnych ze względu na zdolność do krystalizacji białka. PEŁTLE przewidziane na podstawie PSIPRED, HELISY przewidziane na podstawie PSIPRED, β -KARTKI przewidziane na podstawie PSIPRED, REGIONY NIEUPORZĄDKOWANE przewidziane na podstawie DISOPRED2, KŁĘBK I STATYSTYCZNE przewidziane na podstawie COILS, HELISY BŁONOWE przewidziane na podstawie TMHMM, PEPTYDY SYGNALNE przewidziane na podstawie SignalP. Program XtalPred [Slabinski i in. 2007b]	131
Rys. 55 Przypisanie klasy krystalizacji na podstawie cech biochemicznych i biofizycznych białka CaAro9p. Program XtalPred [Slabinski i in. 2007b].....	132
Rys. 56 Przypisanie klasy krystalizacji uwzględniając właściwości powierzchni makrocząsteczki białka CaAro9p. Program XtalPred [Slabinski i in. 2007b].....	133
Rys. 57 Schemat krystalizacji białka metodą kropli siedzącej	135

Rys. 58 Schemat krystalizacji białka metodą kropli wiszącej	135
Rys. 59. Kryształy CaAro8CHp, metoda kropli siedzącej 2,9 M malonian sodu pH 6	135
Rys. 60 Kryształy CaAro8CHp, metoda kropli siedzącej 0,2 M siarczan litu, 0,1 M HEPES pH 7,5, 25% w/v PEG 3350.....	135
Rys. 61 Rysunek obrazujący mapy gęstości elektronowej w cząsteczce białka obliczone na podstawie danych o różnej rozdzielczości [Włodawer i in. 2008]	136
Rys. 62 Kryształy CaAro8p, metoda kropli siedzącej, 4,5 mg mL ⁻¹ białka, 0,2 M chlorek magnezu, 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 25% w/v PEG 3350.....	136
Rys. 63 Kryształy CaAro9CHp, metoda kropli siedzącej, 9 mg mL ⁻¹ białka, 0,06 M chlorek magnezu, 0,06 M chlorek wapnia, 12,5% v/v MPD (2-metylo-2,4-pentanodiol), 12,5% PEG 1000, 12,5% w/v PEG 3350 A. 0,1 M imidazol-MES pH 6,5, B. 0,1 M HEPES-MOPS pH 7,5, C. 0,1 M Tris-BICINE, pH 8,5	137
Rys. 64 Struktury PLP i PLP związanego z L-Lys enzymu (LLP)	138
Rys. 65 Poziom wzrost szczepów delecyjnych $\Delta aro8$, $\Delta aro9$, $\Delta aro8 \Delta aro9$ i szczepu dzikiego <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>S. cerevisiae</i> na pożywce minimalnej YNB z różnym źródłem azotu. Opracowanie na podstawie wyników własnych oraz literatury [1, 2] Brunke i in. 2010, Brunke i in. 2014, [3, 4] Iraqui i in. 1998, Urrestarazu i in. 1998	140
Rys. 66 Sugerowany model roli CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp w metabolizmie L-Lys, L-His i aromatycznych aminokwasów	144
Rys. 67 Porównanie sekwencji aminokwasowej białek A) CaAro8p, B) CaAro9p, C) CaBna3p, D) CaYer152Cp z <i>C. albicans</i> z sekwencjami znanych α -aminotransferaz L- α -aminoadypinowch. Zakonserwowane reszty zaznaczono jako białe litery na czerwonym tle, podobne reszty aminokwasowe zaznaczono na czerwono, najbardziej istotne reszty biorące udział w wiązaniu PLP i substratów w hKATI1p i ScAro8p zaznaczono na czarno [Rossi i in. 2008; Han <i>et al.</i> , 2009; Bulfer i in. 2013]. Zastosowano programy ClustalW [Larkin i in. 2007]i ESPript [Robert & Gouet 2014] do wygenerowania porównania..	147

SPIS TABEL

Tab. 1 Zestawienie szeregu substratów wykorzystywanych przez białka o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej i aminotransferazy aromatycznej z różnych organizmów. [1] Kradolfer i in. 1982, [2] King i in. 2009, [3] Chen i in. 2009, [4] Matsuda i Ogur 1969, [5] Miyazaki i in. 2004, [6] Passera i in. 2011, [7] Wogulis i in 2008, [8] Han i in. 2008a, [9] Iraqui i in. 1998, [10] Karsten i in. 2011, [11] Brunke i in. 2010, [12] Urrestarazu i in. 1998, [13] Brunke i in. 2014	24
Tab. 2 Wykaz aparatury stosowanej w niniejszej pracy	33
Tab. 3 Wykaz wzorców masowych używanych w badaniach	33
Tab. 4 Wykaz pożywek i podłoży wykorzystywanych w badaniach. Przygotowane pożywki jałowiono w autoklawie (120 °C, 30 min, 1,5 atm.)	34
Tab. 5 Wykaz szczepów bakteryjnych i grzybowych wykorzystywanych w badaniach	34
Tab. 6 Plazmidy stosowane/skonstruowane podczas badań	35
Tab. 7 Oligonukleotydy stosowane w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie	37
Tab. 8 Enzymy restrykcyjne stosowane podczas badań	42
Tab. 9 Oprogramowanie stosowane podczas badań	42
Tab. 10 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia DNA. Czas trwania reakcji zależny od zastosowanego DNA	45
Tab. 11 Wykaz programów służących do analizy sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej badanych genów/białek	46
Tab. 12 Skład mieszaniny do amplifikacji badanych genów. Wykaz starterów stosowanych w amplifikacji	46
Tab. 13 Profil temperaturowo czasowy reakcji amplifikacji badanych genów	46
Tab. 14 Skład mieszaniny reakcyjnej klonowania produktu PCR do plazmidu pET101/D-TOPO®	47
Tab. 15 Skład mieszaniny reakcyjnej do mutagenyzy ukierunkowanej	48
Tab. 16 Profil temperaturowo-czasowy reakcji amplifikacji skonstruowanych plazmidów wprowadzającej mutacje punktowe	48
Tab. 17 Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia restrykcyjnego zmetylowanego plazmidu	49
Tab. 18 Mieszanina ligacyjna. Ligację przeprowadzono przez 12 h w 16°C	49
Tab. 19 Wykaz białek wykorzystywanych do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej kolumny Superdex 200 10/300 do filtracji żelowej	54
Tab. 20 Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczania aktywności aromatycznej aminotransferazy	56
Tab. 21 Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej w kierunku biosyntezy kwasu L- α -aminoadypinowego	57
Tab. 22 Skład mieszaniny reakcyjnej drugiego etapu reakcji oznaczania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Wykorzystanie dehydrogenazy kwasu glutaminowego do oznaczenia stężenia α -ketoglutaranu powstałego w pierwszym etapie	57
Tab. 23 Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczania aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej w kierunku rozkładu kwasu L- α -aminoadypinowego	58
Tab. 24 Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności kinureninowej aminotransferazy, w kierunku biosyntezy kwasu kinurenowego	59
Tab. 25 Skład mieszaniny reakcyjnej do oznaczenia wpływu związków potencjalnych inhibitorów na aktywności badanych enzymów	59
Tab. 26 Wykaz zakresu stężeń związków hamujących aktywność enzymów. Aminooksyoctan (AOA), cykloseryna (CS), jodek 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP), sulfincysteina (SC), kwas 3-nitropropionowy (NPA), 3-fosfonoalanina (AP-3), o-fosfo-L-seryna (OPS)	59
Tab. 27 Skład mieszaniny reakcyjnej amplifikacji regionów <i>upstream</i> i <i>downstream</i> badanych genów	62
Tab. 28 Profil temperaturowo czasowy reakcji amplifikacji <i>upstream</i> i <i>downstream</i> badanych genów	62
Tab. 29 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego substratów do konstrukcji kasety nokautującej badane geny	62
Tab. 30 Skład mieszaniny ligacyjnej do konstrukcji kasety nokautującej	63

Tab. 31 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego skonstruowanych plazmidów w celu izolacji kasety nokautującej badane geny	63
Tab. 32 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego genomowego DNA	65
Tab. 33 Skład mieszaniny reakcyjnej amplifikacji fragmentu DNA obejmującego gen wraz z regionami <i>upstream</i> i <i>downstream</i>	68
Tab. 34 Profil temperaturowo czasowy reakcji amplifikacji <i>upstream</i> i <i>downstream</i> badanych genów	68
Tab. 35 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego substratów do konstrukcji kasety do komplementacji	68
Tab. 36 Skład mieszaniny ligacyjnej do konstrukcji kasety do komplementacji	69
Tab. 37 Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia restrykcyjnego skonstruowanych plazmidów w celu izolacji do komplementacji	69
Tab. 38 Zestawienie teoretycznych danych uzyskanych na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych badanych białek. Programy: Translate i ProtParam [Artimo i in. 2012]	73
Tab. 39 Wykaz stopnia podobieństwa i identyczności pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi <i>CaAro8p</i> , <i>CaAro9p</i> , <i>CaYer152Cp</i> , <i>CaBna3p</i> a sekwencjami aa AmAA z <i>S. cerevisiae</i> i <i>Homo sapiens</i> (w przypadku ludzkiej AmAA porównanie dotyczy α -aminotransferazy L-kinureninowej/L- α -aminoadypinowej). Program: NCBI BLAST alignment [Altschul i in. 1990]	77
Tab. 40 Porównanie reszt aminokwasowych badanych enzymów z resztami tworzącymi centrum katalityczne białek o aktywności α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Program: Clustal Omega [Sievers i in. 2011]	77
Tab. 41 Zestawienie prawdopodobieństwa występowania mitochondrialnej sekwencji sygnałowej w sekwencjach aminokwasowych analizowanych białek. Program: MitoProt II [Claros i Vincens 1996]	79
Tab. 42 Konstrukcja plazmidu pARO8M1 zawierającego kasetę usuwającą gen <i>ARO8</i>	82
Tab. 43 Lista uzyskanych mutantów delecyjnych. Szczepy z indeksem M2 – mutanty heterozygotyczne, K2 -mutanty z komplementacją genu	85
Tab. 44 Schemat hybrydyzacji sond <i>upstream</i> i <i>downstream</i> do fragmentu DNA w okolicach <i>locus</i> genu <i>ARO8</i> , z zaznaczeniem diagnostycznych miejsc, rozpoznawanych przez enzymy <i>EcoRI</i> i <i>NdeI</i> . Wynik analizy Southern Blotting szczepów z usuniętym genem <i>ARO8</i> . SC - szczep referencyjny SC5314, M1 A szczep <i>aro8-1Δ::SAT1-FLP/ARO8-2</i> , M2 A szczep <i>aro8-1Δ::FRT/ARO8-2</i> , M3 A szczep <i>aro8-1Δ::FRT/aro8-2Δ::SAT1-FLP</i> , M4 A <i>aro8-1 Δ::FRT/aro8-2Δ::FTR</i> , szczep K1 A szczep <i>ARO8-1::SAT1-FLP/aro8-2Δ::FTR</i> , K2 A szczep <i>ARO8-1::FRT/aro8-2Δ::FTR</i> . Szczepy z indeksem B są nazywane analogicznie, manipulacja genetyczna dotyczy allelu 2	86
Tab. 45 Sekwencje aminokwasowe badanych białek. Na żółto zaznaczono domenę fuzyjną oligoHis, na czerwono aminokwasy kodowane przez trójki nukleotydów CTG poddanych mutagenzie (Ser198 i Ser374 w <i>CaAro9p</i> i <i>CaAro9CHp</i> oraz Ser371 w <i>CaBna3p</i> i <i>CaBna3CHp</i>)	96
Tab. 46 Analiza restrykcyjna skonstruowanych plazmidów ekspresyjnych. A. Mapy plazmidów ekspresyjnych pET101/D-TOPO+ <i>ARO8</i> , pET101/D-TOPO+ <i>ARO8CH</i> , pET101/D-TOPO+ <i>ARO9</i> , pET101/D-TOPO+ <i>ARO9CH</i> , pET101/D-TOPO+ <i>YER152C</i> , pET101/D-TOPO+ <i>YER152CH</i> , pET101/D-TOPO+ <i>BNA3</i> , pET101/D TOPO+ <i>BNA3CH</i> z zaznaczonymi miejscami cięcia restrykcyjnego, B. Symulacja żelu agarozowego uzyskanego po trawieniu restrykcyjnym plazmidów, C. Wynik analizy restrykcyjnej	98
Tab. 47 Analiza bioinformatyczna badanych genów pod kątem obecności rzadkich kodonów w <i>E. coli</i> . CAI to indeks adaptacji kodonu (Codon Adaptation Index). CAI > 0,8 oznacza, że gen posiada mało rzadkich kodonów, a jego ekspresja w <i>E. coli</i> jest oceniana jako dobra. Im niższa wartość CAI tym wyższe prawdopodobieństwo, że gen będzie słabo ekspresowany. Analiza wykonana za pomocą programu genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis	99
Tab. 48 Porównanie wydajności nadprodukcji białek rekombinantowych	101
Tab. 49 Immunodetekcja białek <i>CaAro8CHp</i> , <i>CaAro9CHp</i> , <i>CaYer152CHp</i> , <i>CaBna3CHp</i> w lizatach komórkowych za pomocą przeciwciał anty-HisTag	103
Tab. 50 Wynik oczyszczania białek rekombinantowych z domeną oligoHis z lizatu komórkowego <i>E. coli</i> . Analiza elektroforetyczna SDS-PAGE, 15% żel poliakrylamidowy, 20 V cm ⁻¹ żelu	106
Tab. 51 Analiza densytometryczna rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE ekstraktu bezkomórkowego komórek <i>E. coli</i> nadprodukcujących białka rekombinantowe <i>CaAro8CHp</i> , <i>CaAro9CHp</i> , <i>CaYer152CHp</i> . Program Totallab Quant i GelAnalyzer (Roz 3.1.7)	107
Tab. 52 Wynik oczyszczania białek rekombinantowych <i>CaAro8p</i> , <i>CaAro9p</i> i <i>CaYer152Cp</i> z lizatu komórkowego <i>E. coli</i> . Analiza elektroforetyczna SDS-PAGE, 15% żel poliakrylamidowy, 20 V cm ⁻¹ żelu 108	

Tab. 53 Analiza densytometryczna prób białkowych zawierających białka CaAro8p, CaAro9p, CaYer152Cp. Program Totallab Quant i GelAnalyzer (Roz 3.1.7).....	110
Tab. 54 Wyznaczone masy cząsteczkowe zdenaturowanych białek rekombinantowych.....	112
Tab. 55 Wyznaczenie masy cząsteczkowej natywnych białek rekombinantowych	112
Tab. 56 Wyznaczone masy cząsteczkowe natywnych białek rekombinantowych	113
Tab. 57 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 500 nm dla CaAro8CHp [1 mg mL ⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym o różnym pH w czasie 0 - 30 min	114
Tab. 58 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 550 nm dla CaAro9CHp [1 mg mL ⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym o różnym pH w czasie 0- 30 min	115
Tab. 59 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 550 nm dla CaAro8CHp i CaAro9CHp [po 1 mg mL ⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym i 100 mM buforze Tris-HCl o różnym pH w czasie 0- 60 min z dodatkiem [1,5 mM] kwasu L-glutaminowego, kwasu L- α -aminoadypinowego lub L-histydyny.....	116
Tab. 60 Widma absorpcyjne w zakresie 300 - 550 nm dla CaAro8CHp i CaAro9CHp [po 1 mg mL ⁻¹] z PLP [0,1 mM] w 100 mM buforze fosforanowym pH 7,5 w czasie 0- 60 min z dodatkiem 1,5 mM kwasu L- α -aminoadypinowego i 0,1 mM AOA.....	118
Tab. 61 Wyznaczanie parametrów kinetycznych względem substratów α -aminotransferazy L- α -aminoadypinowej. Przykładowe wykresy Lineweavera-Burka, zależności $V^{-1}=f(C_{\text{substrat}}^{-1})$. V- prędkość początkowa reakcji, C_{substrat} - stężenie substratu, α -KA - kwas α -ketoadypinowy, α -KG- kwas α -ketoglutazarowy, L-Glu - kwas L-glutaminowy, L-AA - kwas L- α -aminoadypinowy.....	120
Tab. 62 Parametry kinetyczne badanych białek z <i>C. albicans</i> . Akceptor grupy aminowej:10 mM kwas α -ketoglutazarowy. Uzyskane dane wyliczono z co najmniej trzech wykonywanych pomiarów.....	121
Tab. 63 Parametry kinetyczne badanych białek z <i>C. albicans</i> . Stężenie donora grupy aminowej: 5 mM. Uzyskane dane wyliczono z co najmniej trzech wykonywanych pomiarów.	121
Tab. 64 Porównanie szybkości katalizowanej reakcji enzymów CaAro8p, CaAro9p i CaYer152Cp w różnym pH	123
Tab. 65 Wpływ analogów substratów CaAro8p na aktywność enzymu w reakcji degradacji L-Phe. Do wyliczenia wartości IC ₅₀ użyto programu GraphPrism	124
Tab. 66 Zestawienie wartości IC ₅₀ dla badanych inhibitorów względem CaAro8p. Wpływ inhibitorów badany w reakcji degradacji L-Phe. Do wyliczenia wartości IC ₅₀ użyto programu GraphPrism.....	126
Tab. 67 Zestawienie parametrów K _i dla związku AOA względem CaAro8p i CaAro9p. Wpływ AOA badany w reakcji degradacji L-Phe. Do wyznaczenia parametrów K _i użyto programu GraphPrism.....	126
Tab. 68 Parametry krystalizacji białka CaAro8p wyliczone przez program XtalPred z zaznaczonym indywidualnym prawdopodobieństwem krystalizacji [Slabinski i in. 2007b]	129
Tab. 69 Parametry krystalizacji białka CaAro9p wyliczone przez program XtalPred z zaznaczonym indywidualnym prawdopodobieństwem krystalizacji [Slabinski i in. 2007b]	132
Tab. 70 Sprawdzenie efektywności oczyszczania białek rekombinantowych CaAro8p i CaAro9CHp z wykorzystaniem chromatografii rozmiarów wykluczających przed krystalizacją	134
Tab. 71 Wstępna charakterystyka uzyskanych kryształów białek rekombinantowych CaAro8p i CaAro9CHp	137

DOROBEK NAUKOWY

Artykuły w czasopismach z listy JCR:

1. Rząd K., Milewski S., Gabriel I. 2018. Versatility of putative aromatic aminotransferases from *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 110:26-37.
2. Rząd K., Gabriel I. 2015. Characterization of two aminotransferases from *Candida albicans*. *Acta Biochim Polon* 62:903-912.
3. Jastrzębowska K., Gabriel I. 2014. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids* 47:227-249.

Artykuły w materiałach pokonferencyjnych

1. Jastrzębowska K. 2014. Konstrukcja auksotroficznego względem L-Lys szczepu *C. albicans*. *Materiały Konferencyjne ISSN 2300-4436, Młodzi naukowcy dla polskiej nauki* 12 1:75-78.
2. Jastrzębowska K. 2014. Wstęp do krystalizacji białek. *Rozdział monografii ISSN 2300-4436 Nowe trendy w naukach przyrodniczych 5, Creative Science* 1:79-83.
3. Jastrzębowska K. 2013. α -Aminotransferaza kwasu L- α -aminoadypinowego z *Candida albicans* jako cel molekularny. *Materiały Konferencyjne ISBN 978-83-63058-31-9 Młodzi naukowcy dla polskiej nauki* 11 1:109-118.
4. Jastrzębowska K. 2013. Dehydrogenaza sacharopiny (NADP⁺, tworząca L-glutaminian) z *Candida albicans* jako cel molekularny. *Nowe trendy w naukach przyrodniczych 4, Creative Science* 2:74-83.

Doniesienia konferencyjne:

1. Rząd K., Gabriel I., Milewski S. Amino adipate aminotransferases in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Plakat, konferencja *Weigl Conference of Microbiology*, 07-10.07. 2015, Gdańsk.
2. Jastrzębowska K., Gabriel I., Milewski S. Konstrukcja auksotroficznego względem L-Lys szczepu *C. albicans*. Plakat, konferencja *Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki V*, 25.04.2014, Gdańsk.
3. Gabriel I., Jastrzębowska K., Milewski S. Enzymes of lysine biosynthesis pathway. Plakat, konferencja *Biocrystallography for the high-throughput era*, 01-05.07.2014, Białystok.
4. Jastrzębowska K., Gabriel I., Milewski S. AadAT jako cel molekularny dla potencjalnych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych. Plakat, konferencja *Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki 4*, 12-14.04.2013, Gdańsk.
5. Jastrzębowska K., Gabriel I., Milewski S. Preparation and characterization of the recombinant enzyme of the α -amino adipate pathway from *Candida albicans*. Wystąpienie, konferencja *Między Biotechnologią a Ochroną Środowiska*, 17-20.11.2011, Zielona Góra.

Staże zagraniczne

14.09-14.12.2014 oraz 15.07-15.10.2015 – dwa staże na Uniwersytecie w Würzburgu, finansowane w ramach projektu "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii"

Granty i stypendia:

Wykonawca - w ramach projektu OPUS-9 „Aromatyczne aminotransferazy z *Candida albicans* jako cele molekularne w chemoterapii przeciwgrzybowej” dr inż. I. Gabriel.

Współpraca z dr inż. I. Gabriel w ramach projektu POMOST/2010-2/4 "The unique fungal lysine biosynthesis enzymes: new targets for antifungal agents?"