POLITECHNIKA GDAŃSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

“Regulacja aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu z *Candida albicans* – badania metodami obliczeniowymi”

Autor rozprawy:

Aleksandra Miszkiel

Promotor:

prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski

Gdańsk, 2016

POLITECHNIKA GDAŃSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY

Imię i nazwisko autora rozprawy: Aleksandra Miszkiel
Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Regulacja aktywności syntazy glukozamino-6-fosforanu z *Candida albicans* – badania metodami obliczeniowymi

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Activity regulation of eukaryotic glucosamine-6-phosphate synthase from *Candida albicans* – computational study

Promotor	Drugi promotor
Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski	
Promotor pomocniczy	Kopromotor

Gdańsk, rok 2016

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Z całego serca dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do ukończenia niniejszej rozprawy, a w szczególności:

- *mojemu Promotorowi, prof. Milewskiemu i Opiekunowi, dr Wojciechowskiemu, za poświęcony czas, morze cierpliwość oraz bezcenne wskazówki*
- *pani Prodziekan Kot-Wasik za wyrozumiałość i za dodatkowe terminy złożenia manuskryptu*
- *wszystkim moim Bliskim za wsparcie, wiarę i dzielne znoszenie moich humorów, zwłaszcza na ostatnich etapach pisania.*

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Spis Treści

INDEKS SKRÓTÓW 1

STRESZCZENIE 3

I. WPROWADZENIE TEORETYCZNE 5

ZNACZENIE PROWADZONYCH BADAŃ 5

I.1 ENZYM SYNTAZA GLUKOZAMINO-6-FOSFORANU 9

I.1.1 Znaczenie biologiczne enzymu 11

I.1.1.1 Rola enzymu w organizmach bakteryjnych i drożdżakowych 11

I.1.1.2 Rola enzymu w organizmach ssaczych 11

I.1.1.3 Znaczenie enzymu jako celu molekularnego w chemoterapii przeciwdrobnoustrojowej i terapii przeciwcukrzycowej 12

I.1.2 Struktura enzymu 12

I.1.2.1 Enzym prokariotyczny 13

I.1.2.2 Enzym eukariotyczny 16

I.1.2.3 Porównanie między enzymem prokariotycznym a eukariotycznym 20

I.1.3 Mechanizm katalizowanej reakcji 22

I.1.3.1 Wiązanie Fru-6-P do domeny izomerazowej 24

I.1.3.2 Hydroliza glutaminy 26

I.1.3.3 Transfer grupy aminowej 28

I.1.3.4 Izomeryzacja fruktozoimino-6-P do GlcN-6-P 29

I.1.4 Regulacja aktywności enzymu 30

I.1.4.1 Regulacja w organizmach prokariotycznych 30

Regulacja na poziomie transkrypcji i translacji (potranslacyjna) 30

Regulacja poprzez końcowe produkty biosyntezy 31

I.1.4.2 Regulacja w organizmach eukariotycznych 31

Regulacja na poziomie transkrypcji i translacji 31

Regulacja poprzez potranslacyjną fosforylację 32

Regulacja poprzez końcowy produkt szlaku biosyntezy – inhibicja poprzez UDP-GlcNAc 33

I.2 METODY OBLICZENIOWE W MODELOWANIU MOLEKULARNYM 36

I.2.1 Modelowanie molekularne, najważniejsze zalety i ograniczenia komputerowych metod analizy 36

I.2.2 Empiryczny model oddziaływań i pola siłowe 38

I.2.3 Dynamika molekularna 40

I.2.4 Analiza głównych składowych (PCA) 44

I.2.5 Zbieżność próbkowania w analizie trajektorii 47

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

II. CEL I ZAKRES PRACY ... 49
III. PRZEPROWADZONE BADANIA ... 50
METODY ... 50
III.1.1 Przygotowanie struktur początkowych ... 51
III.1.2 Przygotowanie i przeprowadzenie Dynamiki Molekularnej ... 52
III.1.3 Analiza trajektorii ... 54
III.1.3.1 Ocena wiarygodności symulacji ... 54
III.1.3.2 Analiza stabilności układu ... 55
III.1.3.3 Ocena zbieżności trajektorii - wybór przedziałów do dalszej analizy ... 56
III.1.3.4 Porównanie średnich fluktuacji aminokwasów ... 56
III.1.3.5 Analiza metodą głównych składowych ... 57
WYNIKI I DYSKUSJA ... 58
III.2.1 Stabilność, wiarygodność i zbieżność symulacji ... 58
III.2.1.1 Stabilność symulacji ... 58
III.2.1.2 Struktura czwartorzędowa ... 61
III.2.1.3 Odległość pomiędzy białkiem a ligandami ... 63
III.2.1.4 Wiarygodność symulacji ... 68
III.2.1.5 Zbieżność trajektorii ... 70
III.2.2 Analiza strukturalna ... 73
III.2.2.1 Analiza metodą głównych składowych ... 74
III.2.2.2 Porównanie ruchliwości atomów węgla α ... 79
Miejsce wiązania inhibitora ... 85
Struktura oligomeryczna białka ... 87
Centrum aktywne ... 88
Ogon-C ... 90
III.2.2.3 Porównanie symulacji dzikiego białka w stanie wolnym oraz mutanta – mechanizm „ogonozamka” ... 93
IV. WNIOSKI I PODSUMOWANIE ... 99
V. PODZIĘKOWANIA ... 104
VI. LITERATURA ... 105
VIII. DOROBEK NAUKOWY ... 113
Publikacje ... 113
Materiały pokonferencyjne ... 113
Wystąpienia ustne oraz plakaty ... 114
Stypendia naukowe i staże ... 116

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

INDEKS SKRÓTÓW

ADMP – 2-amino-2-deoksy-D-mannitol-6-fosforan

AGM1 – mutaza fosfoacetyloglukozaminy

AIDS – (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*) – zespół nabytego upośledzenia odporności

CDC – (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*) – Amerykańskie Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom

CoASH – koenzym A

DON – 6-diazo-5-oksonorleucyna

FMDP – kwas N^3-(metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy

Fru-6-P – Fruktozo-6-fosforan

GAT – (ang. *glutamine amide transfer*) – domena glutaminowa

Glc – Glukoza

GlcN – Glukozamina

Glc-6-P – Glukozo-6-fosforan

GlcN-1-P – Glukozamino-1-fosforan

GlcN-6-P – Glukozamino-6-fosforan

GlcNAc – N-acetyloglukozamina

GlcNAc-1-P – N-acetyloglukozamino-1-fosforan

GlcNAc-6-P – N-acetyloglukozamino-6-fosforan

GlmM – mutaza fosfoglukozaminy pochodzenia bakteryjnego

GlmU – N-acetylotransferaza GlcN-1-P (białko dwufunkcyjne) pochodzenia bakteryjnego

GNA1 – N-acetylotransferaza GlcN-6-P pochodzenia drożdżowego

GTS – (ang. *glucose transfer system*) – systemu transportu glukozy

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

IC_{50}	–	(ang. *inhibitory concentration*) – stężenie badanego związku, powodujące zahamowanie wzrostu komórek w 50%
ISOM	–	domena izomerazowa
MD	–	(ang. *molecular dynamic*) – dynamika molekularna
NADP	–	(ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
Nag1	–	deaminaza GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego
NagB	–	deaminaza GlcN-6-P pochodzenia bakteryjnego
PBC	–	(ang. *periodic boundary conditions*) – otoczenie periodyczne
PCA	–	(ang. *principal components analysis*) – analiza głównych składowych
PME	–	(ang. *particle mesh Ewald*) – metoda Ewalda obliczania sumy sieciowej
RMSD	–	(ang. *root mean square deviation*) – średnie odchylenie standardowe atomów cząsteczki
RMSF	–	(ang. *root mean square fluctuation*) – odchylenie położenia atomu od jego średnich współrzędnych; średnie fluktuacje atomu
UAP1	–	fosforylaza Urydyno-5'-difosfo-*N*-acetylo-D-glukozaminy pochodzenia ludzkiego
UDP-GlcNAc	–	Urydyno-5'-difosfo-*N*-acetylo-D-glukozamina
URA	–	uracyl
VS	–	(ang. *virtual screening*) – screening wirtualny, przeszukiwanie wirtualne

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Streszczenie

Niniejsza praca przedstawia wyniki badań poświęconych enzymowi syntazie glukozamino-6-fosforanu pochodzącemu z drożdży *Candida albicans*, prowadzone metodami obliczeniowymi. Enzym ten odpowiedzialny jest między innymi za biosyntezę kluczowych składników ściany komórkowej grzybów i bakterii, ma również wpływ na regulację metabolizmu glukozy. Niniejsza praca stanowi jeden z etapów poszukiwania molekularnego mechanizmu inhibicji , której eukariotyczna syntaza GlcN-6-P podlega pod wpływem swego fizjologicznego inhibitora, którym jest UDP-GlcNAc. Wyjaśnienie tego mechanizmu może mieć więc duże znaczenie nie tylko dla poszukiwań chemoterapeutyków przeciwgrzybowych, ale również w leczeniu cukrzycy typu II.

Niestety, badania prowadzone klasycznymi technikami eksperymentalnymi nie przyniosły dotychczas zadowalających rezultatów. Alternatywą i uzupełnieniem tradycyjnych technik są metody obliczeniowe, a w szczególności metody modelowania molekularnego, które umożliwiają nie tylko wgląd w zachowanie cząsteczek, ale również precyzyjne śledzenie zachodzących zmian na niedostępnym innymi sposobami poziomie.

Aby przeprowadzić analizy wyżej wymienionymi metodami, niezbędna była struktura krystaliczna białka. W przypadku eukariotycznej syntazy GlcN-6-P, kompletny, dwudomenowy model enzymu nie został jeszcze otrzymany. Na chwilę obecną, dysponujemy jedynie strukturą domeny izomerazowej, do której wiąże się inhibitor. Porównanie modeli statycznych domeny w stanie wolnym i ze związanym UDP-GlcNAc nie wykazuje istotnych różnic, tak więc podejrzewa się, iż proces inhibicji wiąże się ze zmianami w dynamicznych właściwościach cząsteczki. Zmiany te można by zaobserwować podczas symulacji zachowania enzymu w warunkach zbliżonych do komórkowych.

Przeprowadzone w pierwszym etapie badań analizy oparte na porównaniu wyników dynamiki molekularnej dla domeny ISOM w stanie wolnym oraz dla jej kompleksu z inhibitorem jednoznacznie wskazywały na kluczową rolę elastyczności i ruchliwości pewnych fragmentów struktury, m. in. i zwłaszcza ogona-C. Usztywnienie zachodzące w wyniku związania UDP-GlcNAc może skutkować zaburzeniami przekazywania sygnału pomiędzy domeną izomerazową a glutaminową i w konsekwencji prowadzić do zahamowania aktywności katalitycznej enzymu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Drugi etap badań stanowił kontynuację poprzednich analiz i polegał na porównaniu wyników symulacji przeprowadzonych na analogicznych modelach domeny ISOM, a różniących się od tych wykorzystywanych w pierwszym etapie jedynie obecnością Fru-6-P w centrum katalitycznym. Celem było z jednej strony sprawdzenie czy też poprzednio wysnute wnioski znajdują potwierdzenie dla symulacji struktur zawierających substrat, z drugiej zaś zapewnienie lepszego wglądu w inhibicję syntazy GlcN-6-P pod wpływem UDP-GlcNAc oraz rolę, jaką ogon-C odgrywa dla przenoszenia sygnału pomiędzy domenami enzymu.

Zaobserwowane usztywnienie ogona-C w specyficznej formie ruchliwej pętli o unieruchomionych końcach, mające miejsce na skutek związania substratu, zainspirowało przeprowadzenie dodatkowego etapu badań. W ramach tego etapu, przeprowadzone zostały analizy symulacji modelu domeny ISOM ze sztucznie wprowadzoną strukturą „ogonozamka", blokującą końcówki ogona-C w sposób analogiczny do mającego miejsce w białku prokariotycznym. Celem tego etapu było sprawdzenie w jaki sposób obecność lub brak „ogonozamka" w strukturze enzymu warunkuje stopień ruchliwości ogona-C oraz jego podatność na zmiany w ruchliwości wywołane związaniem inhibitora.

Analizy rezultatów przeprowadzonych symulacji wykazały istotne różnice w ruchliwości specyficznych fragmentów porównywanych struktur. W szczególności dotyczy to ważnych z funkcjonalnego punktu widzenia regionów, które jako takie mogą być odpowiedzialne za zmiany aktywności enzymu zachodzące pod wpływem związania inhibitora. W oparciu o te obserwacje, wysunięta została hipoteza dotycząca mechanizmu inhibicji, dotycząca zaburzeń katalitycznej aktywności kilku reszt aminokwasowych, w tym His607$^{\#}$, oraz ruchów ogona-C. Jako że cztery końcowe aminokwasy ogona-C odgrywają kluczową rolę w komunikacji i przekazywaniu sygnału pomiędzy domenami enzymu, wspomniane zmiany mogą być odpowiedzialne za inhibicję enzymu pod wpływem UDP-GlcNAc.

Otrzymane przeze mnie wyniki zapewniły wgląd w zmiany ruchliwości ważnych z funkcjonalnego punktu widzenia fragmentów domeny ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans*, mające miejsce na skutek związania UDP-GlcNAc i stanowią istotny krok ku zrozumieniu mechanizmu inhibicji zachodzącej pod jego wpływem.

Wyniki te stanowią również potwierdzenie i wyjaśnienie z poziomu molekularnego, wpływu zmian konformacyjnych określonych fragmentów struktury enzymu na jego aktywność. Wpływ ten sugerowany był w licznych pracach eksperymentalnych, a jego konsekwencje widoczne są w strukturach krystalicznych jako brakujące fragmenty białka.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I. Wprowadzenie teoretyczne

Znaczenie prowadzonych badań

Od kilku dziesięcioleci środowiska medyczne i naukowe z niepokojem odnotowują stały wzrost częstości występowania układowych zakażeń grzybiczych, wywoływanych przez grzyby i drożdżaki chorobotwórcze. Dotychczas uznawane za stosunkowo niegroźne patogeny, dziś stanowią jedno z największych zagrożeń dla życia i zdrowia hospitalizowanych pacjentów. O randze problemu świadczyć mogą wyniki badań dr A. Sameta z Akademii Medycznej w Gdańsku wykazujące, że ok. 70% śmiertelnych powikłań pooperacyjnych wywołanych jest przez zakażenia grzybicze (Samet, dane niepublikowane). Najczęstszym czynnikiem etiologicznym są grzyby z rodzaju *Candida* (ok. 60–80% zakażeń (Warzocha 2008), z czego ok. 53% dotyczy *Candida albicans), Aspergillus, Histoplasma* i *Cryptocossus* (Kao et al. 1999).

Paradoksalnie, największy odsetek chorych występuje w krajach o wysokim poziomie opieki zdrowotnej, a winą za taki stan rzeczy obarcza się postęp w medycynie. Powszechne nadużywanie antybiotyków o szerokim spektrum działania doprowadziło z jednej strony do powstania lekoopornych szczepów bakterii, z drugiej zaś umożliwiło oportunistycznym patogenom łatwy dostęp do pozbawionego naturalnej flory bakteryjnej organizmu. Najbardziej zagrożeni rozwojem grzybicy układowej, z najwyższą śmiertelnością w przebiegu zakażenia, są chorzy z zaburzeniami odporności. Grupę najwyższego ryzyka stanowią pacjenci po przeszczepach, chorzy na AIDS lub też cierpiący na choroby autoimmunologiczne i wymagający stosowania leków immunosupresyjnych, a także cierpiący na nowotwory wymagające intensywnej chemio- i radioterapii. Ocenia się, że zagrażające życiu infekcje grzybicze rozwijają się u 20-30% chorych z ostrą białaczką (głównie z ostrą białaczką szpikową), u 10-15% chorych z chłoniakami, u 5% chorych z nowotworami litymi (Hughes et al. 1997, Schimpff et al. 1986, Sickles et al. 1975). W grupie chorych na AIDS, infekcje grzybicze są tak powszechne, że niektóre dane statystyczne podają grzybice układowe jako główną przyczynę śmierci chorych na zespół nabytego upośledzenia odporności.

Bardzo podobna sytuacja dotyczy cukrzycy typu II, jednej z tak zwanych chorób metabolicznych – światowe statystyki odnotowują stały i szybki wzrost zachorowań na to schorzenie. Szacuje się, że ponad 200 milionów ludzi cierpi obecnie na cukrzycę a prognozy mówią nawet o 400 milionach chorych w roku 2030. Tak więc, cukrzyca typu II, zwana również insulinoniezależną, jest obecnie uważana za jedno z najczęściej spotykanych i najszybciej się rozprzestrzeniających chronicznych schorzeń na świecie. Amerykańskie Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) opisuje wzrost zachorowalności na cukrzycę typu II jako epidemię.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wobec tak alarmujących sygnałów, opracowanie skutecznych leków przeciwgrzybowych i przeciwcukrzycowych wysuwa się na jedną z wiodących pozycji wśród wyzwań współczesnych nauk biomedycznych. Choć na pierwszy rzut oka nie związane ze sobą, oba te zagadnienia mają bardzo istotny punkt wspólny: enzym syntazę GlcN-6-P, który ze względu na pełnione w eukariotycznych organizmach funkcje, może być celem molekularnym zarówno terapii przeciwgrzybowej jak i przeciwcukrzycowej.

Kluczowym kryterium w poszukiwaniach dobrego chemoterapeutyku jest jego selektywna toksyczność – związek powinien wywierać maksymalnie szkodliwe działanie na patogen przy minimalnym wpływie na komórkę gospodarza. Pożądaną, wysoką wartość selektywnej toksyczności, osiągnąć można przy wykorzystaniu różnic w budowie i funkcjach komórek patogenu i gospodarza.

Wieloletnie badania nad grzybami i drożdżakami pozwoliły stosunkowo dobrze poznać te organizmy. Niestety, ich podobieństwo biochemiczne do komórek ludzkich stanowi dużą przeszkodę w poszukiwaniu chemoterapeutyków o wysokiej selektywnej toksyczności (Baldauf & Palmer 1993).

Obecne na rynku leki przeciwgrzybicze wykorzystują różnice w budowie błony cytoplazmatycznej między komórkami ludzkimi i grzybowymi oraz obecność ściany komórkowej u grzybów. Najważniejsze spośród tych różnic zestawione są w Tabeli 1.

Tabela 1: Różnice biochemiczne w budowie komórek grzybowych i ludzkich wykorzystywane przez związki wykazujące aktywność przeciwgrzybową (Bruhl & Brzozowski 1979).

Struktura komórkowa	**Różnica/Cel molekularny**	**Leki przeciwgrzybowe**
Błona cytoplazmatyczna	Sterole w błonie cytoplazmatycznej / Ergosterol w błonie grzybowej	Antybiotyki polienowe: nystatyna, amfoterycyna B
	Konsekwencje zahamowania biosyntezy sterolu / demetylaza lanosterolowa	Pochodne imidazolu i triazolu: ketoconazol, flukonazol, worykonazol
Ściana komórkowa	Obecność β-glukanu w ścianie grzybowej / syntaza β-glukanu	Echinokandyny: kaspofungina, anidulafungina

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W trakcie prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej badań, mających na celu opracowanie skutecznych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych, stwierdzono, że podstawą selektywnej toksyczności mogą być również tak zwane różnice konsekwencyjne – inhibicja danego enzymu ma różny skutek dla komórki patogenu i gospodarza. Modelowym przykładem takiego białka jest syntaza glukozamino-6-fosforanu: jej selektywna inaktywacja w komórkach grzybowych prowadzi do zahamowania biosyntezy zawierających glukozaminę makromolekuł ściany komórkowej i w konsekwencji do zmian morfologicznych, aglutynacji i lizy komórek. Natomiast w organizmach ssaków istnieje pula glukozaminy wystarczająca do zaspokojenia kilkudniowych potrzeb organizmu, czyli do czasu, gdy nowa ekspresja genu kodującego syntazę pozwoli zastąpić nieaktywne cząsteczki enzymu ich funkcjonalnymi odpowiednikami (Bontemps-Gracz et al. 1991).

Badania nad projektowaniem związków przeciwgrzybowych prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej koncentrują się na dwóch typach cząsteczek: antybiotykach z grupy makrolidów polienowych, oddziaływujących na błonę komórkową oraz inhibitorach enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu, związanego z biosyntezą składników ściany komórkowej. Makrolidy polienowe są potencjalnie najciekawszymi czynnikami przeciwgrzybowymi, jednakże mają bardzo poważne wady, z których najistotniejsze to słaba rozpuszczalność w wodzie i bardzo wysoka toksyczność.

Z drugiej strony, różnice konsekwencyjne inhibicji syntazy GlcN-6-P pomiędzy komórkami grzybowymi a ludzkimi, czynią z tego enzymu obiecujący cel molekularny. Dotychczas uzyskano dość liczną grupę naturalnych i syntetycznych inhibitorów, obejmującą między innymi tetainę (Rogers et al. 1965; Kryński et al. 1952; Atsumi et al. 1975) i chlorotetainę (Rapp et al. 1988). Tetaina, antybiotyk o szerokim spektrum działania, wzbudziła duże zainteresowanie japońskich, amerykańskich i polskich naukowców, miedzy innymi grupy prof. Borowskiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Niestety, wysoka skuteczność przeciwgrzybowa tego związku idzie w parze z jego cytostatycznością względem komórek ludzkich (Woynarowska et al. 1965). Skłoniło to badaczy do projektowania i syntezy oligopeptydów o mniejszej szkodliwości dla komórek ludzkich, w których skład wchodzą inhibitory syntazy GlcN-6-P, w tym szczególnie FMDP (kwas N^3-(4-metoksyfumaroilo)-L-2,3-diaminopropanowy). Poznanie molekularnego mechanizmu katalizy enzymatycznej i ustalenie warunków strukturalnych związku niezbędnych dla wybiórczej inaktywacji enzymu było kluczowym etapem poszukiwań, podczas których nieocenione okazały się techniki obliczeniowe, dzięki którym Wojciechowski i in. opracowali farmakoforową konformację selektywnych względem syntazy GlcN-6-P analogów glutaminy (Wojciechowski et al. 1995).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tak zwane FMDP-peptydy (w szczególności Lys-Nva-FMDP (Milewski et al. 1988; Milewski et al. 1991; Milewski et al. 1998), otrzymane na drodze racjonalnego projektowania, w warunkach *in vitro* nie tylko wykazują skuteczne działanie przeciwgrzybowe przy braku aktywności cytostatycznej w odniesieniu do komórek ssaczych (Bontemps-Gracz et al. 1991), ale są również inhibitorami wzrostu bakterii Gram-dodatnich (Chmara et al. 1998).

Alternatywnym podejściem w poszukiwaniach selektywnej metody zahamowania aktywności syntazy GlcN-6-P może stać się wykorzystanie zjawiska regulacji tejże aktywności za pomocą urydyno-5'-difosfo-*N*-acetylo-D–glukozaminy (UDP-GlcNAc). Związek ten jest końcowym produktem szlaku biosyntezy, którego pierwszy etap katalizuje syntaza GlcN-6-P, prowadzącego do powstania ważnych elementów ściany komórkowej grzybów (Milewski 2002).

Poznanie molekularnego mechanizmu inhibicji, jakiej podlega enzym pod wpływem UDP-GlcNAc, może dać początek zupełnie nowej klasie leków przeciwgrzybowych. Ponadto, jako że syntaza GlcN-6-P związana jest z metabolizmem glukozy (Marshall et al. 1991), poznanie sposobu jej efektywnej regulacji może być także pomocne w leczeniu cukrzycy typu II.

Podobnie jak w poprzednich badaniach, w ustalaniu mechanizmu inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc bardzo pomocnym narzędziem są komputerowe metody modelowania molekularnego. Niniejsza praca stanowi element tych poszukiwań i jest małym krokiem na ścieżce prowadzącej być może w efekcie końcowym do przełomu w leczeniu „epidemii" grzybic układowych i cukrzycy typu II. Poszukiwanie nowych leków wpasowuje się w kanon najpilniejszych potrzeb dotyczących ochrony zdrowia a stosowane podejście badawcze, określane jako racjonalne projektowanie chemoterapeutyków, uważane jest za jedną z najefektywniejszych metod poszukiwania nowych substancji leczniczych.

Przewidywany efekt końcowy badań, w zakres których wpisuje się wkład tej pracy doktorskiej – propozycja mechanizmu regulacji aktywności syntazy GlcN-6-P, może przyczynić się do opracowania nowej klasy leków przeciwgrzybowych i przeciwcukrzycowych, będzie mieć zatem znaczenie dla rozwoju ochrony zdrowia i biotechnologii, jak również dla farmakoinformatyki.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1 Enzym syntaza glukozamino-6-fosforanu

Zgodnie z obecną klasyfikacją, syntaza glukozamino-6-fosforanu (L-glutamina: D-fruktozo-6-fosforan amidotransferaza, EC 2.6.1.16) należy do rodziny amidotransferaz glutaminowych klasy II, względnie amidotransferaz glutaminowych typu purF.

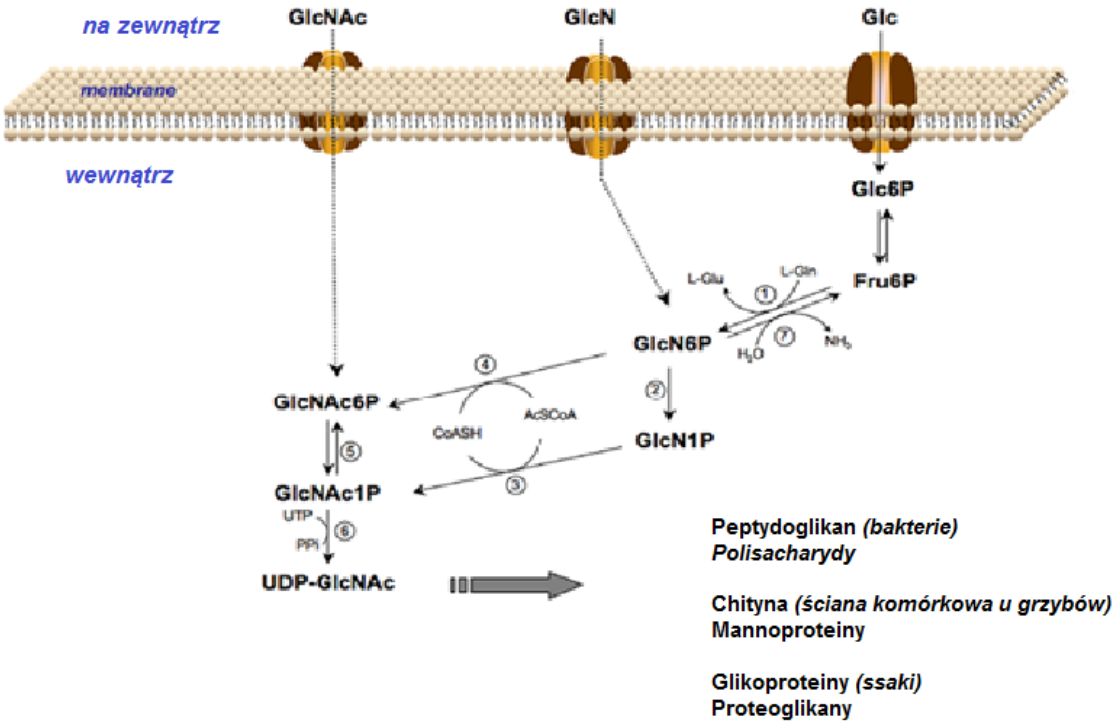
Enzymy należące do grupy amidotransferaz katalizują reakcję przeniesienia azotu amidowego z L-glutaminy na cząsteczkę akceptorową, w wyniku czego powstają: cząsteczka kwasu glutaminowego i cząsteczka aminowanego produktu. Enzymy te biorą udział w biosyntezie puryn i pirymidyn, niektórych aminokwasów, koenzymów, antybiotyków oraz glukozamino-6-fosforanu (Zalkin 1993; Zalkin & Smith 1998; Massiere & Badet-Denisot 1998). Jedną z charakterystycznych dla amidotransferaz cech jest brak zapotrzebowania na kofaktor oraz zdolność wykorzystywania egzogennego amoniaku jako alternatywnego źródła azotu. Syntaza glukozamino-6-fosforanu jest wyjątkiem od tej reguły, gdyż wykazuje całkowitą specyficzność substratową: w jej przypadku L-glutamina nie może być zastąpiona amoniakiem. Klasyfikuje się ją zatem jako amidotransferazę glutaminozależną (Milewski 2002).

Amidotransferazy glutaminowe można podzielić na 2 podrodziny. Podstawą podziału są w tym przypadku odmiany sposobu, w jaki wiązana jest glutamina. Według klasyfikacji Zalkina (Zalkin 1993) podrodziny te zwane są grupami trpG i purF lub też, według Massiere, odpowiednio klasą I (Triad) i klasą II (Ntn). Główną różnicą pomiędzy domenami enzymów klasy I i klasy II jest położenie strategicznej dla katalizy reszty cysteinowej oraz mechanizm jej aktywacji. W przypadku amidotransferaz klasy I cysteina wchodzi w skład triady katalitycznej Cys-His-Glu i znajduje się w zakonserwowanej sekwencji aminokwasowej w środku łańcucha (Smith 1995; Paluh et al. 1985; Zalkin et al. 1985).

W amidotransferazach glutaminowych klasy II, do których należy syntaza GlcN-6-P, katalityczna cysteina jest N-końcowym aminokwasem łańcucha polipeptydowego (Massiere & Badet-Denisot 1998; Mantsala & Zalkin 1984). W przeciwieństwie do enzymów klasy I, reszta tiolowa katalitycznej Cys1 nie jest otoczona aminokwasami zwiększającymi jej nukleofilowość. Zamiast tego, Isupov i in. wysunęli hipotezę autoaktywacji Cys1 za pośrednictwem jej niesprotonowanej wolnej grupy aminowej, co wymagałoby obecności cząsteczki przekaźnikowej, na przykład wody (Isupov et al. 1996).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Syntaza GlcN-6-P katalizuje pierwszy i praktycznie nieodwracalny etap szlaku biosyntezy heksozoamin, czyli reakcję przeniesienia reszty aminowej z glutaminy na fruktozo-6-fosforan (Fru-6-P) z wytworzeniem kwasu glutaminowego i glukozoamino-6-fosforanu (GlcN-6-P). Powstawanie GlcN-6-P jest czynnikiem warunkującym szybkość całego szlaku biosyntezy heksozoamin, prowadzącego do utworzenia UDP-GlcNAc. Szlak biosyntezy UDP-GlcNAc u prokariotów i eukariotów jest bardzo podobny; jedyne różnice polegają na kolejności dwóch etapów następujących bezpośrednio po utworzeniu GlcN-6-P. U prokariotów, GlcN-6-P jest izomeryzowany do D-glukozamino-1-fosforanu (GlcN-1-P) poprzez mutazę fosfoglukozaminy i następnie przekształcany w UDP-GlcNAc przez acetylotransferazę GlcN-1-P (Durand et al. 2008), podczas gdy w komórkach eukariotycznych etap izomeryzacji jest poprzedzony acetylacją (Warren et al. 1972) (Rysunek 1).



Rysunek 1: Ścieżka biosyntezy UDP-GlcNac. 1 - syntaza GlcN-6-P; 2 - mutaza fosfoglukozaminy (GlmM); 3 - N-acetylotransferaza GlcN-1-P (GlmU); 4 – N-acetylotransferaza GlcN-6-P (GNA1); 5 - mutaza fosfoacetyloglukozaminy (AGM1); 6 – urydylotransferaza NAG-1-P (GlmU u prokariotów, UAP1 u eukariotów); 7 – deaminaza GlcN-6-P (NagB u prokariotów, Nag1 u eukariotów). U prokariotów ścieżka obejmuje etapy: 1,2,3,6 podczas gdy u eukariotów są to etapy: 1,4,5,6. Przerywane linie opisują ścieżkę „ratunkową" dla komórek, w których gen kodujący białko 1 został zmutowany lub usunięty (Durand et al. 2008)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.1 Znaczenie biologiczne enzymu

I.1.1.1 Rola enzymu w organizmach bakteryjnych i drożdżakowych

W komórkach bakterii i drożdżaków, podstawową rolą syntazy GlcN-6-P jest kataliza biosyntezy jednego z podstawowych składników ściany komórkowej tych organizmów.

Urydyno-5'-difosfo-*N*-acetylo-D–glukozamina, końcowy produkt szlaku biosyntezy heksozoamin zapoczątkowanego przez syntazę GlcN-6-P, pełni rolę aktywowanej formy *N*-acetyloglukozaminy, inicjując włączenie tego aminocukru w struktury makrocząsteczek takich jak: peptydoglikan, lipopolisacharydy i kwasy tejchojowe u Gram-ujemnych bakterii oraz chityna u grzybów. Jako enzym uczestniczący w biosyntezie ważnych elementów ściany komórkowej, syntaza GlcN-6-P ma kluczowe znaczenie dla komórek ją posiadających. Delecja genu odpowiadającego za syntezę enzymu ma śmiertelne konsekwencje zarówno dla grzybów (Whelan & Ballou 1975) jak i dla bakterii (Sarvas 1971; Freese et al. 1970).

I.1.1.2 Rola enzymu w organizmach ssaczych

Fizjologiczna rola syntazy GlcN-6-P w organizmach ssaczych jest bardziej złożona. Bez wątpienia jest to jeden z niezbędnych enzymów, ale jego krótkoterminowa inhibicja nie musi być szkodliwa dla całego organizmu (Bates et al. 1966). Ścieżka biosyntezy heksozoamin, w której bierze udział syntaza, stanowi odgałęzienie szlaku glikolizy. Marshall i in. wykazali, że w komórkach ssaków, syntaza GlcN-6-P jest odpowiedzialna za przekształcanie 2-5% pochodzącego od glukozy Fru-6-P w GlcN-6-P (Marshall et al. 1991), co daje początek syntezie glikoprotein i glikolipidów. Odkryto, że syntaza GlcN-6-P odgrywa ważną rolę w procesie regulacji równowagi glukozowej oraz w toksyczności glukozowej, przejawiającej się utratą wrażliwości systemu transportu glukozy (ang. *glucose transfer system, GTS*) na insulinę u chorych na cukrzycę typu II (Traxinger & Marshall 1991). Ponadto, dowiedziono na kilka sposobów, że regulacja aktywności syntazy GlcN-6-P może mieć duże znaczenie nie tylko w leczeniu grzybic układowych i cukrzycy, ale także stanów zapalnych i owrzodzeń. Prowadzone są również badania nad aktywnością enzymu w komórkach nowotworowych (Tsuiki & Miyagi 1975).

Choć nie budzi wątpliwości, że enzym związany jest z wymienionymi procesami, jego rola w ich molekularnych mechanizmach nadal pozostawia wiele niejasności. Sporne wyniki badań różnych grup naukowców prowadzić mogą jedynie do konkluzji, iż konieczne są dalsze poszukiwania.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.1.3 Znaczenie enzymu jako celu molekularnego w chemoterapii przeciwdrobnoustrojowej i terapii przeciwcukrzycowej

Rola syntazy GlcN-6-P w terapii przeciwdrobnoustrojowej oparta jest na zjawisku selektywnej toksyczności: inaktywacja enzymu w komórkach drobnoustrojowych prowadzi do zahamowania biosyntezy zawierających glukozaminę makromolekuł ściany komórkowej i w konsekwencji do zmian morfologicznych, aglutynacji i lizy komórek, podczas gdy w organizmach ssaków istnieje pula glukozaminy wystarczająca do zaspokojenia kilkudniowych potrzeb organizmu, czyli do czasu, gdy nowa ekspresja genu kodującego syntazę pozwoli zastąpić nieaktywne cząsteczki enzymu ich funkcjonalnymi odpowiednikami (Bates et al. 1966; Milewski 2002).

Ponadto, jak wspomniano wcześniej, syntaza GlcN-6-P obecna w komórkach ludzkich, odgrywa ważną rolę w regulacji równowagi glukozowej oraz w toksyczności glukozowej, przejawiającej się utratą wrażliwości systemu transportu glukozy na insulinę u chorych na cukrzycę typu II (Traxinger & Marshall 1991). Poznanie mechanizmów regulacji enzymu eukariotycznego może zatem przyczynić się do opracowania nowych leków przeciwcukrzycowych.

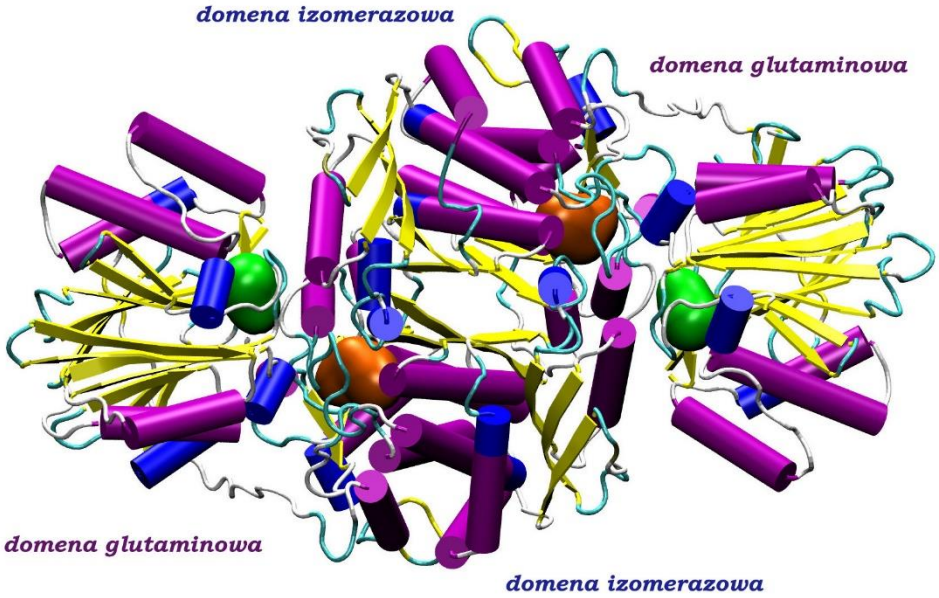
I.1.2 Struktura enzymu

Syntaza GlcN-6-P uznawana jest za stosunkowo duże białko – długość jej łańcucha polipeptydowego waha się od 589 reszt aminokwasowych u *Methanobacterium* do 716 reszt dla enzymu z *S. cerevisiae* (Milewski 2002) i wykazuje pewne zróżnicowanie pomiędzy sekwencjami pochodzenia prokariotycznego i eukariotycznego. Obie wersje enzymu zawierają dwa odrębne fragmenty, odpowiadające dwóm domenom: domenie glutaminowej (ang. *glutamine amide transfer*, GAT) – odpowiedzialnej za transfer grupy amidowej z glutaminy oraz domenie izomerazowej (fruktozowej, syntazowej, ISOM), wiążącej akceptor, jakim w przypadku syntazy GlcN-6-P jest fruktozo-6-fosforan i przeprowadzającej jego izomeryzację (Mei & Zalkin 1989; Mei & Zalkin 1990). Pierwsza z nich, odpowiadająca N-końcowi łańcucha białkowego, zlokalizowana jest w zewnętrznej części struktury; natomiast druga, leżąca na C-końcu, stanowi trzon białka.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.2.1 Enzym prokariotyczny

Syntaza GlcN-6-P pochodzenia prokariotycznego jest dimerem składającym się z dwóch identycznych podjednostek (Rysunek 2), o całkowitej masie cząsteczkowej w zakresie 130-150 kDa. Enzym kodowany jest przez gen *glmS*, a jego struktura i mechanizm katalityczny są stosunkowo dobrze poznane.

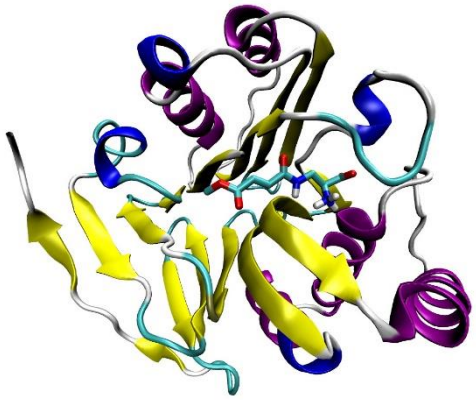


Rysunek 2: Struktura bakteryjnej syntazy GlcN-6-P (PDB: 2J6H). Związane w centrach aktywnych substraty przedstawiono na modelu powierzchniowym w kolorze pomarańczowym (Fru-6-P) i zielonym (Gln). Domeny ISOM stanowią wewnętrzną część cząsteczki, zaś domeny GAT usytuowane są w jej zewnętrznych regionach

W przypadku syntazy GlcN-6-P pochodzącej z *E. coli*, domenę GAT tworzą reszty aminokwasowe 1-240, zaś domenę syntazową reszty 241-608 (a Teplyakov et al. 1999). W każdej z podjednostek, obie domeny połączone są ze sobą poprzez łącznik zbudowany z dziewięciu reszt aminokwasowych (240-248), pozwalający na szeroki zakres zmian ułożenia domeny GAT względem domeny ISOM w trakcie reakcji katalizy (Durand et al. 2008). Zmiany te, zainicjowane związaniem substratu, umożliwiają transfer sygnału pomiędzy domenami. Wewnątrzcząsteczkowa ruchliwość domeny GAT w białku ze związanym substratem cukrowym jest prawdopodobnie czynnikiem umożliwiającym tej domenie zawiasowe ruchy o odchyleniu 23° względem domeny ISOM, które to mają miejsce po związaniu L-glutaminy i pozwalają białku na zachowanie oddziaływań na powierzchni styku dimerów (Mouilleron & Golinelli-Pimpaneau 2007; Mouilleron et al. 2008).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Uzyskane głównie metodami rentgenografii strukturalnej informacje na temat drugo- i trzeciorzędowej struktury domeny GAT wykazują, że ma ona strukturę α2β2-kanapki złożonej z dwóch antyrównoległych β-kartek otoczonych dwiema warstwami α-helis (Milewski 2002).



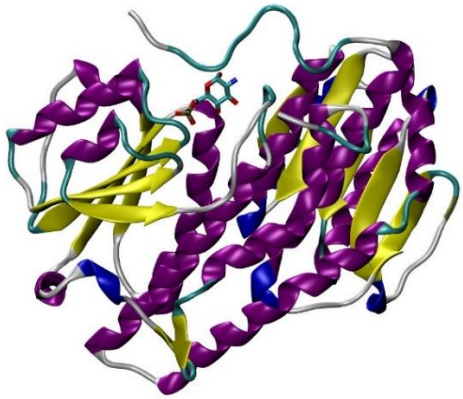
Rysunek 3: Domena GAT syntazy GlcN-6-P pochodzącej z E. coli (PDB: 1JXA). Substrat pokazany jest w reprezentacji patyczkowej.

Centrum aktywne położone jest na N-końcu łańcucha polipeptydowego, w wąskim rowku pomiędzy końcami β-kartek (Rysunek 3). Reszta cysteinowa Cys1 uczestniczy bezpośrednio w hydrolizie glutaminy, ale kilka innych reszt bierze udział w jej związaniu i stabilizacji produktów przejściowych reakcji (Milewski 2002). Badania przeprowadzone przez Isupova i in. wykazały, że łańcuchy boczne Arg73 i Asp123 oddziałują bezpośrednio z grupą karboksylową i aminową substratu, a wspomagane są między innymi przez reszty Thr76 i His77. Z kolei reszty Gly99 oraz Asn98 tworzą niszę oksyanionową, stabilizującą ujemny ładunek na tetraedrycznym stanie przejściowym reakcji (Teplyakov et al. 2002).

Dwie pętle, złożone z aminokwasów 73-80 (tzw. Q-pętla, ang. *Q-loop*) i 25-29, wykazują dużą elastyczność konformacyjną. Pierwsza z nich tworzy swego rodzaju „wieko", zamykające centrum aktywne po związaniu glutaminianu, druga zaś jest podejrzewana o udział w systemie przekazywania sygnału pomiędzy domenami. Pojawiły się sugestie, że po związaniu cząsteczki akceptorowej (Fru-6-P) w domenie ISOM, pętla 25-29 przechodzi zmiany konformacyjne, w wyniku których reszta Arg26 przybliża się do glutaminowego centrum aktywnego, inicjując w ten sposób rotację Cys1 w kierunku jej aktywnej konformacji (Teplyakov et al. 2002; Milewski 2002).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Analiza budowy przestrzennej prokariotycznej domeny izomerazowej (Rysunek 4) pozwala stwierdzić, że składa się ona z dwóch topologicznie identycznych podjednostek, odpowiadających C-końcowi i N-końcowi łańcucha polipeptydowego (241-424 oraz 425-592). Każda z nich ma strukturę αβα-kanapki (ang. *αβα-sandwich*) zawierającej pięcioniciową równoległą β-kartkę (ang. *β-sheet*) otoczoną z każdej strony przez α-helisy. Strukturę domeny dopełnia nieregularna Ω-pętla (ang. *Ω-loop*) zbudowana z szesnastu C-końcowych aminokwasów 593-608, zwana ogonem-C.



Rysunek 4: Domena ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzącej z E. coli (PDB: 1MOQ). Substrat pokazany jest w reprezentacji patyczkowej.

Pomimo widocznej symetrii, domena izomerazowa zawiera tylko jedno centrum aktywne, znajdujące się na N-końcu (Teplyakov et al. 1998). Jest ono utworzone przez trzy różne elementy struktury drugorzędowej: β-kartkę, α-helisę oraz pętlę Ω. Ta ostatnia, odpowiadająca ogonowi-C, choć należy do C-końcowej części domeny, wysuwa się z niej i sięga aż do karboksylowego końca β kartki należącej do N terminalnej części domeny (Teplyakov et al. 1999).

Trzy reszty aminokwasowe: Glu488, His504 i Lys603 są bezpośrednio związane z reakcją katalityczną (Milewski 2002). Co ciekawe, reszta His504 ulokowana jest na peryferiach domeny izomerazowej, z dala od centrum aktywnego. Udział tej reszty udowadnia, że reakcja może zachodzić jedynie w funkcjonalnej, dimerycznej formie enzymu, gdzie His504 z domeny jednego łańcucha znajduje się blisko centrum aktywnego domeny należącej do drugiej podjednostki (Teplyakov et al. 2001). Oprócz wymienionych aminokwasów, kilka innych reszt bierze udział w wiązaniu substratu, w tym: Ser303, Ser347, Gln348, Ser349 oraz Thr352, które stabilizują substrat w centrum aktywnym poprzez tworzenie wiązań wodorowych z tlenami grupy fosforanowej Fru-6-P.

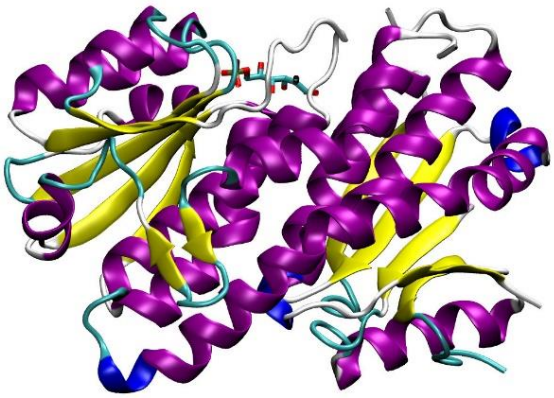
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.2.2 Enzym eukariotyczny

Struktura enzymu pochodzenia eukariotycznego jest na chwilę obecną poznana o wiele gorzej niż jej prokariotycznego odpowiednika. Eukariotyczna syntaza GlcN-6-P kodowana jest przez gen *gfa* (u ludzi – *gfat*). Wszystkie poznane dotychczas wersje eukariotycznej syntazy GlcN-6-P mają strukturę homotetrameru o masie podjednostek wynoszącej około 79,5 kDa, którego rdzeń stanowi tetramer domen ISOM. Eukariotyczną syntazę GlcN-6-P można potraktować jako dimer dimerów, ponieważ między podjednostkami A i C oraz B i D istnieją silne oddziaływania dimeryzujące, zaś obszar oddziaływania w obrębie dimeru równocześnie tworzy płaszczyznę do oddziaływań z dimerem sąsiadującym. Sekwencja łańcucha polipetydowego eukariotycznej syntazy GlcN-6-P wykazuje duży stopień analogii do sekwencji łańcucha prokariotycznej wersji enzymu, jednak występują istotne różnice, szczególnie w obrębie domeny GAT.

Struktura krystaliczna kompletnej eukariotycznej syntazy GlcN-6-P nie została dotychczas otrzymana. Ustalona została natomiast struktura tetrameru domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* (Raczyńska et al. 2007). Raczyńska i in. otrzymali dwie formy krystaliczne domeny: tetragonalne kryształy zawierające jedynie glukozo-6-fosforan (Glc-6-P) w centrum aktywnym oraz zawierające dodatkowo inhibitor (UDP-GlcNAc) kryształy w układzie jednoskośnym (Raczynska et al. 2007; Olchowy et al. 2005). Sumarycznie, otrzymane, dokładnie opisane zarejestrowane w RCSB Protein Data Bank zostały struktury krystaliczne czterech następujących kompleksów domeny izomerazowej Gfa1p:

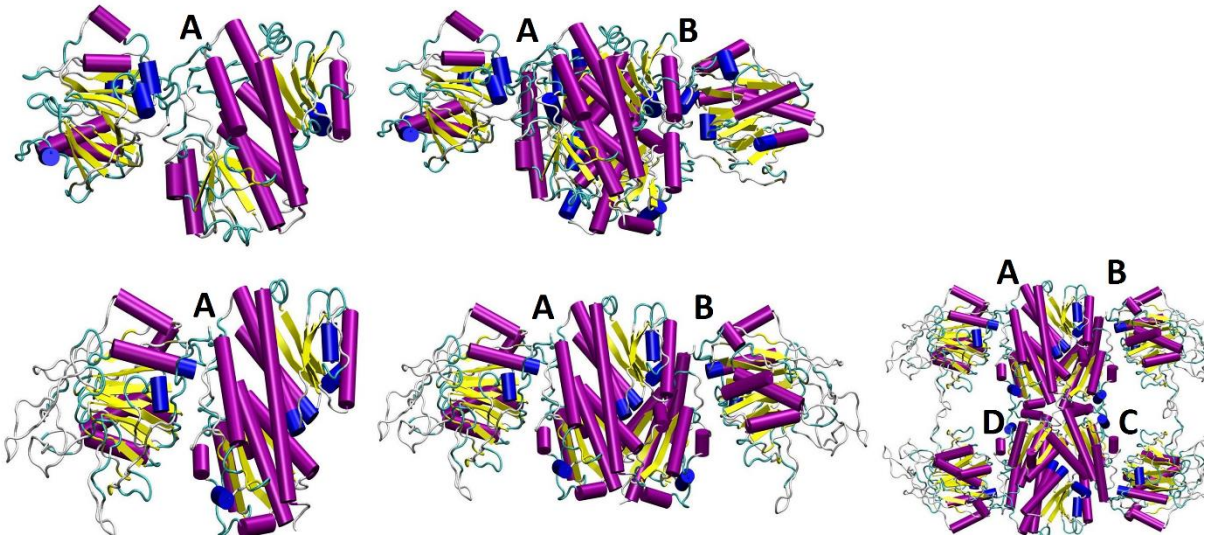
- Struktura dimeryczna ze związanym Glc-6-P (PDB: 2PUW)
- Struktura tetrameryczna ze związanym Glc-6-P i UDP-GlcNAc (PDB: 2POC)
- Struktura tetrameryczna ze związanym Fru-6-P i UDP-GlcNAc (PDB: 2PUT)
- Struktura tetrameryczna ze związanym ADMP (analog stanu przejściowego) i UDP-GlcNAc (PDB: 2PUV) (Raczyńska et al. 2007)



Rysunek 5: Domena ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzącej z C. albicans (PDB: 2PUT). Substrat pokazany jest w reprezentacji patyczkowej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Krystaliczna struktura domeny izomerazowej pochodzącej z *C. albicans* składa się reszt aminokwasowych 346-712 (Rysunek 5). Niestety, pewne fragmenty łańcucha nie mogły zostać wymodelowane ze względu na niedostateczną gęstość elektronową, w szczególności jeśli chodzi o dwanaście C-końcowych reszt wchodzących w skład ogona-C (tego fragmentu brakuje we wszystkich łańcuchach i we wszystkich czterech otrzymanych modelach) oraz o fragment undekapeptydowy zawierający His607, jedną z kluczowych reszt zaangażowanych w reakcję katalizy (fragment widoczny w dwóch z czterech łańcuchów modeli ze związanym inhibitorem). Pomimo tego, modele ze związanym inhibitorem otrzymano z rozdzielczością na poziomie 1,9 Å i obecnych jest w nich 94% reszt aminokwasowych (Raczyńska et al. 2007).



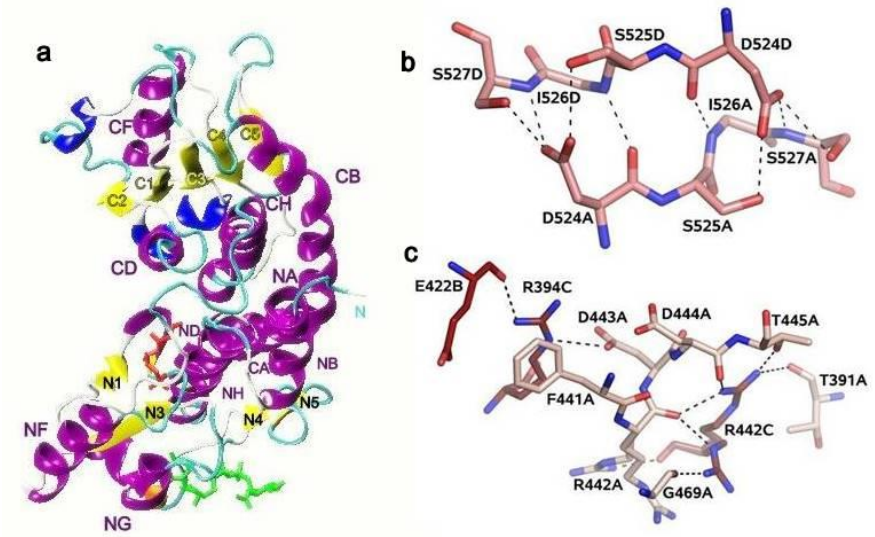
Rysunek 6: Porównanie struktury oligomerycznej syntazy GlcN-6-P pochodzenia prokariotycznego (na górze) i eukariotycznego (na dole). Struktura prokariotyczna pochodzi z PDB: 1JXA, zaś eukariotyczna została wymodelowana na podstawie PDB: 2PUV oraz bakteryjnej domeny glutaminowej w pracowni Modelowania Molekularnego Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej przez dr inż. M. Wojciechowskiego

Struktura czwartorzędowa enzymu eukariotycznego, a zwłaszcza domen izomerazowych, może być opisana jako dimer prokarioto-podobnych dimerów (gdzie łańcuchy A i B tworzą jeden dimer, zaś C i D drugi, jak pokazano na Rysunku 6). Każda z „połówek" odpowiada dimerowi GlmS i składa się z dwóch topologicznie podobnych podjednostek. Monomery każdego dimera oddziałują ze sobą analogicznie do podjednostek w dimerze bakteryjnym (Teplyakov et al. 1998).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Jeśli chodzi o oddziaływania tworzące tetramer, to powierzchnie styku pomiędzy łańcuchami A i D oraz B i C są symetryczne i zawierają pętlę łączącą helisy NH oraz CA z każdego łańcucha. Reszty Asp524 oraz Ser527, wchodzące w skład pętli, uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych (Rysunek 7b). Atomy tlenu karboksylowego reszty asparaginianowej Asp524 oddziałują z grupami hydroksylowymi Ser525 i Ser527 oraz z azotem amidowym Ser527. Reszty 524 i 527 są identyczne we wszystkich znanych sekwencjach eukariotycznych. Reszta Ile526 w niektórych wersjach enzymu eukariotycznego jest zastąpiona przez Val, zaś na miejscu Ser525 w kilku przypadkach występuje Arg. Co ciekawe, w strukturach prokariotycznych odpowiadające fragmenty są zupełnie inne (Raczyńska et al. 2007).

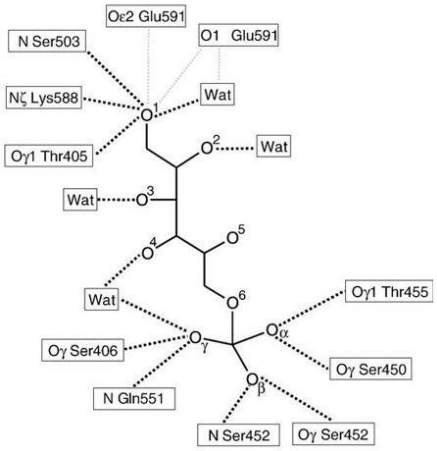
Powierzchnia kontaktu pomiędzy podjednostkami ułożonymi diagonalnie tj. pomiędzy A i C oraz B i D jest również symetryczna. Obejmuje ona łańcuchy boczne Arg394 i Arg442 (Rysunek 7c), oba całkowicie zakonserwowane pomiędzy znanymi sekwencjami eukariotycznymi. Łańcuchy boczne reszt arginylowych wnikają w głąb drugiego łańcucha i są związane wiązaniami wodorowymi z kilkoma atomami tlenu wchodzącego w skład łańcuchów głównych (dotyczy reszt: 391, 442 i 444), grupy hydroksylowej Thr445 (nie zakonserwowana) oraz grupy karboksylowej Asp443 (silnie zakonserwowana). Ponadto, łańcuch boczny Arg394 nakłada się na pierścień aromatyczny zakonserwowanej reszty Phe441. Podobnie jak w przypadku powierzchni styku pomiędzy łańcuchami A i D oraz B i C, również i tu odpowiadające fragmenty w strukturach bakteryjnych są zupełnie inne (Raczyńska et al. 2007).



Rysunek 7: a) Monomer domeny ISOM pochodzącej z C. albicans w reprezentacji wstążkowej. Ligandy: ADMP oraz UDP-GlcNAc są przedstawione jako patyczki, odpowiednio czerwone i zielone. Jon magnezowy pokazany jest jako pomarańczowa kula. b) i c) Specyficzne oddziaływania pomiędzy podjednostkami różnych dimerów: A i D (b) oraz A i C (c) (Raczyńska et al. 2007).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Izomerazowe centrum aktywne jest bardzo podobne do swego bakteryjnego odpowiednika. Pętla zawierająca reszty aminokwasowe 450-455 (347-352 u *E. coli*) otacza grupę fosforanową liganda, umożliwiając wytworzenie wiązań wodorowych z atomami fosforanowych tlenów. Ponadto, podobnie jak dla struktury prokariotycznej, trzy cząsteczki wody wiążą się z grupą fosforanową, tworząc sumarycznie trzy wiązania wodorowe dla każdego z atomów fosforanowego tlenu. Jeśli chodzi o oddziaływania z cukrową częścią związanej cząsteczki, zależą one od rodzaju liganda, aczkolwiek wszystkie uwzględniają obecność cząsteczek wody oraz reszty Glu591. Poniżej przedstawiono sieć oddziaływań wiążących dla fruktozo-6-fosforanu:



Rysunek 8: Schemat oddziaływań Fru-6-P z Gfa1; oddziaływania obecne we wszystkich łańcuchach oznaczono jako czarne przerywane linie, zaś obecne jedynie w niektórych łańcuchach - jako jasnoszare linie (Raczyńska et al. 2007).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.2.3 Porównanie między enzymem prokariotycznym a eukariotycznym

Kompleksowe analizy porównawcze przeprowadzone dla syntaz GlcN-6-P pochodzących różnych organizmów wskazują na ogólną zależność, iż sekwencje łańcuchów polipeptydowych eukariotycznych wersji enzymu są o 70-90 reszt aminokwasowych dłuższe od sekwencji prokariotycznych (Milewski 2002).

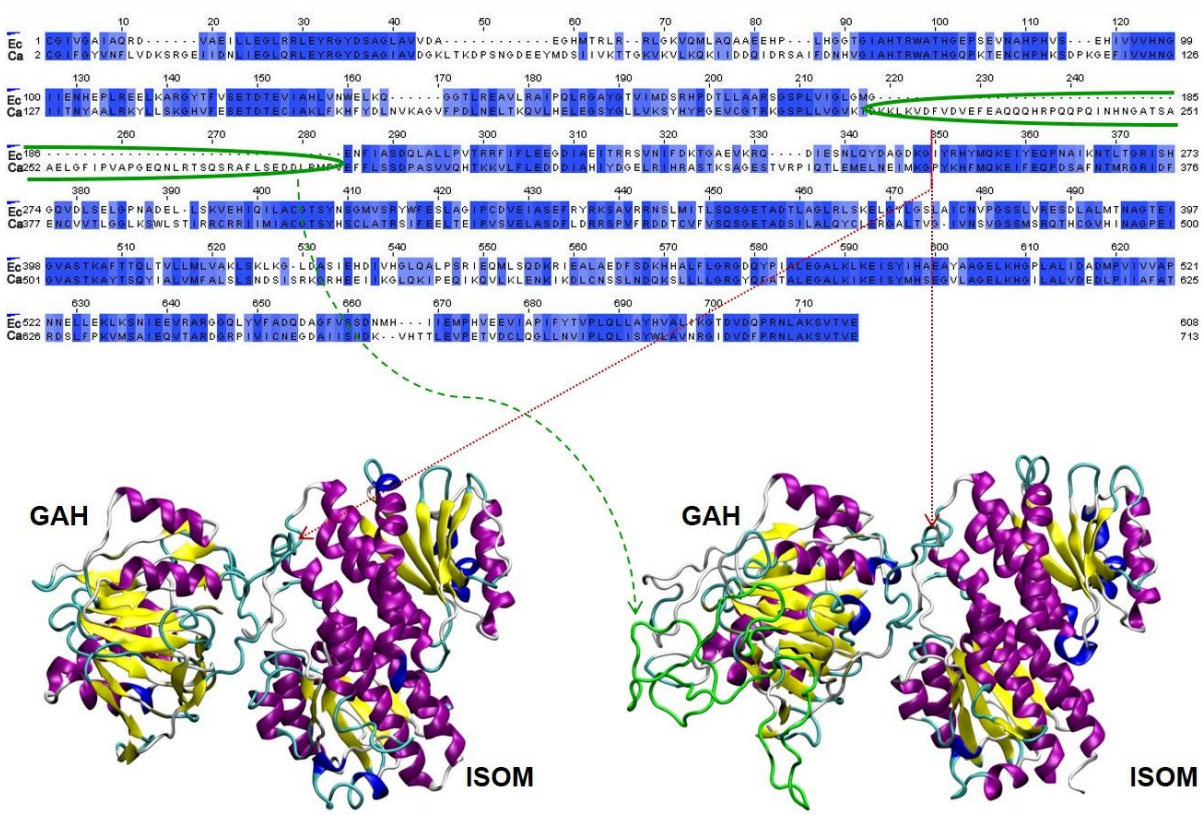
Analiza dopasowania par sekwencji, przeprowadzona przez Milewskiego (Milewski 2002) wykazała co najmniej 31% identyczność sekwencji w obrębie prokariotycznych wersji enzymu i 49% identyczność sekwencji wersji eukariotycznych, podczas gdy porównanie sekwencji homologów bakteryjnych i eukariotycznych wykazało 35-55% identyczności (Durand et al. 2008)

Struktury drugorzędowe domen izomerazowych GlmS i Gfa1 są bardzo podobne, choć Gfa1 posiada dodatkową helisę pomiędzy nicią C3 (reszty 516-519 według numeracji w GlmS) oraz helisą CF (reszty 525-538 według numeracji w GlmS) natomiast nie posiada helis CE oraz CG (Durand et al. 2008; Raczynska et al. 2007).

Choć syntaza pochodzenia eukariotycznego różni się od swojej prokariotycznej wersji kilkoma istotnymi cechami, najważniejsza rozbieżność dotyczy budowy czwartorzędowej: enzym bakteryjny jest dimerem, enzym eukariotyczny zaś tetramerem (Milewski et al. 1999).

Ponadto, nałożenie wielosekwencyjne wykazało, że wersja eukariotyczna białka jest o 50-100 reszt aminokwasowych dłuższa niż jej bakteryjny odpowiednik. Dodatkowy fragment zlokalizowany jest w domenie GAT a jego funkcja, na tę chwilę, nie jest znana. Niektórzy badacze przypuszczają, iż zawiera on reszty aminokwasowe związane z interakcją z UDP-GlcNAc, inhibitorem mającym wpływ jedynie na eukariotyczną wersję enzymu. Nie jest to jednak oczywiste, gdyż długość i skład aminokwasowy tego fragmentu są bardzo różne i nie zawierają żadnych konkretnych, mocno zakonserwowanych reszt.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 9: Porównanie sekwencji aminokwasowej (u góry) oraz struktury trzeciorzędowej (u dołu) podjednostek syntazy GlcN-6-P pochodzącej z E. coli (po lewej) oraz C. albicans (po prawej). Zaznaczono rozgraniczenie pomiędzy domenami (kolor czerwony) oraz fragment obecny jedynie w białku pochodzenia eukariotycznego (kolor zielony) w jednej z możliwych konformacji. Struktura prokariotyczna pochodzi z PDB: 1JXA, zaś eukariotyczna została wymodelowana na podstawie PDB: 2PUV oraz bakteryjnej domeny glutaminowej w pracowni Modelowania Molekularnego Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej przez dr inż. M. Wojciechowskiego.

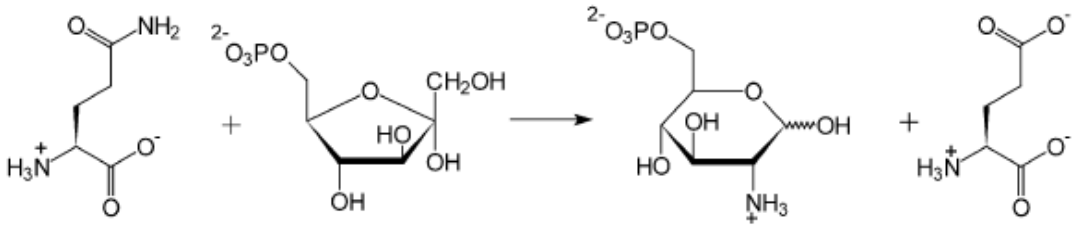
Z drugiej strony, zarówno w domenie ISOM jak i w GAT, obecne są liczne zakonserwowane fragmenty, w tym wszystkie reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie substratu i katalizę, co sugeruje podobny mechanizm katalityczny u porównanych wersji enzymu.

Jeśli chodzi o reszty aminokwasowe zaangażowane w interakcje pomiędzy podjednostkami, to większość z nich jest zakonserwowana w obu wersjach enzymu, aczkolwiek ich wzajemne oddziaływanie jest różne. Durand i współpracownicy sugerują mimo to że, biorąc pod uwagę stopień nieuporządkowania C-końcowego fragmentu białka oraz pętli histydynowej w Gfa1, różnice w interakcji między dimerami pomiędzy prokariotyczną i eukariotyczną wersją enzymu, obserwowane w strukturach krystalicznych, mogą wynikać raczej z formy aktywnej izomerazowego centrum aktywnego w białku prokariotycznym i nieaktywnej formy w tymże centrum w enzymie eukariotycznym niż z różnic wynikających z bakteryjnego bądź eukariotycznego pochodzenia syntazy (Durand et al. 2008).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.3 Mechanizm katalizowanej reakcji

Syntaza GlcN-6-P katalizuje pierwszy i praktycznie nieodwracalny etap szlaku biosyntezy heksozoamin, czyli reakcję przeniesienia reszty aminowej z L-glutaminy na D-fruktozo-6-fosforan z wytworzeniem kwasu L-glutaminowego i D-glukozoamino-6-fosforanu. Jej ogólny przebieg przedstawia schemat poniżej:



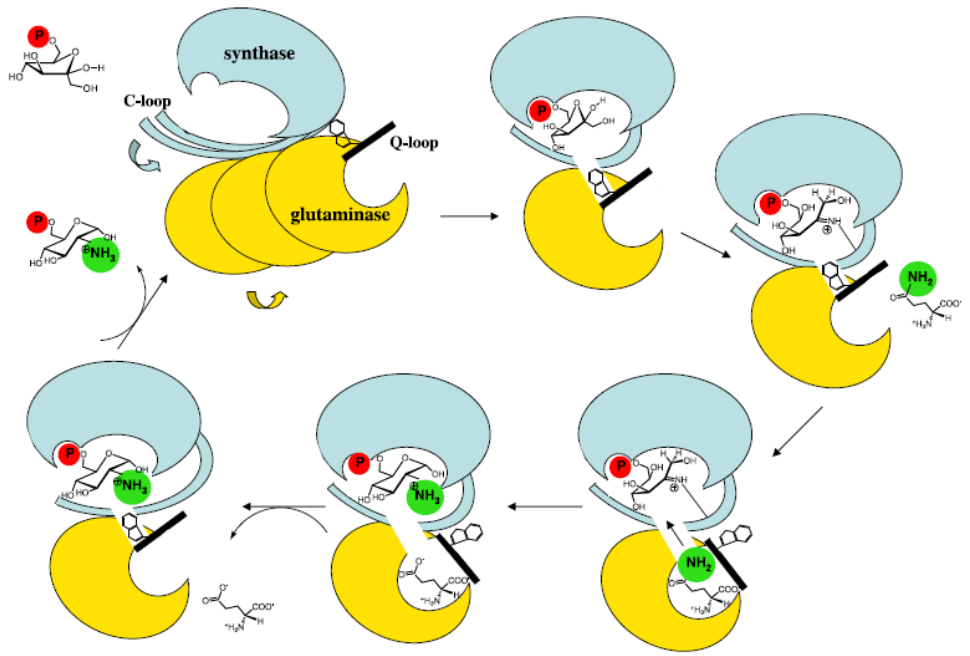
Rysunek 10: Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P (Milewski 2002).

Badania przeprowadzone między innymi w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej wykazały, iż enzym wykazuje całkowitą specyficzność względem L-glutaminy jako donora grupy aminowej i D-fruktozo-6-fosforanu jako jej akceptora.

W kompleksowej reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P można wyróżnić trzy etapy: hydrolizę glutaminy, transfer grupy aminowej na fruktozo-6-fosforan oraz izomeryzację tak utworzonego fruktozoimino-6-fosforanu (Teplyakov et al. 1999). Kolejność wiązania substratów jest ściśle określona: najpierw wiązany jest D-fruktozo-6-fosforan, a w drugiej kolejności L-glutamina (Chmara et al. 1986; Badet et al. 1988) – taki mechanizm zapobiega hydrolizie L-glutaminy w sytuacji, gdy niedostępny jest drugi z substratów, wymaga jednak obecności systemu komunikacji, przenoszącego zmiany konformacyjne zapoczątkowane związaniem Fru-6-P w domenie ISOM za pomocą oddziaływań międzydomenowych do domeny GAT. Obecność takiego mechanizmu przenoszenia sygnału została dowiedziona dla bakteryjnego białka GlmS (Bera et al. 2000). Uwolniony w wyniku hydrolizy L-glutaminy amoniak zostaje następnie przeniesiony do izomerazowego centrum aktywnego, gdzie powstaje GlcN-6-P. Rysunek 11 przedstawia ogólny zarys katalizowanej reakcji.

Należy zauważyć, iż większość informacji na temat mechanizmu przeprowadzanej przez syntazę GlcN-6-P reakcji pochodzi z badań nad enzymem bakteryjnym, prowadzonych głównie przez zespół prof. Badet (Gif-sur-Yvette, Francja). Dzięki intensywnej pracy tej grupy udało się ustalić dokładny mechanizm katalizowanej reakcji dla prokariotycznej syntazy GlcN-6-P.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 11: Schemat reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6-P, dla uproszczenia pokazany dla struktury monomerycznej (Mouilleron et al. 2010)

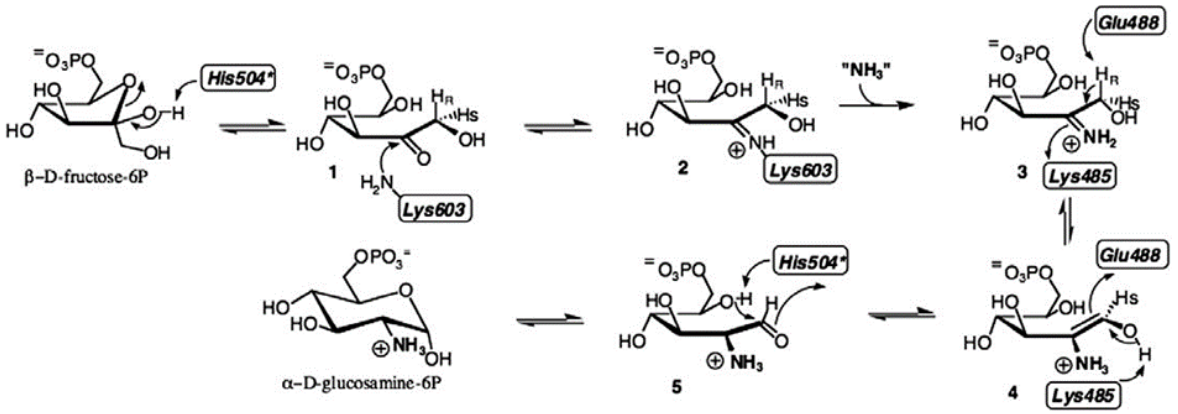
Na temat eukariotycznego enzymu jest o wiele mniej danych, gdyż zarówno izolacja syntazy GlcN-6-P z komórek eukariotycznych jak i otrzymanie postaci krystalicznej kompletnego białka są bardzo kłopotliwe. Ogólnie, mimo istotnych różnic strukturalnych pomiędzy enzymem pochodzenia prokariotycznego a eukariotycznego, różnice w budowie centrów aktywnych oraz mechanizmach katalizy wydają się niewielkie, gdyż wszystkie istotne reszty aminokwasowe biorące udział w katalizowanej reakcji i wiązaniu substratów znajdują się w silnie zakonserwowanych regionach struktury pierwszorzędowej enzymu (Durand et al. 2008). Można jednak dostrzec drobne różnice w strukturze drugorzędowej, będące wynikiem tetramerycznej budowy eukariotycznej wersji enzymu a rzutujące na mechanizm katalizowanej reakcji. Jak zauważyli Raczyńska i in., centrum aktywne w domenie izomerazowej białka pochodzącego z *C. albicans* wydaje się mieć bardziej otwartą konformację niż w przypadku enzymu bakteryjnego (Raczyńska et al. 2007). Podejrzewa się, iż ogon-C jest w tym przypadku bardziej ruchliwy, nie tworzy więc uporządkowanej struktury obserwowalnej dla enzymu z *E. coli*. Ponadto, różnice dotyczą budowy pętli histydynowej, odgrywającej jedną z kluczowych ról w reakcji zachodzącej w domenie ISOM: reszta Pro506$^{\#}$ ($^{\#}$ oznacza przynależność do sąsiedniego monomeru) zastąpiona została Ile609$^{\#}$. Ta substytucja skutkuje zmianą konformacji oraz wzrostem elastyczności pętli histydynowej, nie powoduje jednak zmiany funkcji reszty His607$^{\#}$ (odpowiednika His504$^{\#}$ w enzymie z *E. coli*). Więcej na temat różnic strukturalnych między obiema wersjami enzymu oraz ich konsekwencji dla katalizowanej reakcji będzie można powiedzieć gdy otrzymana zostanie kompletna struktura krystaliczna eukariotycznej syntazy GlcN-6-P.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.3.1 Wiązanie Fru-6-P do domeny izomerazowej

Substratem reakcji katalizowanej przez domenę izomerazową syntazy GlcN-6-P jest fruktozo-6-fosforan, który występuje w postaci mieszaniny dwóch cyklo-furanozydów (β i α) oraz formy liniowej w stosunku 82/16/2 w stanie równowagi (Pierce et al. 1985). Na chwilę obecną nie zostało jednoznacznie wykazane która z form (liniowa czy cykliczna) jest rozpoznawana przez enzym oraz która zostaje związana w centrum aktywnym.

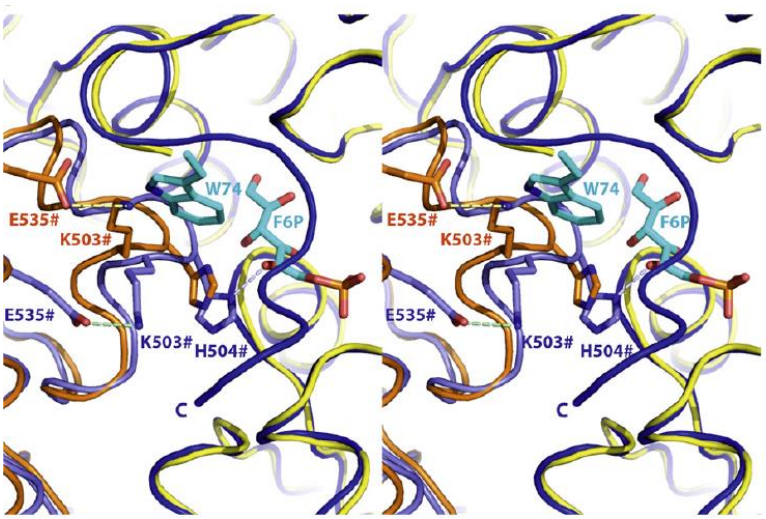
Proponowany mechanizm wiązania i otwierania pierścienia cukrowego, ustalony na podstawie mechanizmu działania innych izomeraz cukrowych oraz analizy struktur krystalicznych prokariotycznego białka GlmS, pokazuje poniższy schemat (struktury 1 i 2).



Rysunek 12: Proponowany przez zespół prof. Badet mechanizm reakcji zachodzącej w domenie ISOM GlmS (Durand et al. 2008)

Miejsce wiążące Fru-6-P w białku GlmS zbudowane jest głównie z ośmiu C-końcowych reszt aminokwasowych wchodzących w skład ogona-C (są to reszty 600-608) oraz z łańcuchów głównych reszt budujących pętlę histydynową, pochodzących z sąsiedniej podjednostki: Lys503$^{\#}$-His504$^{\#}$-Gly505$^{\#}$. Porównanie struktur GlmS w stanie wolnym oraz w kompleksie z substratem cukrowym (Rysunek 13), wykazało, że co najmniej siedem reszt aminokwasowych z ogona-C przyjmuje uporządkowaną formę i zamyka centrum aktywne ze związanym substratem. Liniowe formy cukru, w przeciwieństwie do form cyklicznych, umiejscawiają się głęboko wewnątrz kieszeni wiążącej, wchodząc w bezpośrednie oddziaływania z katalitycznymi resztami: Glu488 oraz Lys485 (Durand et al. 2008).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 13: Zmiany w domenie izomerazowej GlmS zachodzące w wyniku związania substratu cukrowego uwidocznione poprzez nałożenie struktur bakteryjnej domeny ISOM w stanie wolnym (kolor żółty i pomarańczowy) oraz jej kompleksu z Fru-6-P (kolor jasno- i ciemnoniebieski; kolor turkusowy – domena GAT) (Durand et al. 2008).

Przypuszczalnie, po związaniu cyklicznego cukru, zmiany w ułożeniu domeny glutaminowej wywołują zmianę konformacyjną w łańcuchu bocznym Lys503$^{\#}$, która to wzmacnia oddziaływanie pomiędzy ogonem-C a domeną syntazową (Mouilleron et al. 2008). Prowadzi to do otwarcia pierścienia cukrowego przez His504$^{\#}$ poprzez przeniesienie wodoru z atomu tlenu O2 na O5 (a Teplyakov et al. 1999), w wyniku czego pomiędzy Fru-6-P a resztą Lys603 tworzy się zasada Schiffa (Golinelli-Pimpaneau & Badet 1991). Nowo powstały cukier, mający formę liniową, zostaje schowany wewnątrz izomerazowego centrum aktywnego, które poprzez zamknięcie ogonem-C staje się całkowicie niedostępne dla rozpuszczalnika. Rezultatem tego indukowanego przegrupowania jest aktywacja katalitycznej Cys1 (a Teplyakov et al. 1999) a reakcja może przejść do kolejnego etapu.

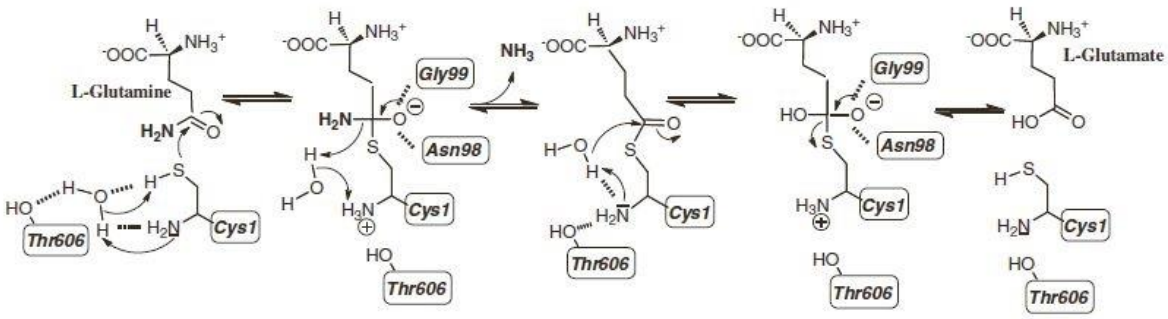
W przypadku białka eukariotycznego, jak już zostało powiedziane wcześniej, mechanizm reakcji jest mniej klarowny. Ponieważ na chwilę obecną znana jest jedynie struktura domeny izomerazowej, wszelkie rozważania oparte są na analizie struktury niekompletnej, co samo w sobie może stanowić źródło obserwowanych rozbieżności.

Raczyńska i inni zauważyli, że dla kompleksu domeny izomerazowej Gfa1, katalityczna reszta His607$^{\#}$ znajduje się poza zasięgiem wiązań wodorowych. Zaobserwowany sposób wiązania cyklicznej formy Glc-6-P nie daje możliwości aby pierścień imidazolowy His607$^{\#}$ związał się analogicznie do mechanizmu zachodzącego w GlmS (Raczyńska et al. 2007). Izomerazowe centrum aktywne, w którego skład w GlmS wchodzą głównie aminokwasy ogona-C oraz pętla histydynowa, nie jest prawidłowo wykształcone w Gfa1. Struktury krystaliczne sugerują, że pętla histydynowa albo jest niewykształcona (nieuporządkowana) albo też przyjmuje konformację zupełnie różną od tej w GlmS. Co więcej, cały ogon-C i pięć poprzedzających go reszt aminokwasowych, mają nieuporządkowaną konformację w każdej z podjednostek wszystkich analizowanych struktur. Sugeruje to, iż, w białku eukariotycznym, usztywnienie ogona-C jest konieczne do odpowiedniego ułożenia cukru w centrum aktywnym, co umożliwi katalitycznej histydynie otwarcie pierścienia cukrowego (Durand et al. 2008).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

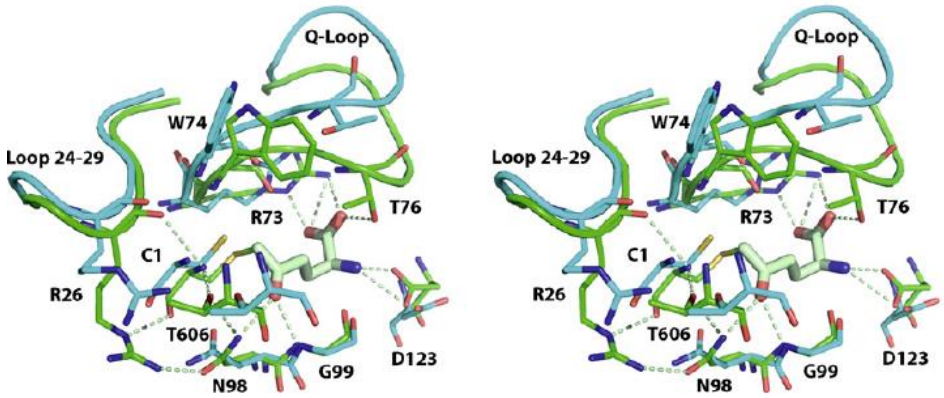
I.1.3.2 Hydroliza glutaminy

Mechanizm hydrolizy glutaminy, przedstawiony na Rysunku 14, zaproponowany w 1996 roku przez Isupova i in., opiera się na analizie struktury krystalicznej kompleksu enzymu z jego glutaminowym substratem (Isupov et al. 1996).



Rysunek 14: Proponowany przez zespół prof. Badet mechanizm reakcji zachodzącej w domenie GAT GlmS (Mouilleron et al. 2010).

Cały proces zostaje aktywowany poprzez prawidłowe ustawienie względem siebie reszt Cys1 i Asn98, o czym wspomniane zostało w poprzednim podrozdziale. Grupa tiolowa Cys1, początkowo skierowana przeciwnie do centrum aktywnego, musi ulec rotacji o 180° wzdłuż osi wiązania Cα–C i o około 120° wzdłuż osi wiązania Cα–Cβ, aby przyjąć konformację aktywną i umożliwić atomowi siarki zajęcie pozycji, w której możliwy jest jego atak na węgiel amidowy glutaminy. Z drugiej strony, łańcuch boczny Asn98, związany wiązaniem wodorowym z grupą aminową Cys1, musi ulec rotacji o około 100° aby, wspólnie z Gly99, utworzyć niszę oksyanionową stabilizującą tetraedryczny stan przejściowy reakcji. Tlen amidowy z glutaminy zostaje następnie związany wiązaniami wodorowymi z grupą aminową z łańcucha bocznego Asn98 oraz z grupą aminową Gly99. Obie te reszty aminokwase są zresztą zakonserwowane we wszystkich amidotransferazach glutaminowych typu purF (Isupov et al. 1996).



Rysunek 15: Zmiany w bakteryjnej domenie GAT zachodzące w wyniku związania glutaminy, uwidocznione poprzez nałożenie struktur kompleksu bakteryjnej domeny GAT z Fru-6-P (kolor turkusowy) oraz z Glc-6-P i DON (kolor zielony) (Durand et al. 2008).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Związanie glutaminy indukuje zmiany konformacyjne w obrębie centrum aktywnego, które pokazane zostały na Rysunku 15. Kieszeń wiążąca substrat zostaje zamknięta dwiema pętlami: pętlą Q tworzącą „wieko" (reszty 73-81) oraz pętlą złożoną z reszt 121-125, co umożliwia hydrolizę związanej cząsteczki oraz zapobiega utracie amoniaku uwolnionego w reakcji (Isupov et al. 1996; Teplyakov et al. 2001). Prawidłowe związanie glutaminy wewnątrz kieszeni wiążącej zapewnia obecność wiązań wodorowych pomiędzy grupą α-karboksylową substratu a Arg73 oraz pomiędzy grupą α-aminową substratu i Asp123 (Mouilleron et al. 2006). Ponadto, grupa hydroksylowa reszty aminokwasowej Thr606, należącej do ogona-C, zmienia swe położenie tak aby utworzyć wiązanie wodorowe z grupą α-aminową Cys1. To przegrupowanie wzmacnia zasadowość terminalnej grupy α-aminowej, która pełni rolę odczynnika nukleofilowego i indukuje deprotonację grupy tiolowej Cys1 poprzez działającą na zasadzie przekaźnika cząsteczkę wody. Tak utworzony nukleofilowy tiolan może przypuścić atak na amidowy atom węgla substratu, w wyniku czego powstaje oksyanionowy, tetraedryczny produkt przejściowy (Durand et al. 2008). Produkt ten rozpada się z wytworzeniem γ-glutamylotioestru i amoniaku, na który przeniesiony zostaje proton z leżącej pomiędzy nimi cząsteczki wody. Amoniak zostaje uwolniony i przeniesiony do centrum aktywnego akceptora, zaś deacetylacja acetyloenzymu następuje w wyniku ataku nukleofilowego innej cząsteczki wody (Floquet et al. 2007).

Jak podkreślają w swych artykułach m.in. Durand i in., aktualny stan wiedzy nie pozwala na definitywne wyjaśnienie sposobu aktywacji hydrolizy glutaminy zainicjowanej związaniem cząsteczki akceptora, nawet dla dobrze poznanego białka prokariotycznego. Tym niemniej, wysoce prawdopodobny wydaje się dwuetapowy proces aktywacji przy udziale ligandów domeny izomerazowej oraz glutaminy, podobny do mechanizmu proponowanego dla enzymu syntazy glutaminianowej (Dossena et al. 2007; Durand et al. 2008).

Jeśli chodzi o białko eukariotyczne, na chwilę obecną dostępna jest bardzo skąpa ilość informacji na temat zachodzącej w nim reakcji. Struktura krystaliczna domeny GAT pochodzącej z *C. albicans* nie została jeszcze otrzymana, zaś dla białka pochodzenia ludzkiego, hGfat1, odnotowano aktywację hydrolizy glutaminy zarówno przez Fru-6-P jak i GlcN-6-P oraz GlcNAc-6-P (Floquet, Durand, Maigret, Badet, Marie Ange Badet-Denisot, et al. 2009). Tym niemniej, nadal nie wiadomo czy występowanie tego zjawiska zależy od rodzaju liganda czy też jest konsekwencją związania jakiejkolwiek cząsteczki w centrum aktywnym (Durand et al. 2008).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.3.3 Transfer grupy aminowej

Mechanizm hydrolizy glutaminy był jeszcze przed kilku laty przedmiotem sporu naukowców i podzielił ich na zwolenników dwóch alternatywnych hipotez, różniących się sposobem zapoczątkowania transferu atomu azotu: „uwolnienia amoniaku" (ang. *amonia release*) i „skoordynowanego ataku" (ang. *concerted attack*). Dla enzymu prokariotycznego, wątpliwości zostały rozwiane dzięki opublikowanym na przełomie XX i XXI badaniom grupy prof. Badeta (Durand et al. 2008; Floquet et al. 2009; Teplyakov et al. 1998; Teplyakov et al. 2001), jednoznacznie potwierdzającym istnienie hydrofobowego kanału między oddalonymi od siebie o około 20 Å domenami syntazową i izomerazową bakteryjnej syntazy GlcN-6-P.

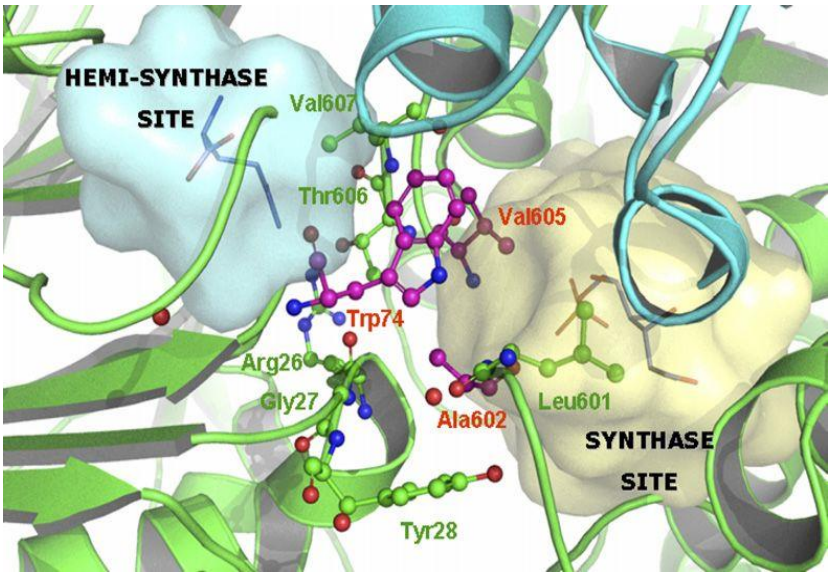
Zajście niżej opisanego mechanizmu „uwolnienia amoniaku" możliwe jest dzięki obecności niedostępnego dla rozpuszczalnika kanału, który łączy obie domeny i umożliwia transfer amoniaku pomiędzy nimi. Jego hydrofobowy charakter pozwala na uniknięcie sprotonowania uwolnionego amoniaku i podtrzymanie jego nukleofilowego charakteru (Durand et al. 2008).

Zaproponowany przez Teplyakova i in. mechanizm uwzględnia udział reszt 596-608 (w tym ogona-C) w budowie takiego kanału u *E. coli* (Rysunek 16) oraz sugeruje kluczową rolę pierścienia indolowego Trp74, który funkcjonujące jako „brama" wewnątrz kanału, blokująca go od strony domeny GAT (Durand et al. 2008; Teplyakov et al. 2001; Floquet et al. 2009). Przesunięcie reszty Trp74 otwiera kanał, pozostający dotychczas w konformacji zamkniętej, umożliwiając tym samym transport amoniaku, wspomagany resztami Ala602 i Val605 (Floquet et al. 2007).

Warto wspomnieć, iż nie zaobserwowano istnienia kanału amoniakowego w strukturze GlmS w stanie wolnym, dla której to pętla tworzona przez ogon-C jest nie jest uformowana. Powstanie kanału zainicjowane jest dopiero związaniem substratu cukrowego i odpowiednim ustawieniem reszt Trp74 oraz Arg26 (Durand et al. 2008).

Należy tu podkreślić, że ze względu na różnice w budowie białka prokariotycznego i eukariotycznego, mechanizm hydrolizy glutaminy poprzez enzym eukariotyczny nadal jest tematem dyskusyjnym. Badania przeprowadzone przez Olchowego i in. dla białka pochodzącego z *C. albicans* pozwoliły na zaproponowanie podobnej struktury kanału oraz roli Trp97 (analogu Trp74) jako jego „bramy" (Olchowy et al. 2007). Nie wiadomo dokładnie w jaki sposób cząsteczka amoniaku przechodziłaby przez kanał, aczkolwiek badania przeprowadzone metodami dynamiki molekularnej sugerują wpływ elastyczności kluczowych fragmentów struktury oraz znaczącą rolę dwóch cząsteczek wody znalezionych w kanale (Amaro & Luthey-Schulten 2004; Amaro et al. 2005).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 16: Reszty aminokwasowe tworzące kanał amoniakowy pomiędzy domenami, pokazane na strukturze GlmS. Powierzchnia oznaczona kolorem niebieskim należy do centrum aktywnego domeny GAT, zaś kolorem żółtym – do centrum aktywnego domeny ISOM ; reszty tworzące kanał opisano kolorem zielonym i czerwonym (Floquet et al. 2007)

I.1.3.4 Izomeryzacja fruktozoimino-6-P do GlcN-6-P

Po przejściu przez kanał, amoniak zostaje przeniesiony na przypuszczalnie aktywowaną liniową formę Fru-6-P, w konsekwencji czego powstaje fruktozoimino-6-fosforan, produkt addycji grupy ketonowej Fru-6-P oraz grupy ε-aminowej reszty Lys603 (Golinelli-Pimpaneau & Badet 1991). Fruktozoimino-6-fosforan odłącza się następnie od kowalencyjnie związanej Lys603 by, w ostatnim stadium reakcji, zostać poddany izomeryzacji do glukozamino-6-fosforanu. W ten mechanizm zaangażowane są reszty Glu488 oraz Lys485 (Durand et al. 2008).

Reakcja izomeryzacji rozpoczyna się oderwaniem protonu *pro*-R od węgla C1 frutozoimino-6-fosforanu, w wyniku czego powstaje *cis*-enolamina. Dzieje się to przy udziale Glu488, jednocześnie zaś reszta His504$^{\#}$ zamyka pierścień. W następnej kolejności dochodzi do przyłączenia protonu od strony *re* węgla C2 *cis*-enolaminy, co w rezultacie prowadzi do powstania glukozamino-6-fosforanu (Milewski et al. 1999) (Rysunek 12). Uwolnienie produktu w postaci cyklicznej piranozy następuje w wyniku odsunięcia się „wieka" tworzonego przez ogon-C oraz reszt Lys485, Lys603 oraz His504$^{\#}$ od centrum aktywnego.

W wyniku otwarcia izomerazowego centrum aktywnego, do kanału dostaje się cząsteczka wody, transportowana do domeny glutaminowej i wykorzystywana do uwolnienia kwasu glutaminowego (Badet et al. 1988; Golinelli-pimpaneau & Badet 1991; Teplyakov et al. 1998; A. Teplyakov et al. 1999; Mouilleron et al. 2006).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.1.4 Regulacja aktywności enzymu

Syntaza GlcN-6-P pełni kluczową rolę w procesie biosyntezy aminocukrów we wszystkich znanych organizmach, musi więc podlegać ścisłej i precyzyjnej regulacji. Niemniej jednak, natura i mechanizm kontroli aktywności różnią się między sobą w zależności od organizmu gospodarza (Durand et al. 2008).

I.1.4.1 Regulacja w organizmach prokariotycznych

Istnienie mechanizmu precyzyjnej regulacji prokariotycznej syntazy GlcN-6-P wydaje się oczywiste ze względu na rolę tego enzymu w biosyntezie składników bakteryjnej ściany komórkowej.

Regulacja na poziomie transkrypcji i translacji (potranslacyjna)

Syntaza GlcN-6-P pochodzenia bakteryjnego podlega kontroli aktywności na kilku poziomach, aczkolwiek główny mechanizm regulacji oparty jest na regulacji ekspresji genu *glmS*, kodującego białko GlmS.

W komórkach *E. coli*, GlmS, tak jak i inne enzymy szklaku biosyntezy heksozoamin, kodowane są przez operon *glmUS*. Dwa promotory tego operonu zlokalizowane są powyżej sekwencji genu *glmU*, kodującego białko GlmU odpowiedzialne za przekształcanie GlcN-1-P kolejno do GlcNAc-1-P i do UDP-GlcNAc. Dowiedziono, że geny *glmU* i *glmS* są w ścisłej koekspresji (Plumbridge & Kolb 1995). Mechanizm regulacji jest bardzo złożony i na chwilę obecną nie wszystkie jego aspekty zostały jednoznacznie wyjaśnione. Wiadomo jednak, iż w komórkach *E. coli*, w regulację zaangażowane są czynniki post-transkrypcyjne regulonu N-acetyloglukozaminowego (Kalamorz et al. 2007; Urban et al. 2007), zaś u bakterii Gram-dodatnich, takich jak *B. subtilis* – przełączniki rybozymowe (tzw. ryboprzełączniki) (Winkler et al. 2004; Winkler & Breaker 2005; Klein & Ferré-D'Amaré 2006; Barrick et al. 2004).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Regulacja poprzez końcowe produkty biosyntezy

Kucharczyk i in. dowiedli, iż bakteryjna syntaza GlcN-6-P podlega inhibicji przez produkt katalizowanej przez siebie reakcji, glukozamino-6-fosforan, aczkolwiek dopiero w stężeniach rzędu milimoli (K_i = 0,35 mM) (Kucharczyk et al. 1990). Choć jest to cecha wspólna wszystkich prokariotycznych syntaz GlcN-6-P, nie wydaje się aby miała ona znaczenie fizjologiczne (Teplyakov et al. 2001). Produkt katalizowanej przez GlmS reakcji jest natychmiast przetwarzany do GlcN-1-P przez kolejny z enzymów uczestniczących w szlaku lub też inicjuje mechanizmy regulacji na poziomie ekspresji, zapobiegając w ten sposób akumulacji GlcN-6-P do poziomu wywołującego inhibicję.

Inną cechą wspólną enzymów pochodzenia bakteryjnego jest natomiast brak inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc, końcowego produktu szlaku biosyntezy heksozoamin (Buse 2006; Kornfeld 1967). Należy tu wspomnieć jednak, że jakiś czas temu pojawiła się dotychczas niepotwierdzona sugestia, iż domena izomerazowa enzymu prokariotycznego zawiera miejsce regulatorowe (Todorova 2001).

I.1.4.2 Regulacja w organizmach eukariotycznych

Podobnie jak w przypadku białka prokariotycznego, aktywność enzymatyczna eukariotycznej syntazy GlcN-6-P może być regulowana na kilku poziomach. Biorąc pod uwagę stopień zakonserwowania kluczowych reszt katalitycznych wśród znanych sekwencji syntazy GlcN-6-P, jest bardzo prawdopodobne, że mechanizmy zachodzące u eukariotów są analogiczne do tych zachodzących w komórkach prokariotycznych. Tym niemniej, dwie istotne cechy odróżniają obie wersje enzymu: podatność na inhibicję pod wpływem UDP-GlcNAc oraz obecność dodatkowego fragmentu w białku eukariotycznym. W świetle potencjalnych zastosowań terapeutycznych syntazy GlcN-6-P, poznanie metod kontroli jej aktywności nabiera szczególnego znaczenia.

Regulacja na poziomie transkrypcji i translacji

Do dnia dzisiejszego odkryto kilka przykładów regulacji ekspresji genu kodującego eukariotyczną syntazę GlcN-6-P na poziomie transkrypcji. W komórkach ssaczych, a przynajmniej mysich i ludzkich, występują dwa geny kodujące enzym: *gfat1* i *gfat2* (Oki et al. 1999; Yamazaki et al. 2000; Sayeski et al. 1997). Liczne dowody wskazują, że ich ekspresja jest w dużym stopniu zależna od rodzaju tkanek (Yki-Jarvinen et al. 1999) a wpływ na jej regulację mogą mieć pewne czynniki wzrostu. W komórkach drożdżowych natomiast, ekspresja genu *gfa* jest spotęgowana działaniem czynnika α (feromonu płciowego) w komórkach haploidalnych (Zalkin 1993). Wiadomo również, iż na regulację ekspresji genu *gfa* w komórkach drożdżowych może mieć wpływ fosfataza Glc7p (Zheng et al. 2000).

Pojawiły się doniesienia że w regulacji ekspresji genów uczestniczyć mogą, wzorem komórek prokariotycznych, ryboprzełączniki (Sudarsan et al. 2003).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Regulacja poprzez potranslacyjną fosforylację

Eukariotyczna syntaza GlcN-6-P podlega również regulacji poprzez potranslacyjną fosforylację. Analiza dostępnych struktur pierwszorzędowych wykazała istnienie znaczącej liczby miejsc potencjalnej fosforylacji dla różnych kinaz białkowych, takich jak: cAMP-zależna kinaza A (PKA), kinaza aktywowana 5'AMP (AMPK) oraz Ca^{2+}/kalmodulino-zależna kinaza II (CaMKII). Fosforylowane są wyłącznie reszty serynowe, różne w zależności od organizmu gospodarza oraz typu fosforylującego enzymu. Przykładowo, dla *C. albicans* zidentyfikowano jednoznacznie Ser208 jako miejsce fosforylacji przez PKA, zaś dla enzymu pochodzenia ludzkiego są to: Ser205, Ser235 i Ser243 (Durand et al. 2008).

Odnotowano co najmniej trzy możliwe zmiany, jakie zachodzą w syntazie GlcN-6-P pod wpływem fosforylacji:

- Enzymy pochodzące z *C. albicans, Drosophila melanogaster* oraz komórek szczurzej wątroby zwiększają swą aktywność (Milewski et al. 1999; Zhou et al. 1998; Marshall 2006).
- Aktywność enzymu pochodzenia ludzkiego, fosforylowanego *in vitro* przez PKA, ulega zahamowaniu (Chang et al. 2000).
- W enzymie pochodzącym z wodnego grzyba *B. emmersonii*, ulega modyfikacji wrażliwość na inhibicję poprzez sprzężenie zwrotne (Frisa & Sonneborn 1982; Etchebehere & da Costa Maia 1989).

W syntazie GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans* konsekwencją fosforylacji Ser208 przez PKA jest stymulacja aktywności amidohydrolazowej domeny *GAT*, co z kolei wpływa na szybkość reakcji katalizowanej przez cały enzym. Co ciekawe, analogiczne miejsca fosforylacji zostały wyodrębnione również dla enzymów pochodzenia mysiego oraz ludzkiego (Milewski et al. 1999; Gabriel et al. 2004; Olchowy et al. 2007).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Regulacja poprzez końcowy produkt szlaku biosyntezy – inhibicja poprzez UDP-GlcNAc

W przypadku eukariotycznej syntazy GlcN-6-P, ważniejszym od innych sposobem regulacji wydaje się być inhibicja poprzez sprzężenie zwrotne. W warunkach in vitro, UDP-GlcNAc, końcowy produkt cytoplazmatycznej biosyntezy zapoczątkowanej przez syntazę GlcN-6-P, jest stosunkowo silnym i specyficznym inhibitorem enzymu. Jego stężenie hamujące (ang. *inhibitory concentration*) IC_{50} wynosi 0,67 mM (Raczyńska et al. 2007).

Wartości stałej inhibicji K_i są mocno zróżnicowane - odnotowane wartości wahają się od 6 μM dla enzymu z wątroby szczura, do 0,7 mM dla syntazy GlcN-6-P z *C. albicans* (Kornfeld 1967; Milewski, Kuszczak, Jedrzejczak, Smith, a J. Brown, et al. 1999). Co więcej, eukariotyczne enzymy wyizolowane z różnych źródeł różnią się typem inhibicji. UDP-GlcNAc hamuje enzym z komórek szczurzej wątroby kompetycyjnie względem Fru-6-P i niekompetycyjnie względem glutaminy (Winterburn & Phelps 1971). Identyczna sytuacja zachodzi dla komórek pochodzących z *Blastocladiella emersonii* (Maia 1994). W przypadku *C. albicans* i *Neurospora crassa*, inhibicja jest niekompetycyjna względem obu substratów (Milewski et al. 1999; Endo et al. 1970), podczas gdy dla *Aspergillus nidulans* enzym hamowany jest akompetycyjnie (Borgia 1992).

Jako że dimeryczny enzym prokariotyczny nie podlega regulacji przez UDP-GlcNAc, miejsce wiążące UDP-GlcNAc wydaje się być cechą charakterystyczną tetramerycznej formy syntazy GlcN-6-P (Milewski 2002).

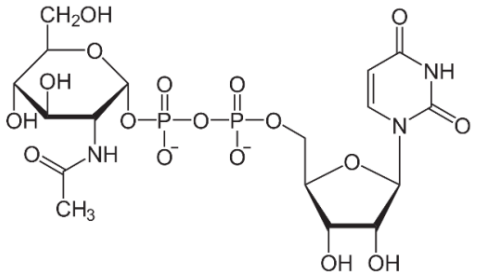
Liczne źródła donoszą, że wrażliwość enzymu na UDP-GlcNAc spada wraz ze stopniem oczyszczenia białka. To zjawisko może być konsekwencją usunięcia cząsteczek o niskiej masie molekularnej. Wykazano bowiem, że obecność niektórych fosforanów cukrów (szczególnie Glc-6-P) wpływa na wrażliwość syntazy GlcN-6-P na UDP-GlcNAc. Większość doniesień sugeruje zależność wprost proporcjonalną (Miyagi & Tsuiki 1971), aczkolwiek badania Touriana i in. wykazały bezpośredni wpływ hamujący na enzym pochodzący z ludzkich fibroblastów (Tourian et al. 1983).

Szacuje się, że miejsce wiązania inhibitora położone jest ok. 10 Å od miejsca aktywnego domeny ISOM (Raczyńska et al. 2007). Reszty odpowiedzialne za wiązanie inhibitora są zakonserwowane wśród wszystkich eukariotycznych sekwencji.

Warto w tym momencie zauważyć, że dwie z tych reszt: Gly474 i Gly490, w strukturze GlmS zastąpione są resztami alanylowymi, co podkreśla istotność tych aminokwasów dla wiązania liganda. Sztywność reszt alanylowych w połączeniu z ich masywnością nie pozwoliłyby na związanie UDP-GlcNAc do GlmS. Ponadto, pętla 381-388 wiążąca fosforan i pierścień rybozowy w Gfa1, ma zupełnie inną konformację w GlmS (Rysunek 18b) (Durand et al. 2008).

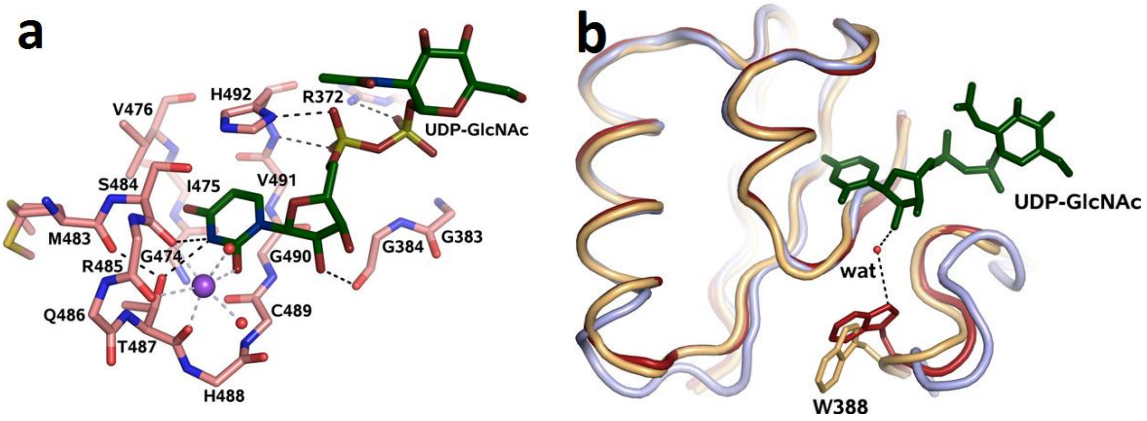
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W budowie UDP-GlcNAc, przestawionej na Rysunku 17, można wyróżnić dwie części: uracylową oraz glukozaminową. W miejscu wiązania tylko pierwsza z nich oddziałuje z resztami budującymi kieszeń, podczas gdy druga skierowana jest na zewnątrz białka (Durand et al. 2008).



Rysunek 17: Struktura UDP-GlcNAc

Prawdopodobny mechanizm inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc zakłada, że związanie liganda powoduje pewne przekształcenia struktury enzymu, które utrudniają podejście substratu do centrum aktywnego, lub też jego stabilizację w miejscu wiążącym, co w obu przypadkach uniemożliwia prawidłowe działanie syntazy. Badania eksperymentalne przeprowadzone przez Olchowego i in. na białku Gfa1 sugerują, że związanie UDP-GlcNAc indukuje zmiany konformacyjne w domenie ISOM, które w wyniku bliżej nieokreślonych oddziaływań międzydomenowych przekazywane są do domeny GAT i prowadzą do zahamowania aktywności amidohydrolitycznej białka (Olchowy et al. 2007).



Rysunek 18: a) Reszty biorące udział w wiązaniu UDP-GlcNAc do domeny ISOM. Wiązania wodorowe pomiędzy inhibitorem a białkiem oznaczono czarnymi przerywanymi liniami, zaś wiązania wodorowe jonu metalu (fioletowa kula) przerywanymi liniami koloru szarego. b) Nałożenie trzech wersji domeny ISOM: eukariotycznej w stanie wolnym (kolor żółty), eukariotycznej związanej z UDP-GlcNAc (kolor czerwony, ligand jako zielone patyczki) oraz prokariotycznej (kolor niebieski) (Raczyńska et al. 2007).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Mechanizm wiązania UDP-GlcNAc oraz jonu magnezu (w oddziaływaniach białka z inhibitorem bierze udział sześciokoordynowany jon metalu, prawdopodobnie magnezu albo sodu został opisany przez Raczyńską i in. (Raczyńska et al. 2007). Uracylowa część cząsteczki idealnie wpasowuje się w kieszeń wiążącą, znajdującą się na powierzchni białka, uformowaną przez strukturę drugorzędową βαβαβ. Dno tej kieszeni zbudowane jest z reszt Gly474 i Val476, zaś jej ściany tworzą: Ser484, łańcuch boczny Thr487, łańcuch główny reszt 489-491 oraz His492 (Rysunek 18a). Ściana kieszeni zbudowana z reszt 489-491 (w tym Gly490) jest niemalże płaska. Powierzchnia utworzona przez atomy od Cα reszty 489 do Cα reszty 491, jest równoległa do płaskiej powierzchni pierścienia uracylowego, zaś pomiędzy pierścieniem aromatycznym i dwoma wiązaniami peptydowymi występują niekowalencyjne oddziaływania przyciągające typu pi-pi (ang. *stacking interactions*). Reszty tworzące miejsce wiązania inhibitora są zakonserwowane wśród większości eukariotycznych enzymów Gfa1p (Raczyńska et al. 2007). Atom N3 uracylowej części inhibitora tworzy dwa wiązania wodorowe: z grupą hydroksylową Thr487 oraz z tlenem karbonylowym Ser484. Rola Thr487 jako akceptora wiązania wodorowego od N3 jest konsekwencją obecności innego wiązania wodorowego, utworzonego pomiędzy resztą Met483 i atomem wodoru hydroksylowego Thr487. Dodatnio naładowane środowisko zapewnia Arg372, zaś w strukturze enzymu bez związanego UDP-GlcNAc, ładunek neutralizuje jon chlorkowy.

Porównanie struktur domeny ISOM w stanie wolnym oraz ze związanym inhibitorem, które przeprowadziła Raczyńska i in., wykazało jedynie nieznaczną zmianę konformacyjną mającą miejsce na skutek związania UDP-GlcNAc, i to mającą miejsce w bliskim sąsiedztwie liganda. Grupy fosforanowe oraz pierścień rybozowy zostały połączone pętlą zbudowaną z reszt 381-388, zaś łańcuch boczny końcowego Trp388 uległ przemieszczeniu względem enzymu w stanie wolnym na skutek kontaktu z tlenem O2 rybozy. Kontaktowi temu pośredniczy cząsteczka wody (Rysunek 18b) (Raczyńska et al. 2007).

Regulacja przez sprzężenie zwrotne, zachodząca pod wpływem UDP-GlcNAc, której podlega jedynie syntaza z komórek eukariotycznych, jest jedną z najistotniejszych różnic pomiędzy syntazą GlcN-6-P wyizolowaną z organizmów prokariotycznych a enzymem pochodzenia eukariotycznego (Kornfeld 1967; Winterburn & Phelps 1971). Różnice konsekwencyjne między eukariotycznymi komórkami grzybowymi a ludzkimi, które mogą być podstawą selektywnej toksyczności inhibitorów syntazy GlcN-6-P, czynią z tego enzymu wyjątkowo kuszący cel molekularny dla poszukiwań chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych.

Wytyczne do projektowania inhibitorów syntazy GlcN-6-P, oddziałujących z enzymem w miejscu wiązania UDP-GlcNAc, mogą zostać uzyskane przy zastosowaniu metod obliczeniowych, w tym modelowania molekularnego.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.2 Metody obliczeniowe w modelowaniu molekularnym

I.2.1 Modelowanie molekularne, najważniejsze zalety i ograniczenia komputerowych metod analizy

Według definicji, modelowanie molekularne polega na komputerowym tworzeniu modeli cząsteczek chemicznych, za pomocą których opisuje się lub przewiduje rzeczywiste własności fizykochemiczne molekuł (Schlick 2010).

Modelowanie molekularne jest cenionym przez naukowców narzędziem, wykorzystywanym na wielu obszarach badań strukturalnych, z których najważniejsze dotyczą:

- Oddziaływań międzycząsteczkowych
- Dynamicznych właściwości cząsteczek lub ich zespołów
- Wpływu środowiska na strukturę związku
- Pól siłowych i energetycznych generowanych przez cząsteczkę
- Przewidywania trójwymiarowej struktury związków chemicznych

Oprócz ustalania najtrwalszej konformacji danej cząsteczki i symulowania jej zachowania w określonych warunkach, modelowanie molekularne jest pomocne przy uściślaniu struktur cząsteczek – na przykład białek – określonych metodami eksperymentalnymi takimi jak krystalografia czy magnetyczny rezonans jądrowy.

Kolejnym popularnym zastosowaniem metod modelowania molekularnego jest przeszukiwanie wirtualne (zwane również screeningiem wirtualnym, z ang. *virtual screening,* VS), szeroko stosowane w podejściu badawczym określanym mianem racjonalnego projektowania chemoterapeutyków. Technika VS pozwala zawęzić pole poszukiwać nowych potencjalnych związków aktywnych, wyodrębniając spośród licznych możliwych modyfikacji znanych już substancji tylko te, które dają nadzieję na sukces. Modelowanie molekularne pozwala zatem ograniczyć drogą i kłopotliwą syntezę potencjalnych chemoterapeutyków. Przewidując wzajemne ułożenie cząsteczek w kompleksach, oddaje również nieocenione usługi przy projektowaniu całkiem nowych leków, oddziałujących z receptorami komórkowymi w ściśle zaplanowany sposób (Schlick 2010).

W modelowaniu molekularnym można wydzielić dwie grupy technik:

- Metody chemii obliczeniowej (ang. *computational chemistry*)
- Środowisko graficzne (ang. *molecular graphics*)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Metody chemii obliczeniowej pozwalają przewidzieć właściwości cząsteczki i jej zachowanie w danym środowisku, zgodnie z podstawowymi prawami fizycznymi. Dla niewielkich cząsteczek, właściwości te można co prawda przewidywać przy użyciu równań mechaniki kwantowej - są to tzw. metody *ab initio* – ale choć obliczenia tą drogą dają znacznie dokładniejsze wyniki, wymagają ogromnych mocy obliczeniowych. Przykładowo, efektywność obliczeń energii dla peptydu złożonego ze 126 reszt aminokwasowych różni się pomiędzy metodami chemii kwantowej a metodami empirycznymi o cztery rzędy wielkości. Różnica ta rośnie wraz ze wzrostem złożoności układu, dlatego też symulacje oparte na metodach *ab initio* ograniczają się do kilkunastu atomów w stanie równowagi, a obliczenia dla każdego bardziej złożonego układu w mniejszym lub większym stopniu przeprowadzane są przy pomocy metod empirycznych, na których oparte są właśnie techniki modelowania molekularnego. Z kolei środowisko graficzne umożliwia przełożenie wyników obliczeń, otrzymanych najczęściej w postaci rzędów cyfr, na graficzne odwzorowanie, ułatwiające wizualną analizę wyników i pozwalające na uwidocznienie wielu ich właściwości wynikających ze wzajemnych oddziaływań poszczególnych elementów analizowanych układów. Stąd też rozwój technik modelowania molekularnego – związanego nieodzownie z komputerem jako narzędziem pracy – nastąpił równolegle z rozwojem technik informatycznych oraz systematycznym zwiększaniem mocy obliczeniowej komputerów.

Dostępnych jest wiele komercyjnych i niekomercyjnych programów do modelowania molekularnego i wizualizacji struktur. Wśród nich najpopularniejszymi są: AMBER, TINKER, GAUSSIAN, CHARMM, SYBYL, NAMD, Pymol, HyperChem czy też używane w niniejszej pracy: GROMACS (Van der Spoel et al. 2005; Hess et al. 2008), RasMol (Bernstein 2000) i VMD (Humphrey et al. 1996).

Najważniejsze ograniczenia wykorzystywania metod modelowania molekularnego w analizie zjawisk biologicznych, związane są ze stopniem złożoności analizowanych układów oraz dostępnością źródeł dużej mocy obliczeniowej. Wielkość układu, zwłaszcza z odpowiednio dobranymi modelami cząsteczek wody, z obliczeniowego punktu widzenia stanowi niemałe wyzwanie, zwykle ograniczając skalę czasową symulacji dla dużych makrocząsteczek do długości rzędu nanosekund. Większość biologicznie istotnych zjawisk obserwowalna jest w skali czasowej o kilka rzędów wielkości dłuższej, rzędu milisekund lub dłuższych. Zatem, niedostateczne próbkowanie jest nadal znaczącą przeszkodą, uniemożliwiającą wyodrębnienie wszystkich znaczących skorelowanych ruchów z dynamiki molekularnej (Balsera et al. 1996; Hess 2000).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Istotnym problemem mogą być również struktury wyjściowe do obliczeń – jakość modelu ma kluczowe znaczenie dla dokładności wyników, zaś dostępne w bazach struktury krystaliczne często są niekompletne – brak w nich poszczególnych atomów, całych aminokwasów, składających się z wielu reszt fragmentów struktury, a nawet całe łańcuchy. W takich przypadkach konieczne jest „dobudowanie" brakujących elementów, np. metodami modelowania homologicznego w oparciu o podobne, znane struktury. Takie modele i przeprowadzone dla nich obliczenia są niestety mniej wiarygodne niż dla modelu o idealnie jednoznacznej strukturze wyjściowej (Hess 2000; Balsera et al. 1996).

Pomimo wspomnianych ograniczeń, metody modelowania molekularnego są coraz bardziej godne zaufania i stanowią dziś nie tylko wsparcie dla analiz przeprowadzanych metodami tradycyjnymi, ale również cenne narzędzie umożliwiające wgląd w aspekty struktur dotychczas niemożliwe do zbadania metodami tradycyjnymi.

I.2.2 Empiryczny model oddziaływań i pola siłowe

Podstawą najczęściej stosowanych w modelowaniu molekularnym technik jest empiryczny model oddziaływań, którego kluczowym założeniem jest istnienie pewnej optymalnej konformacji dla każdej cząsteczki, od której każde odchylenie powoduje wzrost energii układu (Karplus 2003; Schlick 2010).

Przyjmując uproszczone założenie, że atomy to sprężyste kulki o pewnej masie, a wiązania chemiczne między nimi działają na zasadzie sprężynek, łączących atomy ale umożliwiających pewną swobodę ruchu, to strukturę i ruch powstałego układu da się opisać przy pomocy serii prostych równań matematycznych. Równania te, stanowiące podstawę mechaniki klasycznej, muszą zawierać odpowiednie parametry, dzięki którym uwzględnione są takie cechy układu jak rozmiar atomów, sprężystość wiązań, itp. Zestaw takich równań matematycznych wraz z odpowiednimi parametrami nazywany jest polem siłowym (ang. *force field*). W oparciu o zdefiniowane pole siłowe, możliwe jest przeprowadzenie symulacji numerycznych, opisujących zachowanie danej cząsteczki wdanych warunkach, np. ruchy białka w środowisku analogicznym do panującego w komórce (McCammon & Harvey 1987; Karplus 2003; Schlick 2010).

Z założenia, pole siłowe jest matematycznym modelem opisującym sumę wszystkich możliwych oddziaływań, zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowych dla wszystkich atomów i w każdym punkcie układu. Ponieważ jednak liczba sumowań członów oddziaływań niewiążących rośnie wraz z kwadratem liczby atomów, dla dużych układów (białka, kwasy nukleinowe) uwzględnienie wszystkich członów równania dla wszystkich atomów okazuje się bardzo czasochłonne i nieuzasadnione z punktu widzenia dokładności obliczeń. Można jednak przyspieszyć obliczenia poprzez zastosowanie pewnych uproszczeń (Karplus 2003; Schlick 2010).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Oddziaływania indukcyjne, poza nielicznymi wyjątkami (Donchev et al. 2005), są pomijane, czego przykładem są klasyczne pola siłowe CVFF (Lifson et al. 1979), CHARMM (Brooks et al. 1983), AMBER (Weiner et al. 1986), OPLS (Jorgensen & Tirado-Rives 1988), TRIPOS (Clark 1989), zaś wypadkowy efekt oddziaływań walencyjnych i van der Waalsa najczęściej opisuje się potencjałem Lennarda-Jonesa. Wkład oddziaływań elektrostatycznych najczęściej ogranicza się do oddziaływania, zgodnie z prawem Coulomba, cząstkowych punktowych ładunków elektrycznych centrowanych na atomach cząsteczki. Opisuje się go tzw. potencjałem coulombowskim. By przyspieszyć obliczanie oddziaływań elektrostatycznych długiego zasięgu, stosuje się specjalne algorytmy. Jednym z nich jest metoda Ewalda obliczania sumy sieciowej (ang. *particle mesh Ewald,* PME).

Oprócz redukcji członów energetycznych, popularnymi sposobami upraszczającymi obliczenia są: promień obcięcia (ang. *cut-off*) i model zespolonych atomów (ang. *united atoms*). Pierwsza metoda polega na redukcji uwzględnianych oddziaływań do zachodzących w odległości nie większej niż promień obcięcia. W drugim sposobie natomiast, dana, mała grupa atomów zostaje zastąpiona wirtualną molekułą; dzięki temu chcąc policzyć na przykład oddziaływania z grupą metylową, zamiast uwzględniać atom węgla i trzy atomy wodoru, brany jest pod uwagę jedynie wirtualny „atom" CH3 (McCammon & Harvey 1987).

Odpowiednio sparametryzowane pole siłowe stanowi kluczowy element dla uzyskania prawidłowych wyników przeprowadzanej symulacji. Powinno ono być jednocześnie dokładne – aby maksymalnie szczegółowo odwzorowywać złożoność opisywanych zjawisk, a z drugiej uniwersalne – aby mogło być stosowane dla większej grupy cząsteczek (Karplus2003; Schlick 2010).

Wybór pola siłowego należy do podstawowych decyzji dotyczących symulacji i ma kluczowe znaczenie dla uzyskanych wyników. Choć teoretycznie każda cząsteczka posiada własne, unikalne pole siłowe, z pewnym przybliżeniem możliwe jest stosowanie jednego pola w całej klasie komponentów podobnych do wykorzystywanej w parametryzacji cząsteczki. W ten sposób, liczba pól do wyboru z kilkudziesięciu milionów ograniczona zostaje do kilkunastu. Decyzję podejmuje się zwykle na podstawie kryteriów takich jak: stopień wyspecjalizowania pola, popularność w literaturze oraz adekwatność do danego typu problemów.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.2.3 Dynamika molekularna

Dynamiką molekularną (ang. *molecular dynamics,* MD) określa się zbiór technik obliczeniowych, służących do otrzymywania trajektorii dynamicznej układu oraz analizy jego kinetycznych i dynamicznych właściwości, w tym również ruchów molekularnych (Karplus 2003; Schlick 2010; McCammon & Harvey 1987). Pozwala ona na symulowanie ruchu układu w polu określonego potencjału, a więc na obserwację zmian zachodzących w symulowanym układzie w określonym przedziale czasu.

Trajektoria dynamiczna jest zbiorem współrzędnych i prędkości atomów, obrazującym ewolucję układu w czasie symulacji, która powstaje w wyniku rozwiązywania równania ruchu Newtona dla wszystkich atomów układu.

$$F = m_i \cdot a_i$$

$$-\frac{dV}{dr_i} = m_i \cdot \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

F– siła [N]

m_i – masa atomu i [kg]

a_i – przyspieszenie atomu i [m/s^2]

Symulacja dynamiki molekularnej wymaga obliczenia gradientu energii potencjalnej V, będącej funkcją współrzędnych atomowych r_i. Jako że dla układów wieloatomowych nie da się rozwiązać tych równań metodami fizyki klasycznej, trzeba stosować metody numeryczne. Zakłada się wtedy, że ruch pojedynczego atomu w krótkim czasie można przedstawić w postaci szeregu Taylora:

$$r(t+\delta t) = r(t) + \frac{dr}{dt}\delta t + \frac{1}{2}\frac{d^2 r}{dt^2}(\delta t)^2 + ... = r(t) + \upsilon(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)(\delta t)^2 + ...$$

gdzie:

$r(t)$ – położenie atomu w chwili t

$v(t)$ – prędkość atomu w chwili t

$a(t)$ – przyspieszenie atomu w chwili t

$r(t+\delta t)$ - położenie atomu po czasie δt

(Karplus 2003; Pantano et al. 2004; McCammon & Harvey 1987).

Równania te są klasycznymi równaniami deterministycznymi, co oznacza, że jeśli znane są warunki początkowe, to dla dowolnej chwili czasowej t można wyznaczyć położenia i prędkości atomów.

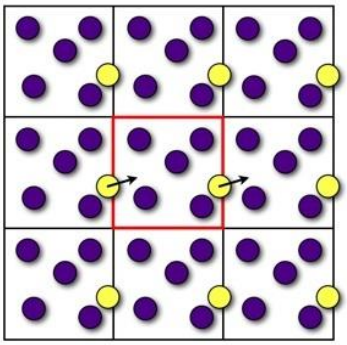
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Informacje na temat warunków początkowych uzyskać można znając zoptymalizowaną konfigurację przestrzenną o najniższej energii oraz generując pędy w określonej temperaturze. Położenia atomów bierze się przeważnie z krystalografii lub danych NMR (na przykład znajdujących się w bazie Protein Data Bank). Początkowe prędkości są natomiast losowo przypisywane na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmana dla danej temperatury.

Symulacja metodą dynamiki molekularnej musi być poprzedzona procesem wyrównania temperatury i doprowadzenia układu do stanu równowagi termodynamicznej, czyli minimalizacją energii (Haile 1993).

Warunki brzegowe

Aby zapobiec dyfundowaniu cząsteczki poza obszar pudełka oraz by symulowany układ nie znajdował się „w próżni", konieczne jest specjalne traktowanie cząsteczek zlokalizowanych na krańcach symulowanego układu. Najczęściej stosowanym sposobem jest tzw. otoczenie periodyczne (ang. *Periodic Boundary Conditions,* PBC). Polega ono na otoczeniu pierwotnego pudełka symulacyjnego identycznymi pudełkami – w każdym kierunku układ staje się swym własnym sąsiadem. Schematycznie ilustruje to rysunek poniżej.



Rysunek 19: Otoczenie periodyczne. "Wypadnięciu" cząsteczki z pudełka towarzyszy jednoczesne "wpadnięcie" jej kopii z przeciwnej strony (Cheatham et al. 1995).

Jednym z możliwych sposobów realizacji PBC jest model minimalnego odwzorowania (ang. *minimum-image model*), w którym atom rzeczywisty nie może oddziaływać z więcej niż jedną kopią innego atomu. Dlatego ustawiając otoczenie periodyczne, bardzo ważne jest wybranie odpowiedniej wartości promienia obcięcia. Prawidłowo dobrany promień obcięcia powinien wynosić maksymalnie połowę długości najkrótszego boku pudełka, w przeciwnym wypadku możliwe jest nienaturalne i niepożądane oddziaływanie cząsteczki z dowolnym innym atomem i jego obrazem. Dla dużych cząsteczek, jakimi są białka, takie ograniczenie może okazać się niewystarczające. By mieć pewność, że żadna z cząsteczek rozpuszczalnika nie oddziałuje z dwiema stronami makromolekuły, długość każdego wektora pudełka symulacyjnego powinna przekraczać sumę największego wymiaru cząsteczki i dwóch standardowo dobranych promieni obcięcia (Van Der Spoel et al. 2005).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Stosowanie promienia obcięcia, oprócz redukcji czasu obliczeń, wprowadza jednocześnie pewne nieścisłości. Może się zdarzyć, że poprzez zmniejszenie promienia oddziaływań i zignorowanie części oddziaływań coulombowskich, w układzie wygenerowany zostanie znaczący moment dipolowy, wynikający z niezbilansowania układu przez „obcięte" oddziaływania. Zapobiega się temu poprzez tworzenie grup atomów (ang. *charge groups*), których ładunki sumaryczne są zerowe (Van Der Spoel et al. 2005).

Czas trwania symulacji

Symulacja dynamiki molekularnej zwykle przeprowadzana jest w dwóch etapach. Czas trwania każdego z nich jest uzależniony zarówno od wielkości układu, jak i od celu symulacji.

Pierwszą fazą jest stadium równoważenia układu, a jego celem jest takie przygotowanie systemu, by nadawał się on do dalszych obliczeń dynamiki molekularnej.

Po tym etapie układ zyskuje najbardziej prawdopodobną konfigurację, zgodną z warunkami zewnętrznymi (np. temperatura, ciśnienie). Osiągnięcie stanu równowagi można zaobserwować jako fluktuację wartości różnych wielkości termodynamicznych wokół swych wartości średnich. Inną możliwą metodą jest przeprowadzenie podobnej symulacji z różną wartością początkową generatora liczb losowych (ang. *random seed*). Jeśli układ zbiegnie się do podobnego stanu po każdym z etapów stabilizacyjnych, wskazuje to, że równowaga została osiągnięta.

Drugi etap, to proces zbierania danych. Trwa on zazwyczaj kilkakrotnie dłużej niż stabilizacja.

Całkowity czas trwania symulacji dynamiki molekularnej, zależny od natury modelowanego procesu oraz stopnia złożoności układu, waha się od pojedynczych femtosekund dla reorganizacji wiązań wodorowych w wodzie do wielu sekund dla procesów denaturacji białek. Dla dynamiki układu zawierającego białko składające się z kilkunastu tysięcy atomów w wodzie, symulacja powinna trwać kilkadziesiąt do kilkuset nanosekund. Kilkosekundowa symulacja procesów denaturacji białka przy obecnym rozwoju technik informatycznych nie jest jeszcze osiągalna (Van Der Spoel et al. 2005).

Krok czasowy

Krok czasowy (Δt) jest jednym z najważniejszych parametrów dynamiki molekularnej. Rozsądnie dobrany, powinien stanowić kompromis pomiędzy precyzją wyników a czasem przeprowadzania symulacji.

Maksymalny krok czasowy w dynamice molekularnej ograniczony jest najkrótszym czasem oscylacji występującym w symulowanym układzie. Aby uzyskać zadowalającą dokładność, zaleca się aby krok czasowy nie przekraczał 3-4 femtosekund (Van Der Spoel et al. 2005).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Zespół statystyczny

Standardowe symulacje dynamiki molekularnej odpowiadają zespołowi statystycznemu mikrokanonicznemu (NVE), w którym liczba cząstek, objętość i całkowita energia są stałe, który to zespół nie odpowiada dokładnie typowym warunkom doświadczalnym. Inne możliwe zespoły to NVT, w którym za pomocą termostatu utrzymywana jest stała temperatura, lub NPT, w którym przy pomocy termostatu i barostatu utrzymywane są stała temperatura i ciśnienie (Kneller & Mülders 1996).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.2.4 Analiza głównych składowych (PCA)

W układach molekularnych ruchy nawet odległych segmentów są często skorelowane, co ma istotne znaczenie biologiczne. Analiza tych korelacji może pozwolić zaproponować ich ewentualne znaczenie funkcjonalne. Metoda głównych składowych (ang. *principal component analysis,* PCA) jest skutecznym narzędziem chemometrycznym i statystycznym, które umożliwia oddzielenie istotnych zmian w strukturze przestrzennej cząsteczki od szumów powstałych na skutek jej lokalnych fluktuacji (Amadei et al. 1993).

Ogólnie, PCA jest jedną z metod tzw. analizy czynnikowej, której celem jest sprawdzenie, czy kilka nowych zmiennych wyjaśnia maksymalnie dużo zmienności wyjściowego układu, co daje w efekcie redukcję wymiarowości problemu i umożliwia wykrywanie ukrytych uwarunkowań, które między zmiennymi, wyjaśniającymi ich występowanie. Możliwe jest to w sytuacji, gdy tylko część informacji wnoszone przez każdą z analizowanych zmiennych jest swoista, reszta zaś jest powtórzeniem informacji zawartej w innych zmiennych. Można wówczas przekształcić zmienne pierwotne w nowe, wzajemnie niezależne (tzw. ortogonalne) zmienne, zwane czynnikami lub też głównymi składowymi. Podczas gdy analizowanie każdego zagadnienia (zmiennej pierwotnej) osobno pozwala uzyskać wiele szczegółowych informacji, zastosowanie analizy czynnikowej umożliwia uzyskanie ogólnego, syntetycznego obrazu sytuacji. Dzięki temu, że wyodrębnione czynniki mają inną interpretację merytoryczną przy jednoczesnym zachowaniu znacznej części informacji zawartych w zmiennych pierwotnych, PCA umożliwia prezentację graficzną zależności wielowymiarowych (Amadei et al. 1993).

Można wyznaczyć tyle głównych składowych, ile było zmiennych pierwotnych. Każda główna składowa stanowi liniową kombinację zmiennych pierwotnych i wyjaśnia pewną część całkowitej zmienności (wariancji). Wariancja nowej zmiennej nazywana jest jej wartością własną. Główne składowe wyznaczane są w taki sposób, że wartości własne kolejnych składowych są coraz mniejsze i zazwyczaj kilka pierwszych składowych w stopniu wystarczającym wyjaśnia większość wariancji układu zmiennych. Przykładowo, jeśli w układzie dziesięciu zmiennych, pierwsza składowa wyjaśnia 90% wariancji, oznacza to, iż prawie cała zmienność tego układu da się przedstawić w układzie jednowymiarowym tj. na prostej, zamiast w dziesięciu wymiarach (Amadei et al. 1993; Pluta 1977).

Zakładając, że przedmiotem analizy jest macierz danych, zawierająca n realizacji m zmiennych, procedura metody głównych składowych obejmuje następujące etapy:

- Wybór m zmiennych do analizy
- Wyznaczenie macierzy kowariancji X (po standaryzacji Z)
- Wyznaczenie głównych składowych G_l
- Rotacja głównych składowych w przestrzeni zmiennych
- Interpretacja głównych składowych

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Przed przystąpieniem do PCA, dane wejściowe muszą zostać wycentrowane (ich średnia musi wynosić zero) lub, w przypadku gdy analizowane zmienne są istotne ale mają różną zmienność, różne rzędy wielkości oraz różne jednostki, poddane autoskalowaniu (średnia danych równa zero i odchylenie standardowe równe jeden).

Macierz danych, zawierająca *n* realizacji *m* zmiennych:

$$X = [x_{ij}],\ x_{ij} \geq 0 \qquad j = 1,2,\ldots,m$$

$$i = 1,2,\ldots,n$$

po standaryzacji:

$$Z = [z_{ij}]$$

Podstawowe równanie metody głównych składowych może być zapisane w postaci układu równań liniowych:

$$Z^T = AG^T$$

$$G = A^T Z$$

gdzie:

Z - macierz *j* standaryzowanych zmiennych pierwotnych

A - macierz współczynników składowych głównych

G - macierz składowych głównych

Podstawą do wyznaczania elementów macierzy współczynników składowych głównych jest macierz korelacji:

$$R = [r_{ij}] = \frac{1}{n} Z'Z = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} z_{ip} z_{ij} (p, j = 1 \ldots m)$$

Wariancje na głównej przekątnej macierzy są miarą zasobów informacyjnych zmiennych pierwotnych.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Każda z głównych składowych G_l może zostać przedstawiona jako liniowa kombinacja pierwotnych zmiennych Z:

$$Gl = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{m} a_{ij} Z_j$$

gdzie:

m – liczba zmiennych pierwotnych

k – liczba składowych głównych

Z_j – j-ta zmienna standaryzowana (pierwotna)

G_l – l-ta skłądowa główna

a_{jl} – ładunki czynnikowe

Pierwsza główna składowa G_1 jest taką kombinacją zmiennych pierwotnych, dla której wariancja próbkowa może być wyrażona wzorem:

$$S_{Gl}^2 = \sum_{i=1}^{m} \sum_{j=1}^{m} a_{il}\, a_{jl} S_{ij}$$

Ta wariancja jest największą wśród wszystkich kombinacji liniowych takich, że

$$a_1{}^T a_1 = 1$$

(warunek jednoznacznego wyznaczenia wektora współczynników)

Druga i każdą kolejną główną składową można przedstawić w sposób analogiczny.

(Pluta 1977; Sharaf et al. 1986; Devilliers & Karcher 1991)

W przypadku stosowania PCA w analizie trajektorii, zwykle już pierwszych kilka wektorów zawiera ponad połowę informacji o zmianach układu. Dla długiej symulacji, tych pierwszych kilka składowych opisuje globalne, najważniejsze ruchy cząsteczki, dlatego też są one wystarczające do jej analizy.

Należy podkreślić, iż metoda PCA dostarcza jedynie orientacyjnej wiedzy na temat głównych oscylacji układu i w wielu przypadkach wygenerowane struktury nie są poprawne pod względem fizycznym (Czermiński et al. 1986). Przykładowo, w analizie trajektorii, przejście pomiędzy skrajnymi strukturami nie następuje w sposób ciągły, jest raczej odzwierciedleniem oscylacji cząsteczki wokół struktury średniej.

Co ważne, PCA jest w stanie wyodrębnić istotne ruchy jedynie przy dostatecznie długiej trajektorii, gdy spełniony jest warunek zbieżności próbkowania podczas dynamiki molekularnej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

I.2.5 Zbieżność próbkowania w analizie trajektorii

Analiza głównych składowych stosowana do analizy trajektorii powstałej za pomocą dynamiki molekularnej opiera się na założeniu, że ruchy o dużej amplitudzie i małej częstości są powiązane ze zmianami geometrii właściwymi dla danej cząsteczki, podczas gdy fluktuacje o małej amplitudzie i dużej częstości odzwierciedlają chaotyczne drgania atomów. Zatem, gdy trajektoria jest zbyt krótka, w analizie głównych składowych te przypadkowe drgania mogą zostać wzięte za zmiany istotne. W celu weryfikacji czy warunek zbieżności trajektorii został spełniony, stosuje się wiele różnych wskaźników. Niestety, na chwilę obecną żadna ze stosowanych metod nie jest idealna (Hess 2002) a dobranie kryterium pozwalającego na ocenę zbieżności jest bardzo problematyczne. Wiadomo jednak, że ani osiągnięcie plateau na wykresie odchylenia standardowego od struktury wyjściowej (RMSD), będące często pierwszym i jedynym kryterium zbieżności, ani też kosinusoidalny kształt krzywej dla RMSD pierwszych kilku składowych, nie mają nic wspólnego z kryterium zbieżności trajektorii.

W rzeczywistości, stabilizacja RMSD świadczy o relaksacji struktury, czyli o zrównoważeniu układu i wyznacza moment, od którego powinno się zacząć zbierać trajektorię do dalszej analizy. W żadnym stopniu nie jest to kryterium reprezentatywności próbki, gdyż nie zawiera informacji o tym, czy symulacja jest wystarczająco długa by uchwycone zostały wszystkie istotne ruchy cząsteczki. Co więcej, przeprowadzone przez Hessa (Hess 2000; Hess 2002) poszukiwania najbardziej miarodajnego kryterium wykazały, że średnie odchylenie standardowe głównych składowych jest najgorszym wskaźnikiem spośród wszystkich przez niego testowanych, gdyż w większości przypadków odzwierciedla zmiany wynikające z ruchów dyfuzyjnych zamiast skorelowanych zmian geometrii struktury (Hess 2000).

Z kolei na pozór regularny, kosinusoidalny przebieg krzywej odchylenia atomów dla pierwszych kilku składowych, w przypadku krótkich symulacji dużego białka, jest najprawdopodobniej pochodną losowych ruchów dyfuzyjnych atomów gdyż dynamika jest zbyt krótka aby kilkakrotnie osiągać bariery energetyczne na wykresie energii swobodnej (Hess 2000).

Hessowi nie udało się znaleźć idealnego kryterium oceny, czy dana symulacja osiągnęła minimalną długość konieczną do wnioskowania na temat globalnych ruchów białka, wytypował natomiast wskaźnik nieosiągnięcia tego minimum. Jest nim cosinus content (cc), miara oparta na analizie podobieństwa danej głównej składowej *i* do iloczynu tej składowej *i* z połową długości trajektorii ($T/2$).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Parametr cc przyjmuje wartości od 0 (idealna zbieżność) do 1 (zupełny brak zbieżności) i opisywany jest wzorem:

$$\frac{2}{T}\left(\int_0^T \cos\left(\frac{i\pi t}{T}\right)p_i(t)dt\right)^2\left(\int_0^T p_i^2(t)dt\right)^{-1}$$

gdzie:

T – długość trajektorii

$p_i(t)$ – wartość i-tej głównej składowej

Gdy wartość współczynnika cc równy jest jedności, zależność głównej składowej (i) od połowy długości trajektorii (T/2) idealnie opisana jest funkcją cosinus, a dana składowa odzwierciedla wyłącznie przypadkowe ruchy dyfuzyjne. Gdy natomiast jego wartość wynosi zero, ruchy opisywane daną składową są całkowicie skorelowane. Parametr cc może być więc uważany za udział ruchów dyfuzyjnych w ruchach opisywanych daną składową. Parametr cc jest wyznacznikiem bezwzględnym, otrzymywanym na podstawie jednej analizy kowariancji, co czyniłoby z niego dobre kryterium zbieżności dynamiki molekularnej, gdyby nie to, że niepewność pomiarowa jest rzędu samego cc (Hess 2002). W praktyce uważa się, że w przypadku makromolekuł, dla wartości cc wyższej niż 0,5, symulacja jest za krótka, by na podstawie wyników analizy głównych składowych wysuwać daleko idące wnioski.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

II. Cel i zakres pracy

Celem badań przeprowadzonych w ramach przygotowania pracy doktorskiej było poznanie molekularnych aspektów regulacji enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu pochodzącego z *C. albicans* poprzez jego inhibicję za pomocą UDP-*N*-acetylo-D-glukozaminy.

Przewidywanym efektem końcowym badań było zaproponowanie mechanizmu wyżej wymienionej inhibicji. Tym niemniej, już samo poszerzenie stanu wiedzy na temat regulacji syntazy GlcN-6-P pochodzenia eukariotycznego poddaje nowe pomysły badaczom pracującym z enzymem przy pomocy tradycyjnych metod eksperymentalnych i w ten sposób – w dłuższej perspektywie – przyczynia się do opracowania nowej klasy leków przeciwgrzybowych oraz przeciwcukrzycowych.

Zakładane etapy prowadzonych przeze mnie badań obejmowały w szczególności:

- Przygotowanie układów do symulacji

Przygotowałam pięć układów symulacyjnych tetrameru domen ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans*. Cztery z nich dotyczyły białka natywnego w następujących wersjach:

  - W stanie wolnym
  - Ze związanym inhibitorem
  - Ze związanym substratem
  - Ze związanym substratem i inhibitorem

Piąty model dotyczył muteiny w stanie wolnym, zmodyfikowanej poprzez wprowadzenie struktury „ogonozamka" spinającego oba końce ogona-C.

- Przeprowadzenie symulacji

Przygotowane układy zostały poddane dynamice molekularnej o długości 300 ns w warunkach możliwie zbliżonych do komórkowych.

- Analizę porównawczą symulacji

Analizy porównawcze czterech symulacji białka natywnego pozwoliły wyodrębnić elementy struktury, których ruchliwość uległa największym zmianom w wyniku związania UDP-GlcNAc. Z kolei porównanie symulacji muteiny z białkiem natywnym wykazało wpływ mutacji Leu434Arg na ruchliwość i stopień uporządkowania ogona-C.

- Określenie roli i znaczenia ogona-C w inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc

Wyniki analizy porównawczej przeprowadzonych symulacji pozwoliły zaproponować rolę, jaką ogon-C odgrywa w procesie przenoszenia sygnału pomiędzy domenami enzymu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III. Przeprowadzone badania

Metody

Przeprowadzone przeze mnie badania opierały się na analizach porównawczych otrzymanych metodami dynamiki molekularnej trajektorii domeny ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzącej *C. albicans*. Z przeprowadzonych na początkowym etapie testów (dane niepublikowane) wynikło jednoznacznie, iż symulacje o długości 100 ns powinny być co najmniej dwa lub trzy razy dłuższe aby spełniony został warunek zbieżności trajektorii. Dlatego też, wszystkie przeprowadzone dynamiki uwzględnione w niniejszej pracy, miały długość 300 ns.

Do minimalizacji energii, symulacji dynamiki molekularnej oraz późniejszej analizy trajektorii posłużono się programami pakietu GROMACS (skrót od *GROningen MAchine for Chemical Simulations*) w wersjach 4.5.3 i wcześniejszych. GROMACS jest wszechstronnym pakietem obliczeniowym przeznaczonym do symulacji dynamiki molekularnej dla układów zawierających dochodzącą do setek milionów, liczbę cząstek. Pakiet ten stworzony został dla molekuł biochemicznych o dużej liczbie skomplikowanych oddziaływań wiążących (takich jak białka czy lipidy), ale jego możliwości pozwalające na obliczenie również oddziaływań niewiążących sprawiły, że z powodzeniem wykorzystywany jest także do badania systemów nie-biologicznych, np. polimerów. GROMACS uznawany jest za jeden z najszybszych i najpopularniejszych pakietów obliczeniowych. Może wykorzystywać zarówno moc obliczeniową standardowych procesorów (CPU) jak i procesorów graficznych (GPU). Umożliwia również obliczenia równoległe przy użyciu standardowych bibliotek MPI. Jest dostępny bezpłatnie, na licencji otwartego oprogramowania (ang. *open-access*) (Van Der Spoel et al. 2005; Hess et al. 2008).

Wybrano pole siłowe Gromos96 podtyp 43a2, zalecane do symulacji białek ze względu na zaawansowaną parametryzacją kątów torsyjnych w łańcuchach alifatycznych. Pole to oparte jest na empirycznym modelu oddziaływań, uproszczonym poprzez zastosowanie modelu zespolonych atomów.

W przygotowywaniu układów do symulacji operowano dwoma typami plików strukturalnych, nazywanych na podstawie ich rozszerzeń plikami *pdb* i *gro*. Różnią się one głównie formą zapisu danych - podczas gdy *pdb* jest standardowym plikiem strukturalnym w formacie używanym w białkowych bazach danych (ang. protein data bank, skąd nazwa PDB), *gro* zawiera informację zapisaną w formacie Gromos87 i stosowaną domyślnie przez większość programów pakietu GROMACS. Pliki *pdb* akceptowane są jako dane wejściowe tylko pod warunkiem, że struktura danej cząsteczki zdefiniowana jest w wewnętrznej bazie danych GROMACSa i możliwa jest automatyczna konwersja *pdb* do pliku *gro*.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Długoczasowe i wieloetapowe obliczenia przeprowadzane były w pracowni Modelowania Molekularnego Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej oraz na komputerach Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Kompterowej i Cyfronetu (oba centra należą do Polskiej Infrastruktury Gridowej PL-Grid).

III.1.1 Przygotowanie struktur początkowych

Poprawne przygotowanie układu do dynamiki molekularnej ma kluczowe znaczenia dla jej jakości oraz wiarygodności.

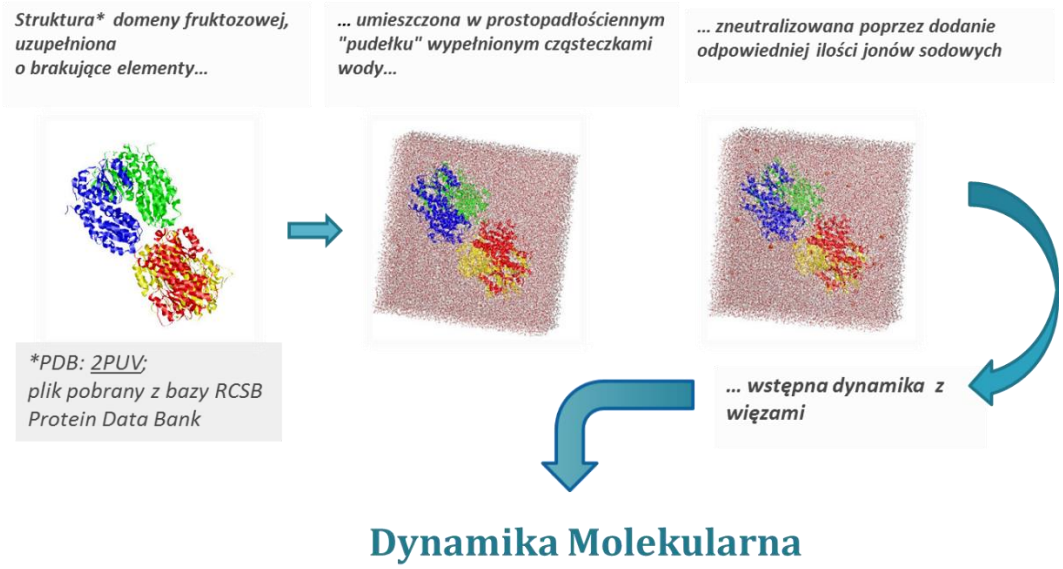
Ze względu na brak kompletnej struktury eukariotycznej syntazy GlcN-6-P, do modelowania zachowania kompleksu enzymu z inhibitorem użyłam fragmentu odpowiadającego jej „rdzeniowi" – tetrametrowi domen ISOM. W bazie RCSB Protein Data Bank dostępnych jest kilka wersji tej struktury, z których, jak wspomniano wcześniej, żadna nie jest kompletna. Jednakowoż model pozbawiony ligandów (PDB: 2PUW) ma najgorszą spośród dostępnych rozdzielczość i brak w nim większej ilości fragmentów niż któremukolwiek z kompleksów. Dlatego też zdecydowałam się oprzeć na modelu 2PUV, który, w oparciu o strukturę homologicznego białka pochodzenia bakteryjnego (PDB: 1JXA), został uzupełniony o elementy niewidoczne przy ustalaniu struktury krystalograficznej, w tym C-końcowy fragment (etap wykonany przez dr inż. M. Wojciechowskiego). Wszystkie cząsteczki wody obecne w wyjściowej strukturze zostały odrzucone, podobnie jak jony magnezu, cząsteczki UDP-GlcNAc oraz 5-amino-5-deoxy-1-O-fosfono-D-mannitol, zastępujący Fru-6-P w miejscach jego wiązania.

Na podstawie tak przygotowanej struktury, wykonałam modele kompleksów domeny ISOM z: substratem, inhibitorem, substratem i inhibitorem oraz model muteiny, w której Leu434 zastąpiono resztą arginylową. Model muteiny Leu434Arg wykonany został przez dr inż. M. Wojciechowskiego.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.1.2 Przygotowanie i przeprowadzenie Dynamiki Molekularnej

Przed przystąpieniem do właściwej dynamiki molekularnej, każdy z otrzymanych modeli poddany został kilkuetapowemu, ustandaryzowanemu protokołowi, którego schemat przedstawiłam poniżej.



Rysunek 20: Etapy przygotowania układu do dynamiki molekularnej

Otrzymany ze struktury krystalicznej PDV: 2PUV model białka w stanie wolnym posłużył jako podstawa do wygenerowania współrzędnych w formacie obsługiwanym przez pakiet GROMACS (plik *gro*). Informacje na temat parametryzacji poszczególnych aminokwasów uzyskane zostały z wewnętrznej biblioteki GROMACSa.

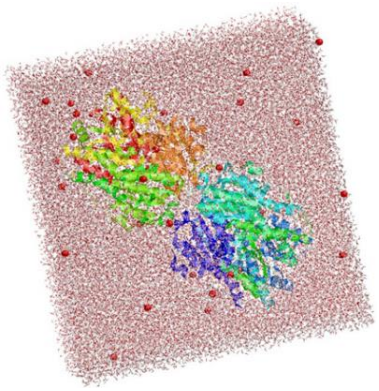
Topologie małocząsteczkowych ligandów: UDP-GlcNAc oraz Fru-6-P, których nie zawiera wewnętrzna biblioteka GROMACSa, zostały otrzymane przy pomocy serwera Dundee PRODRG2 (Schuttelkopf & van Aalten 2004) i zmodyfikowane na podstawie topologii strukturalnie podobnych cząsteczek: fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP) i uracylu w przypadku UDP-GlcNAc oraz glukozy, fruktozy i NADP dla Fru-6-P.

Każdy z przygotowanych modeli został zanurzony w prostopadłościennym pudełku wypełnionym zrównoważonymi cząsteczkami wody zgodnymi z modelem *spc* (ang. *single point charge)* (Berendsen et al. 1984), zalecanym dla pola siłowego Gromos96. Wymiary pudełka i ilość cząsteczek wody zostały dobrane w taki sposób, by odległość pomiędzy skrajnymi atomami cząsteczki a ściankami pudełka wynosiła co najmniej 1 nm, co w rezultacie dawało układ objętości około 2 500 nm^3 (w zależności od modelu). Aby zobojętnić wypadkowy ładunek, w każdym z układów losowo wybrane cząsteczki wody, dobrane w taki sposób, by odległość pomiędzy nimi wynosiła co najmniej 0,6 nm, zostały zastąpione odpowiednią ilością jonów sodu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wszystkie układy zostały poddane minimalizacji energii metodą najszybszego spadku (ang. *steepest descent*), której warunkiem końca było osiągnięcie maksymalnej zmiany energii mniejszej niż 0,1 kJ/mol lub też wykonanie przez algorytm 5 000 kroków. We wszystkich przypadkach minimalizacja zatrzymała się na skutek spełnienia drugiego kryterium.

Na ostatnim etapie wstępnym, przeprowadziłam 100 ps dynamiki z więzami, podczas której nastąpiła stopniowa relaksacja układu. Ciężkie atomy domeny zostały usztywnione stałą siłową o wartości 1 000 $kJ*mol^{-1}*nm^{-2}$, podczas gdy na ciężkie atomy ligandów, jak również na atom magnezu towarzyszący UDP-GlcNAc, nałożono więzy o wartości 50 $kJ*mol^{-1}*nm^{-2}$. Aby uniknąć deformacji układu, na tym etapie obliczeń zastosowałam zespół statystyczny NVT.



Rysunek 21: Gotowy do symulacji tetramer domeny ISOM w pudełku wypełnionym wodą. Jony sodowe przedstawione zostały w postaci czerwonych kul, białko jako model tasiemkowy.

Każdy etap kontrolowany był za pomocą analizy wizualnej układu. Przykład gotowego do symulacji, zneutralizowanego jonami sodowymi i zminimalizowanego tetrameru w pudełku wypełnionym wodą, ilustruje Rysunek 21.

Po fazie wstępnej stabilizacji, właściwa dynamika molekularna przeprowadzana była w warunkach stałego ciśnienia i temperatury, co odpowiada zespołowi statystycznemu NPT. Utrzymywanie temperatury na stałym poziomie odbywało się metodą łaźni termicznej (inaczej zwaną metodą Berendsena) przy temperaturze odniesienia 300 K i czasowej stałej relaksacji 0,1 ps (Berendsen et al. 1984).

Stabilizacja ciśnienia na poziomie 1 bar realizowana była za pomocą algorytmu wykładniczej relaksacji (Berendsena) typu izotropowego, przy stałej czasowej 0,5 ps (Berendsen et al. 1984). Współrzędne i wektory komórki elementarnej były skalowane po każdym ze 150 000 000 kroków. Prędkości początkowe wygenerowane zostały losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmana dla temperatury 300 K.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

By wyeliminować wpływ efektów brzegowych, obliczenia prowadzone były w otoczeniu periodycznym. Centrum masy układu zostało usztywnione parametrem niwelującym jego translację. Elektrostatyczne oddziaływania długiego zasięgu sumowane były metodą Ewalda obliczania sumy sieciowej (PME). Promień odcięcia dla oddziaływań Leonarda-Jonesa wynosił 1,2 nm, dla pozostałych natomiast – 1 nm. Długości wiązań zawierających atomy wodoru były utrzymywane na optymalnych wartościach za pomocą algorytmu LINCS (Hess et al. 1997; Hess 2008), co pozwoliło na zastosowanie kroku czasowego o względnie dużej wartości 2 fs.

Czas przeprowadzonej symulacji wynosił 300 ns. Stan układu był zapisywany do pliku zawierającego współrzędne i prędkości co 10 000 kroków, do pliku zawierającego wartości poszczególnych typów energii – co 500 kroków, natomiast skompresowany plik ze współrzędnymi uaktualniany był co 3 000 kroków.

III.1.3 Analiza trajektorii

Zanim otrzymane trajektorie zostały poddane właściwej analizie, przeprowadziłam na nich szereg testów wstępnych, mających na celu weryfikację: wiarygodności symulacji, stabilności układów i zbieżności trajektorii.

Analizę zasadniczą oparłam na analizie porównawczej średnich fluktuacji atomów, co pozwoliło mi zidentyfikować zmiany w ich ruchliwości zachodzące na skutek związania inhibitora. Zastosowanie metody głównych składowych pomogło mi uprościć zestaw analizowanych danych.

III.1.3.1 Ocena wiarygodności symulacji

Wiarygodność symulacji, czyli stopień w jaki komputerowe odwzorowanie pokrywa się z rzeczywistym zachowaniem cząsteczki, stanowi jeden z podstawowych problemów naukowców przeprowadzających badania metodami dynamiki molekularnej; jest też jednym z najczęstszych zarzutów stawianych przez przeciwników obliczeniowych metod analizy.

W przypadku symulacji białek, dla których dostępne są struktury krystaliczne, do oceny wiarygodności symulacji posłużyć może analiza porównawcza średnich fluktuacji atomów (RMSF) z krystalograficznymi czynnikami temperaturowymi, zwanymi B-czynnikami (ang. *B-Factors*). Stanowią one miarę ruchliwości określonego fragmentu struktury, a zatem korelacja między wyliczonymi RMSF dla struktury średniej a eksperymentalnymi B-czynnikami stanowi dobry sposób sprawdzenia jakości odwzorowania rzeczywistego zachowania białka przez dynamikę molekularną.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.1.3.2 Analiza stabilności układu

Analizy stabilności mają na celu sprawdzenie czy poddawane dynamice molekularnej układy nie ulegają deformacji pod wpływem działających na nie sił.

Wizualna ocena trajektorii oraz ewolucja zmian takich parametrów jak: promień bezwładności cząsteczki, liczba wiązań wodorowych, struktura drugorzędowa białka czy odległości pomiędzy środkami masy podjednostek pozwoliły mi ocenić czy struktura tetrameru nie uległa dezintegracji w trakcie symulacji. Wykresy zmian energii i odchylenia standardowego od wyjściowej struktury (RMSD) na przestrzeni symulacji, umożliwiły wstępne wyznaczenie momentu, od którego struktura może zostać uznana za stabilną iod którego można rozpocząć zbieranie trajektorii do dalszej analizy.

Dla struktur ze związanymi ligandami, zbadałam również zmiany odległości pomiędzy tymi cząsteczkami a ich miejscami wiążącymi. Do analizy wybrałam odległości pomiędzy wybranymi grupami atomów, które porównałam z analogicznymi odległościami w strukturze krystalicznej (PDB: 2PUT i PDB: 2PUV).

W przypadku substratu wiadomo, iż utrzymywany jest on w swej kieszeni wiążącej głównie dzięki zakotwiczeniu grup fosforanowych, związanych z trzema atomami tlenu pochodzącymi z reszt: Ser406, Ser452 i Thr455 (Raczyńska et al. 2007). Zatem, odległość pomiędzy środkiem masy tych trzech atomów tlenu oraz atomu fosforu z grupy fosforanowej Fru-6-P została wybrana jako grupa reprezentatywna do sprawdzenia odległości pomiędzy substratem a centrum aktywnym. Ta sama odległość, zmierzona dla struktury krystalicznej i uśredniona po podjednostkach, wynosi 0,108 nm. Uwzględniwszy jednak fakt, iż struktura krystaliczna stanowi jedynie statyczny obraz dynamicznego w rzeczywistości białka, przyjęłam, że substrat jest w centrum aktywnym jeśli zmierzona odległość mieści się w zakresie do 0,150 nm.

Dla inhibitora, analogiczna analiza obejmowała odległości pomiędzy środkiem masy jednego z najmniej ruchomych atomów liganda a środkiem masy najmniej ruchomych atomów z miejsca jego wiązania (wybór tych atomów uwarunkowany był przeprowadzonymi analizami RMSF dla każdego z nich). W ten sposób, odległość inhibitora od enzymu zdefiniowana została jako odległość między atomem C4 z uracylowej części UDP-GlcNAc a środkiem masy trzech Cα należących do najstabilniejszych reszt z zakresu kieszeni wiążącej inhibitora (określonej jako wszystkie białkowe atomy znajdujące się w promieniu 5 Å od niego) – były to reszty: Cys489, Gly490 i His492. W strukturze krystalicznej, ta odległość, uśredniona po podjednostkach, wynosi 0,541 nm.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.1.3.3 Ocena zbieżności trajektorii - wybór przedziałów do dalszej analizy

Jak zostało wspomniane wcześniej, w przypadku gdy analizowana trajektoria nie jest zbieżna, łatwo pomylić przypadkowe drgania, związane z ruchami dyfuzyjnymi cząsteczki, z ruchami istotnymi biologicznie. Do otrzymania prawidłowych wyników kluczowe jest zatem określenie przedziałów, na których trajektoria jest zbieżna. Wyznaczenie współczynnika cosinus content (cc) dla wybranego fragmentu trajektorii możliwe jest za pomocą standardowych programów pakietu GROMACS, pozwalających na wyznaczenie głównych składowych dla danego przedziału, a następnie na obliczenie dla nich wartości współczynnika cc.

Do analizy strukturalnej wybiera się możliwie jak najdłuższe fragmenty trajektorii, dla których spełniony jest warunek zbieżności, tj. współczynnik cc liczony dla całego białka oraz dla każdej z podjednostek mieści się w zakresie 0-0,5.

III.1.3.4 Porównanie średnich fluktuacji aminokwasów

Celem analizy strukturalnej, której trzon stanowiły analizy porównawcze średnich fluktuacji atomów (ang. *Root Mean Square Fluctuation*, RMSF) węgli α dla poszczególnych układów, było wykrycie zmian w zachowaniu cząsteczki, mających miejsce po związaniu inhibitora. Tak więc, analiza została oparta na identyfikacji fragmentów białka, dla których różnice pomiędzy średnimi fluktuacjami tych atomów w badanych modelach były najistotniejsze.

RMSF dla danego atomu *i* liczony był ze wzoru:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T}\sum_{t_j=1}^{T}(x_i(t_j) - \tilde{x}_i)^2}$$

gdzie:

T - czas, na przestrzeni którego liczona jest średnia

$\tilde{x}_i$ - pozycja odniesienia (np. średnia po czasie) atomu *i*

x_i – pozycja atomu *i* w chwili *t*

(Van Der Spoel et al. 2005)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.1.3.5 Analiza metodą głównych składowych

Wyodrębnienie najistotniejszych ruchów spośród gąszczu zmian, jakich symulowany układ doświadcza podczas dynamiki, jest zadaniem prawie niewykonalnym bez zastosowania specyficznych technik optymalnej redukcji wymiarowości przestrzeni danych. Jedną z najpopularniejszych i najefektywniejszych tego rodzaju metod jest analiza głównych składowych (PCA). W przypadku analizy trajektorii, oparta jest ona na podstawowym założeniu, iż ruchy o dużej amplitudzie i małej częstości powiązane są ze zmianami geometrii właściwymi dla danej cząsteczki, podczas gdy fluktuacje o małej amplitudzie i dużej częstości odzwierciedlają jedynie chaotyczne drgania atomów (Hess 2000).

Analiza PCA przeprowadzona została za pomocą dedykowanych dla tej analizy programów wchodzących w skład pakietu GROMACS. Przed przystąpieniem do właściwej analizy głównych składowych, dane zawarte w trajektorii zostały dopasowane do struktury wyjściowej, co pozwoliło wyeliminować wpływ translacji i rotacji, którym cząsteczka ulegała podczas symulacji.

Na podstawie tak zmodyfikowanych danych skonstruowane zostały macierze odchyleń poszczególnych węgli α cząsteczki oraz macierze kowariancji. Macierz kowariancji *A* wyznaczana jest z ogólnego wzoru:

$$A_{ij}=\{[X_i-\langle X_i\rangle][X_j-\langle X_j\rangle]\}$$

gdzie <…> oznacza średnią danej współrzędnej *i* lub *j* po całej trajektorii. Macierze kowariancji zostały następnie zdiagonalizowane w celu uzyskania macierzy głównych składowych (wektorów własnych) i macierzy diagonalnej odpowiednich wartości własnych, reprezentujących odpowiednio poszczególne oscylacje i ich amplitudy.

Główne skorelowane zmiany geometrii poszczególnych fragmentów cząsteczki zidentyfikowałam na podstawie analizy głównych składowych, powstałych poprzez rzutowanie trajektorii na pierwsze wektory własne. Następnie, poprzez wizualizację skrajnych struktur, odpowiadających zakresowi ruchu fragmentów, zidentyfikowałam fluktuacje o największej amplitudzie.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

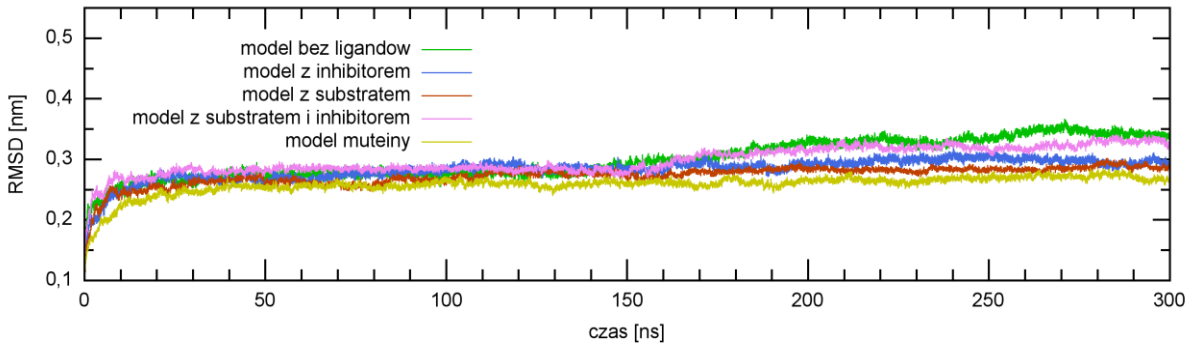
Wyniki i dyskusja

III.2.1 Stabilność, wiarygodność i zbieżność symulacji

III.2.1.1 Stabilność symulacji

Pierwszym etapem analizy stabilności otrzymanych trajektorii była ich ocena wizualna, do której posłużyłam się programem VMD (Humphrey et al. 1996), obsługującym formaty plików generowane przez pakiet GROMACS. W żadnym z analizowanych przypadków nie stwierdziłam deformacji systemu.

Stabilność struktury analizowanych układów potwierdzona została poprzez analizę zmian odchylenia standardowego węgli α białka od struktury wyjściowej (ang. *root mean square deviation*, RMSD) w trakcie symulacji. Zakresy otrzymanych wartości dla wszystkich analizowanych struktur zestawione są w Tabeli 2, zaś przebiegi RMSD dla uśrednionych po podjednostkach struktur obrazuje poniższy Rysunek 22.



Rysunek 22: Zmiany RMSD dla domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach. Wartości były obliczane co 6 ps i zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru; tylko Cα zostały uwzględnione w obliczeniach.

Wykres ten pozwala również wyznaczyć moment stabilizacji cząsteczki – można uznać, że we wszystkich analizowanych przypadkach jest to dwudziesta sekunda symulacji, kiedy to krzywe osiągają plateau. Wydaje się, że najstabilniej przebiegały symulacje modelu białka w kompleksie z samym substratem oraz muteiny, zaś najmniej stabilne były modele białka bez ligandów oraz z oboma ligandami, tym niemniej różnice nie są znaczące i wszystkie wartości średnie RMSD są mniejsze niż 0,4 nm co, dla takiej wielkości cząsteczki, jest wartością jak najbardziej poprawną.

Co prawda stosunkowo niewielki wzrost wartości może być zaobserwowany w drugiej połowie symulacji dla modeli białka ze związanym inhibitorem oraz – w mniejszym stopniu – dla białka bez ligandów, jednakże jako że nie jest to wzrost ciągły – krzywe ponownie osiągają równowagę po 200 ns – nie wpływa to na stabilność symulacji, co zresztą potwierdzają pozostałe analizy.

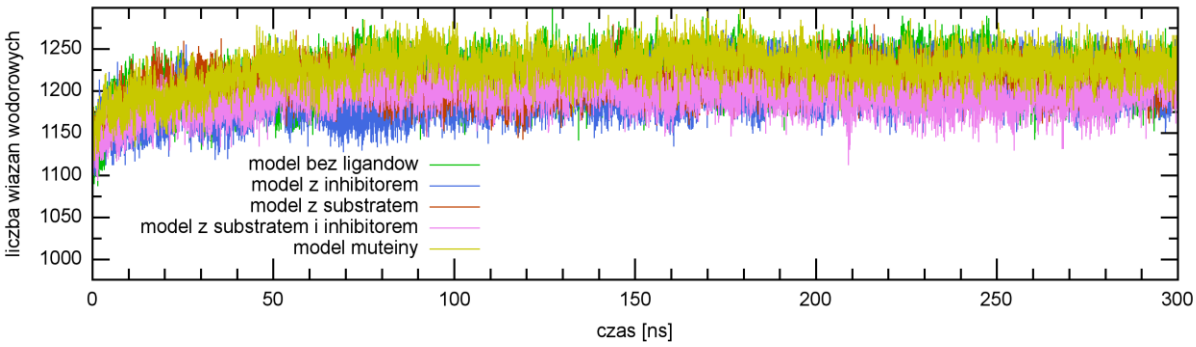
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela 2: Wartości RMSD wyliczone na przedziale 20-300 ns.

RMSD [nm]		Min	Max	Średnia
Model bez ligandów	**A**	0,206	0,357	0,278
	B	0,220	0,319	0,274
	C	0,250	0,460	0,324
	D	0,239	0,411	0,338
Model z inhibitorem	**A**	0,274	0,386	0,336
	B	0,227	0,336	0,283
	C	0,223	0,341	0,284
	D	0,211	0,278	0,244
Model z substratem	**A**	0,228	0,303	0,228
	B	0,083	0,307	0,215
	C	0,084	0,275	0,229
	D	0,080	0,273	0,230
Model z substratem i inhibitorem	**A**	0,255	0,355	0,293
	B	0,242	0,339	0,286
	C	0,270	0,340	0,303
	D	0,215	0,413	0,317
Model muteiny	**A**	0,228	0,295	0,258
	B	0,210	0,321	0,273
	C	0,200	0,272	0,233
	D	0,228	0,327	0,282

Zarówno zmiany całkowitej liczby wiązań wodorowych (Rysunek 23) jak i promienia bezwładności cząsteczki (Rysunek 24) na przestrzeni symulacji utrzymały się na stosunkowo stałym poziomie we wszystkich analizowanych modelach.

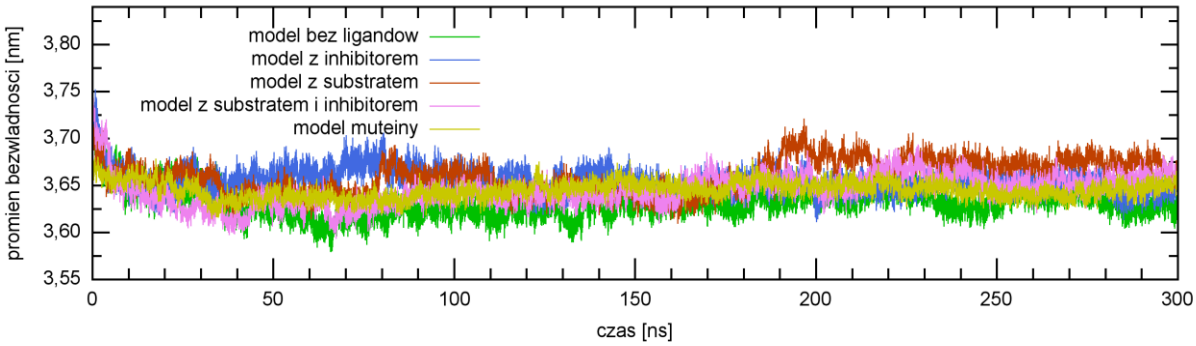
Ilość wiązań wodorowych wahała się od około 1125 do około 1275 w zależności od modelu, przy czym największa ich ilość występowała dla modelu muteiny oraz białka bez ligandów, zaś najmniej oba modele zawierające inhibitor. We wszystkich przypadkach wahania liczby wiązań nie przekraczały kilkunastu procent.



Rysunek 23: Zmiany całkowitej liczby wiązań wodorowych w obrębie domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Jeśli chodzi o ewolucję promienia bezwładności, pokazaną na wykresie poniżej, to parametr ten uległ najmniejszym wahaniom dla modelu muteiny, jednakże fluktuacje liczone względem wartości średniej były na bardzo podobnym, poziomie wynoszącym 2-3%, dla wszystkich modeli, różnicę można zatem uznać za marginalną. Na wykresie wyróżnia się krzywa dla modelu ze związanym substratem, dla której począwszy od 150 ns, wartości wzrastają o około 0,05 nm. Pomimo tego, wyraźnie widoczna jest stabilizacja wartości promienia bezwładności od około 150 ns symulacji dla wszystkich wariantów poza modelem z substratem, dla którego jest to raczej 200 ns symulacji.



Rysunek 24: Zmiany promienia bezwładności dla domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach.

Zarówno skrupulatnie przestudiowana ewolucja powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika (ang. *solvent accessible surface*, SAS), której przykładową analizę dla modelu bez ligandów oraz ze związanym inhibitorem pokazałam w Tabeli 3, jak również analiza struktury drugorzędowej białka w trakcie symulacji, wskazały, że struktura drugorzędowa podjednostek we wszystkich modelach pozostała niezmienna podczas dynamiki.

Tabela 3: Porównanie zmian powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika na przedziale 20-300 ns dla modelu domeny ISOM bez ligandów oraz z inhibitorem

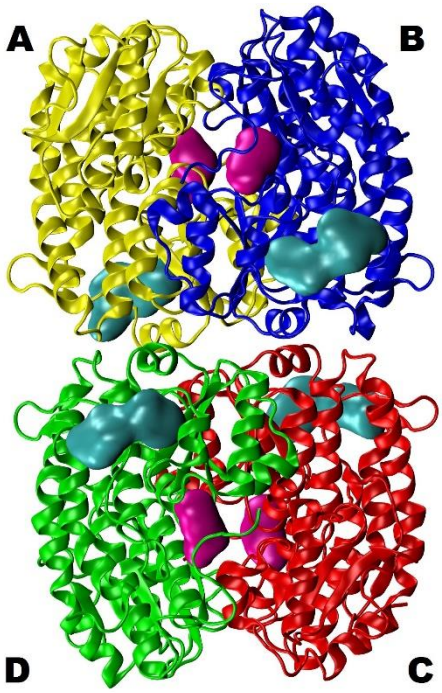
SAS [nm^2]	***Model bez ligandów***				***Model z inhibitorem***			
	A	***B***	***C***	***D***	***A***	***B***	***C***	***D***
Min	196,4	189,4	190,8	190,2	190,9	192,4	189,3	193,1
Max	235,7	223,6	228,0	225,9	226,5	227,1	228,6	229,9
Średnia	213,3	206,2	208,4	207,5	207,3	207,9	207,6	208,9

Przeprowadzone analizy, wspólnie z analizą wizualną, prowadzą do wspólnego wniosku, że wszystkie symulacje stosunkowo szybko osiągnęły stan równowagi i można je uznać za stabilne począwszy od dwudziestej ns symulacji.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.1.2 Struktura czwartorzędowa

Choć powyższe analizy nie pozostawiły cienia wątpliwości co do stabilności poddawanych dynamice modeli, nie uwzględniały one jednak wzajemnego ułożenia podjednostek w tetramerze. Niedawne doniesienia literaturowe sugerują związek tetramerycznej budowy eukariotycznego białka (Rysunek 25) z jego wrażliwością na inhibicję pod wpływem UDP-GlcNAc (Kwiatkowska-Semrau 2015), dlatego też uznałam za konieczne przeprowadzić bardziej szczegółową analizę związanych ze strukturą czwartorzędową parametrów.

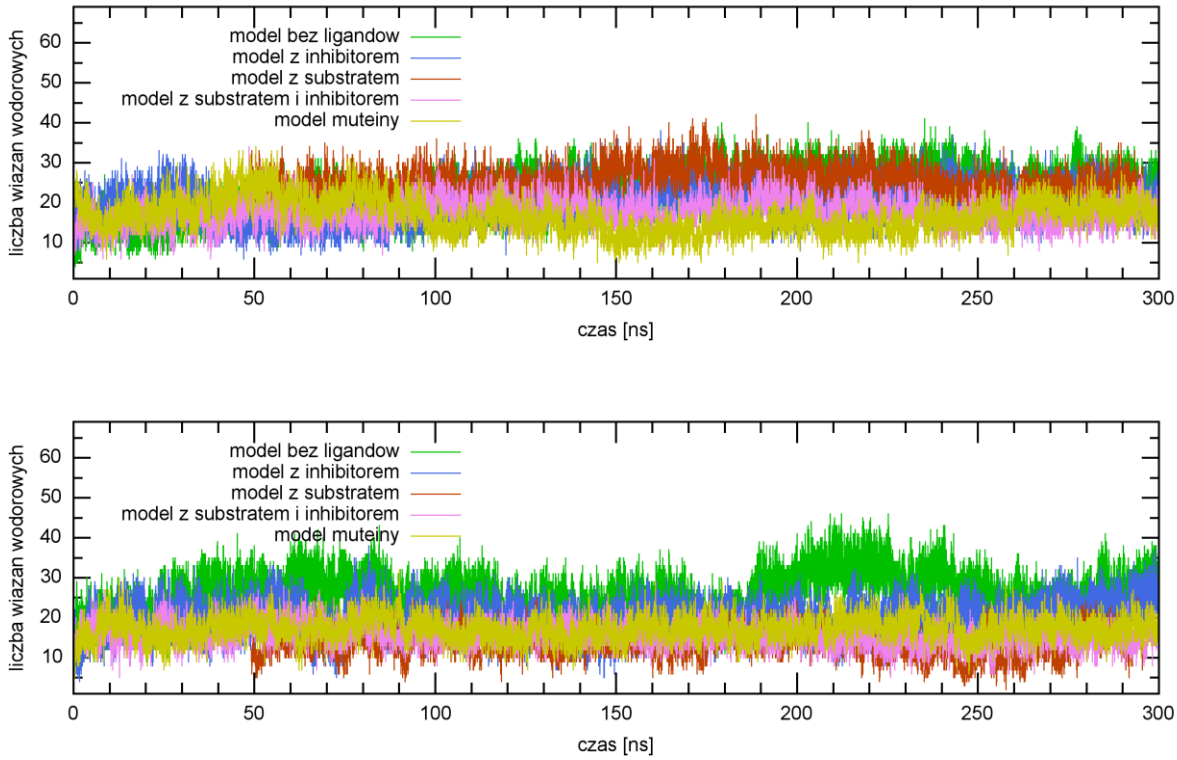


Rysunek 25: Struktura czwartorzędowa eukariotycznej domeny ISOM ze związanym substratem i inhibitorem.

Łańcuchy A, B, C, D zostały przedstawione jako żółte, niebieskie, czerwone i zielone tasiemki, zaś ligandy umiejscowione w swych miejscach wiążących przedstawiono na modelu powierzchniowym w kolorze fuksji (Fru-6-P) i turkusowym (UDP-GlcNAc).

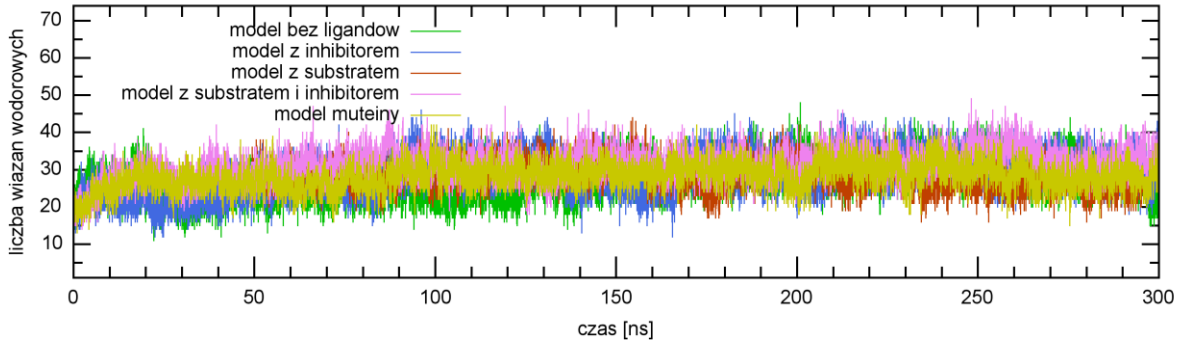
Rysunek 26 wraz z Rysunkiem 27, ilustrujące zmiany liczby wiązań wodorowych pomiędzy podjednostkami dimerów, wskazują iż, w przypadku dimera CD, w modelach białka natywnego bez związanego substratu występuje więcej wiązań wodorowych niż w domenach z substratem oraz w muteinie. W dimerze AB ta zależność jest nieco mniej widoczna, zwłaszcza iż podobnie do modeli bez substratu ewoluuje krzywa obrazująca ilość wiązań wodorowych dla modelu ze związanym substratem a bez inhibitora. Sumarycznie jednak, biorąc pod uwagę małą rozpiętość zmian w ilości wiązań wodorowych, nie powinny one mieć wpływu na dalszą analizę.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 26: Ewolucja liczby wiązań wodorowych pomiędzy podjednostkami dimera AB (powyżej) i CD (poniżej) dla domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach.

Jeśli chodzi o zmiany w ilości wiązań wodorowych pomiędzy dimerami, przebieg obrazujących je krzywych, pokazany na Rysunku 27 świadczy o tym, że nie było znaczących różnic pomiędzy analizowanymi układami. W Tabeli 4 wyraźnie wyróżnia się model domeny z samym substratem, dla którego między oboma dimerami występowała mniejsza ilość wiązań wodorowych niż we wszystkich innych modelach. Podobnie jak w przypadku ilości wiązań wodorowych pomiędzy podjednostkami dimerów AB i CD, zmiany te nie były jednak na tyle duże aby mieć znaczenie dla stabilności układu.



Rysunek 27: Ewolucja ilości wiązań wodorowych pomiędzy dimerami AB i CD dla domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela 4: Ilość wiązań wodorowych pomiędzy podjednostkami tworzącymi dimery AB i CD oraz pomiędzy tymi dimerami dla domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach.

Ilość wiązań wodorowych		Min	Max	Średnia
Model bez ligandów	**A-B**	4	41	22
	C-D	6	46	25
	AB-CD	11	48	28
Model z inhibitorem	**A-B**	5	38	20
	C-D	4	38	19
	AB-CD	12	46	29
Model z substratem	**A-B**	5	28	14
	C-D	7	36	21
	AB-CD	8	39	20
Model z substratem i inhibitorem	**A-B**	6	34	18
	C-D	5	28	16
	AB-CD	13	49	32
Model muteiny	**A-B**	5	34	17
	C-D	5	32	17
	AB-CD	13	42	28

III.2.1.3 Odległość pomiędzy białkiem a ligandami

Kolejną istotną kwestią było sprawdzenie czy w modelach zawierających ligandy wszystkie cząsteczki Fru-6-P oraz UDP-GlcNAc pozostały prawidłowo związane w trakcie symulacji. Dla obu tych ligandów przeprowadziłam analizy zmian odległości od ich kieszeni wiążących, zaś wnioski potwierdzone zostały za pomocą szczegółowych analiz wizualnych.

Substrat (Fru-6-P)

Jak wspomniałam w jednym z wcześniejszych rozdziałów, można uznać, iż substrat jest prawidłowo związany w centrum aktywnym jeśli odległość pomiędzy środkiem masy Ser406, Ser452 i Thr455 a atomem fosforu Fru-6-P jest mniejsza niż 0,150 nm.

Zmiany tych odległości w trakcie symulacji, zobrazowane na Rysunku 28 i w Tabeli 5, pokazują istotne różnice pomiędzy modelem niezawierającym inhibitora a zawierającym go.

Tabela 5: Odległość pomiędzy substratem i jego kieszenią wiążącą dla każdej z podjednostek tetrameru dla symulacji domeny ISOM niezwiązanej i związanej z inhibitorem

Odległość [nm]	*Model z substratem*				*Model z substratem i z inhibitorem*			
	A	**B**	**C**	**D**	**A**	**B**	**C**	**D**
Min	0,024	0,019	0,032	0,157	0,044	0,04	0,011	0,052
Max	0,304	0,528	0,519	0,664	0,346	0,430	0,350	1,607
Średnia	0,142	0,101	0,306	0,453	0,177	0,110	0,097	0,529

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W przypadku struktury związanej jedynie z substratem, tylko dwie (A i B) z czterech cząsteczek Fru-6-P pozostały prawidłowo umiejscowione w kieszeni wiążącej. Dla podjednostki A, średnia odległość wyniosła 0,142 nm co jest wprawdzie wartością o 0,034 nm wyższą niż średnia odległość w strukturze krystalicznej, ale nadal w akceptowalnym zakresie długości wiązań fosfor-tlen. Krzywa przedstawiona na Rysunku 28 pokazuje, iż odległość ustabilizowała się około setnej nanosekundy symulacji i odtąd utrzymała się na stałym poziomie około 0,135 nm. Jakościowo podobne zmiany dotknęły sąsiednią podjednostkę B – nieco niestabilna na początku symulacji, w dużej mierze ustabilizowała się po 65. ns dynamiki i osiągnęła plateau 50 ns później. Inaczej niż dla podjednostki A, wartość średniej odległości dla podjednostki B była odrobinę poniżej wartości odniesienia (0,101 nm wobec 0,108 nm w strukturze krystalicznej), a zatem, bez cienia wątpliwości, cząsteczka substratu pozostała prawidłowo związana w centrum katalitycznym podjednostki B.

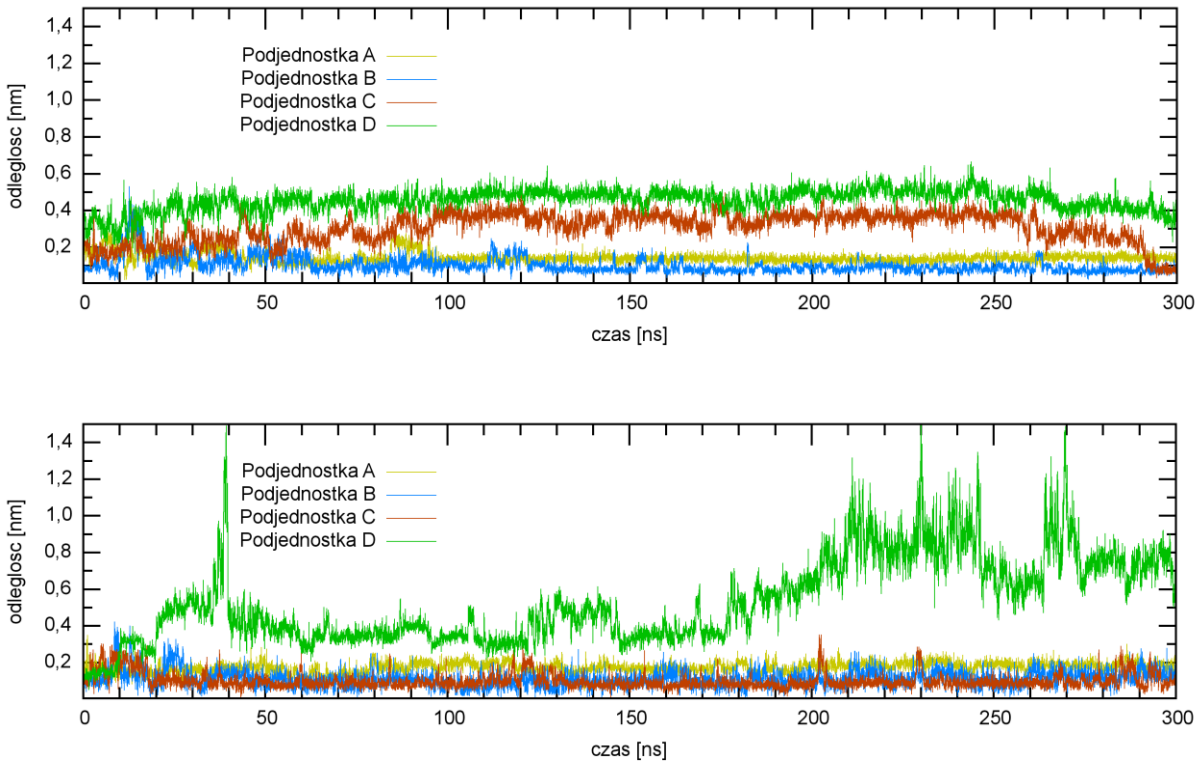
W przeciwieństwie do dimera AB, dla podjednostek dimera CD żadna z cząsteczek substratu nie może zostać uznana za prawidłowo związaną w centrum aktywnym białka. Pomimo, że w trakcie całej symulacji Fru-6-P pozostał w kieszeni wiążącej, co zostało stwierdzone za pomocą analizy wizualnej, grupa fosforanowa znajdowała się za daleko od kotwiczących ją atomów tlenu, co uniemożliwiłoby aktywność katalityczną enzymu. Na wykresie przebiegu odległości dla podjednostki C można zaobserwować istotną zmianę, mającą miejsce na samym końcu symulacji (około 290. ns) – średnia wartość zmalała od około 0,350 nm do 0,007 nm. Ta obserwacja związana jest z prawidłowym umiejscowieniem się substratu w centrum aktywnym i z wytworzeniem pożądanych wiązań pomiędzy atomem fosforu a triadą tlenową. Można zatem uznać, że przez niemal całą symulację Fru-6-P stabilizował się w swej kieszeni wiążącej. Ta sama tendencja, choć w mniejszym stopniu, widoczna jest dla podjednostki D. Możliwe, że gdyby symulacja była dłuższa, oba ligandy dimera CD ustabilizowałyby się na prawidłowej pozycji i, wówczas, tetramer domen ISOM zostałby wysycony czterema cząsteczkami Fru-6-P, tak jak ma to miejsce w strukturze krystalicznej.

Wykres zmian odległości dla podjednostek kompleksu białka z substratem i z inhibitorem, przedstawiony na Rysunek 28, jasno obrazuje istotne różnice w porównaniu do białka związanego jedynie z substratem. W tym przypadku już na pierwszy rzut oka widać, że odległości dla podjednostek: A, B i C nie ulegały dużym zmianom, w przeciwieństwie do podjednostki D. Tym niemniej, z porównania średnich wartości odległości wynika, że jedynie dla łańcuchów B i C ligand pozostawał w akceptowalnej odległości od kieszeni wiążącej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Cząsteczki Fru-6-P należące do podjednostek B i C (położonych naprzeciw siebie ale należących do przeciwnych dimerów, jak pokazuje Rysunek 25), pozostały związane z kotwiczącymi atomami tlenu wewnątrz kieszeni wiążącej, co potwierdzają krzywe na wykresie (Rysunek 28) oraz wartości przedstawione w Tabeli 5, wynoszące 0,110 nm i 0,097 nm odpowiednio dla podjednostek B i C. Proces stabilizacji przebiegł dość szybko i już po pierwszych 20-30 ns symulacji zakres fluktuacji znacząco się obniżył.

Jeśli zaś chodzi o dwie pozostałe cząsteczki substratu, należące do łańcuchów A i D, dla obu z nich wartość średniej odległości okazała się wyższa niż wartość odniesienia (0,177 nm dla podjednostki A i 0,529 nm dla podjednostki D), aczkolwiek krzywe obrazujące zachodzące dla nich zmiany były swym przeciwieństwem – dla D, ligand wysunął się z kieszeni wiążącej już na początku (około dziesiątej ns) symulacji i nie udało mu się osiągnąć jakiejkolwiek stabilizacji, podczas gdy dla jego odpowiednika w łańcuchu A pozostał stabilnie umiejscowiony wewnątrz kieszeni wiążącej, tyle że zmierzona odległość była nieznacznie wyższa niż w krysztale. Ponieważ różnica ta jest bardzo mała (ok. 0,01 nm) a analiza wizualna nie wykazała w tym przypadku anomalii, zdecydowałam się nie odrzucać tej podjednostki do dalszych analiz.



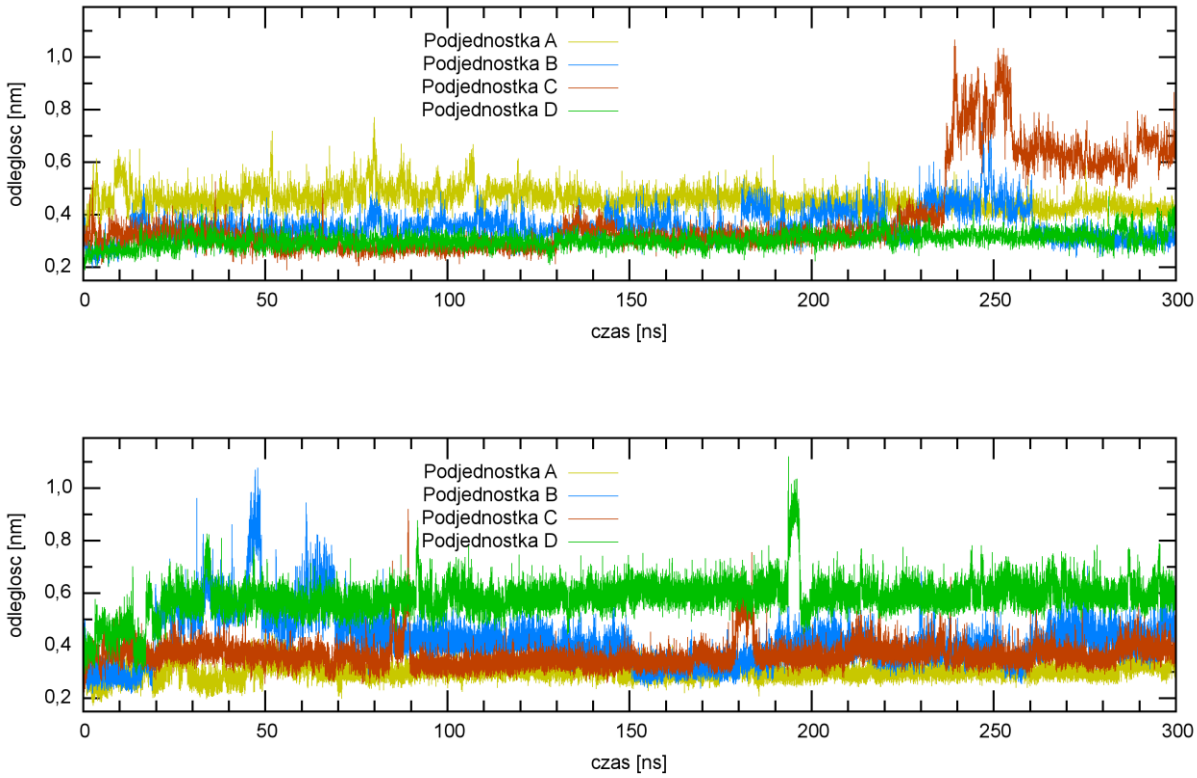
Rysunek 28: Ewolucja odległości pomiędzy substratem i jego kieszenią wiążącą dla każdej z podjednostek tetramera dla symulacji domeny ISOM niezwiązanej (powyżej) i związanej (poniżej) z inhibitorem.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Inhibitor (UDP-GlcNAc)

W przypadku inhibitora przyjęłam, iż jest on w swym miejscu wiązania jeśli środek masy reszt Cys489, Gly490 i His492 znajduje się w promieniu 0,550 nm od atomu C4 należącego do uracylowej części UDP-GlcNAc.

Zmiany tych odległości w trakcie dynamiki, zmierzone dla modeli domeny ISOM ze związanym inhibitorem oraz z substratem i inhibitorem, przedstawione są na Rysunku 29 i w Tabeli 6.



Rysunek 29: Ewolucja odległości pomiędzy atomem C4 należącym do uracylowej częścią inhibitora a atomami Cα trzech wybranych reszt należących do kieszeni wiążącej inhibitor dla każdej z podjednostek tetramera dla symulacji domeny ISOM niezwiązanej (powyżej) i związanej (poniżej) z substratem.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Dla symulacji domeny ISOM bez substratu, na wykresie już na pierwszy rzut oka wyróżnia się podjednostka D, dla której zmierzone wartości były o co najmniej 0,2 nm wyższe niż dla pozostałych podjednostek. Obserwacje te potwierdzają wartości średnie odległości – dla tego łańcucha są one zdecydowanie najwyższe. Co zaskakujące jednak, analiza wizualna pozwoliła stwierdzić, że pomimo wartości średnich przekraczających wyznaczoną wartość 0,550 nm, ligand pozostał w kieszeni wiążącej. Co prawda około 190. ns wysunął się z niej, ale już 10 ns później z powrotem wrócił na swe stabilne położenie. Ponieważ wartość średnia odległości jest o mniej niż 0,05 nm wyższa niż zmierzona w krysztale i zawiera w sobie wspomniane chwilowe wysunięcie, stwierdziłam, że nie jest to podstawą dla odrzucenia tej podjednostki z dalszych analiz. Inaczej ma się natomiast sprawa z łańcuchem B, dla którego na wykresie widać znaczące zmiany, jakich struktura doświadcza w trakcie pierwszych stu ns symulacji. Krzywa na Rysunku 29 wspólnie z analizą wizualną potwierdziły zgodnie, iż na początku symulacji ligand wysunął się ze swego miejsca wiążącego, i powrócił tam dopiero około 70. ns symulacji. Powinno zatem zostać odnotowane, że dla tej podjednostki, podczas pierwszych 70 ns symulacji UDP-GlcNAc nie wypełniał swej roli inhibitora enzymu.

Tabela 6: Odległość pomiędzy inhibitorem i jego kieszenią wiążącą dla każdej z podjednostek tetrameru dla symulacji domeny ISOM niezwiązanej i związanej z substratem

Odległość [nm]	***Model z inhibitorem***				***Model z substratem i z inhibitorem***			
	A	**B**	**C**	**D**	**A**	**B**	**C**	**D**
Min	0,202	0,217	0,224	0,256	0,253	0,199	0,190	0,190
Max	0,668	1,075	0,918	1,117	0,768	0,750	1,064	0,468
Średnia	0,394	0,416	0,363	0,582	0,457	0,356	0,388	0,302

W przypadku kompleksu domeny ISOM z oboma ligandami, w oparciu o wartości średnie odległości (Tabela 6) można by uznać, że wszystkie cztery cząsteczki UDP-GlcNAc pozostały prawidłowo związane w kieszeni wiążącej. Jednakże wykres zmian odległości w trakcie symulacji, pokazany na Rysunku 29, wyjawia niejednorodność ewolucji podjednostek: dla A, B i D odległości nie ulegały dużym zmianom na przestrzeni symulacji a ich wartości średnie pozostawały w zakresie do 0,550 nm. Z kolei dla podjednostki C, z Rysunku 29 jasno wynika, że ok 235. ns zaszła raptowna zmiana w odległości inhibitora od jego kieszeni wiążącej, w wyniku której cząsteczka odsunęła się o ponad 0,2 nm od miejsca wiązania. Analiza wizualna tego fragmentu symulacji potwierdziła, że wspomniana zmiana tożsama jest z odsunięciem się UDP-GlcNAc od swej kieszeni wiążącej.

Z powyższych rozważań wynika, iż ze wszystkich analiz uwzględniających wpływ inhibitora dla modelu ze związanym inhibitorem powinno się wykluczyć pierwsze 70 ns dla podjednostki B, zaś dla modelu z oboma ligandami – ostatnie 70 ns symulacji dla podjednostki C.

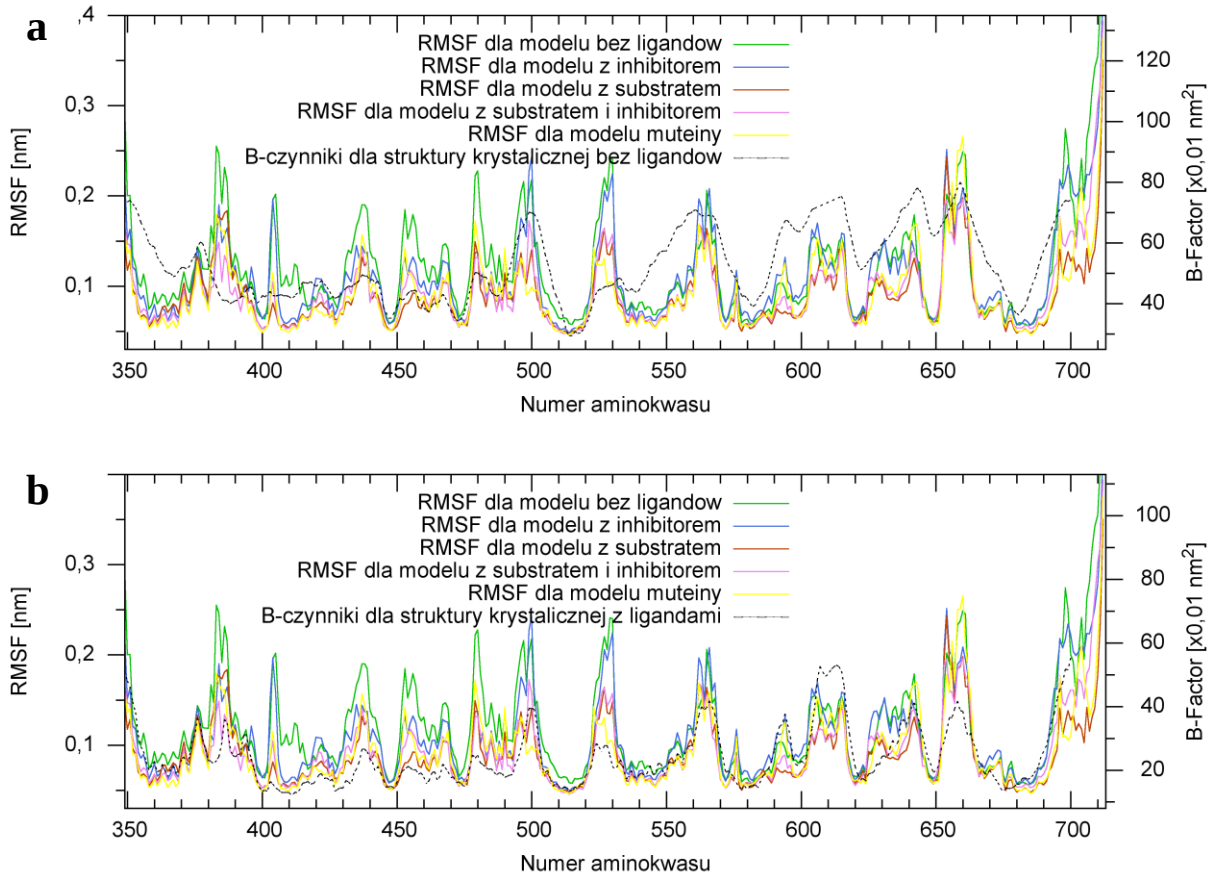
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Podsumowując rozważania dotyczące jakości związania ligandów w ich centrach wiążących należy zauważyć, iż na chwilę obecną brak jest danych eksperymentalnych jednoznacznie potwierdzających, że w warunkach fizjologicznych, eukariotyczna syntaza GlcN-6-P wiąże jednocześnie cztery cząsteczki inhibitora lub/oraz cztery cząsteczki substratu. Co prawda wygląda to w ten sposób na strukturach krystalicznych, ale powinno się brać pod uwagę, iż te kryształy zostały otrzymane poprzez wysycenie enzymu roztworem liganda a zatem niekoniecznie odpowiadają one warunkom komórkowym. Co za tym idzie, możliwe jest, iż obserwowane zjawiska nie są anomaliami a odzwierciedlają prawdziwy stan związanego z ligandami enzymu na danej przestrzeni czasu. Tym niemniej, dla zachowania prawidłowości badań, łańcuchy z nieprawidłowo związanym Fru-6-P nie zostały wzięte pod uwagę we wszystkich analizach dotyczących oddziaływań pomiędzy białkiem a substratem. Analogicznie, podjednostki w których UDP-GlcNAc nie był związany prawidłowo, zostały wykluczone z analiz oddziaływań pomiędzy białkiem a inhibitorem.

III.2.1.4 Wiarygodność symulacji

Jak wspomniane zostało wcześniej, analiza wiarygodności symulacji możliwa jest dzięki współczynnikom temperaturowym, zawartym w zdeponowanych w bazie RCSB strukturach krystalicznych. Porównanie B-czynników z uśrednionymi wartościami RMSF dla węgli α może stanowić dobry wskaźnik odwzorowania rzeczywistości przez daną symulację. Wyniki tych analiz, zilustrowane na Rysunku 30, przede wszystkim wskazują na duże podobieństwo zachowania poszczególnych reszt aminokwasowych zarówno pomiędzy przeprowadzonymi symulacjami, jak również w stosunku do wartości krystalograficznych czynników temperaturowych – dla niektórych fragmentów struktury (np. 390-400 czy 510-520) wszystkie krzywe praktycznie pokrywają się. Ponadto, wyraźnie widoczne jest, iż fluktuacje atomów odwzorowane przez wszystkie symulacje o wiele bardziej przypominają B-czynniki struktury krystalicznej kompleksu z ligandami (PDB: 2PUV) niż białka w stanie wolnym (PDB: 2PUW). Ta obserwacja nie jest specjalnie zaskakująca, jako że wszystkie dynamiki molekularne oparte zostały na modelach powstałych właśnie ze struktury krystalicznej kompleksu (powodem tego była lepsza rozdzielczość niż dla modelu bez ligandów).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 30: Porównanie wartości RMSF dla domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach z wartościami krystalograficznych B-czynników modelu bez ligandów – 2PUW (a) oraz z ligandami - 2PUV (b). Wartości RMSF zostały policzone dla atomów Cα i uśrednione po podjednostkach, wartości B-czynników są uśrednione po atomach danego aminokwasu a następnie po podjednostkach. Wartości B-czynników dla brakujących w strukturze krystalicznej aminokwasów (m.in. ogon-C) są nieobecne.

Warto odnotować również, iż B-czynniki w strukturze wolnej mają ogólnie wyższe wartości niż w strukturze związanej (por. wartości na osi y2 na Rysunku 30), co świadczy o wyższej ruchliwości tego modelu i może być bezpośrednią przyczyną większej ilości brakujących fragmentów w PDB: 2PUW w porównaniu do PDB: 2PUV.

Pomimo brakujących danych dla niektórych reszt aminokwasowych w strukturach krystalicznych, można uznać, iż, ogólnie, odwzorowanie zachowania białka przez wszystkie przeprowadzone dynamiki jest bardzo dobrej jakości, a zatem wiarygodność symulacji została potwierdzona. Należy tu wspomnieć, iż średnie fluktuacje Cα dla wszystkich symulacji były liczone na przedziale 20-300 ns, nieuwzględniającym wyników analizy zbieżności trajektorii. Porównanie B-czynników z wartościami RMSF liczonymi na wybranych przedziałach przedstawiłam w dalszej części rozdziału (Rysunek 31).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.1.5 Zbieżność trajektorii

Zgodnie z opisaną wcześniej procedurą, do analizy zbieżności na danych przedziałach posłużyłam się wartościami wyznaczonych wektorów własnych, dla których obliczyłam wartości współczynnika cc. W ramach poszukiwań najoptymalniejszego cc, przetestowałam wiele kombinacji przedziałów dla każdej z analizowanych trajektorii.

W trakcie tych badań odnotowałam pewną zależność: otóż dla wszystkich modeli, wartości współczynnika cc dla pierwszych wektorów własnych były tak wysokie (rzędu 0,8-0,9), że gdyby w dalszej analizie uwzględnić całe trajektorie (lub nawet trajektorie po osiągnięciu stanu równowagi), oszacowanie skorelowanych ruchów białka byłoby za mocno zanieczyszczone losową dyfuzją by móc wysuwać na ich podstawie jakiekolwiek wnioski. Poszukiwania najdłuższych, a zarazem spełniających warunek zbieżności zarówno dla całego białka jak i dla każdej z jego podjednostek oddzielnie przedziałów, prowadzone były metodą prób i błędów, aczkolwiek przy uwzględnieniu sugestii pochodzących z analizy wykresów RMSD. Okazało się, iż dla wszystkich przypadków, spośród licznych testowanych przedziałów najlepsze wyniki osiąga się dla przedziału prawie pokrywającego się z drugą połową trajektorii. Dla obu modeli ze związanym w centrum aktywnym substratem, przedział ten obejmował fragment 140-300 ns, zaś dla pozostałych trzech wariantów – 145-300 ns. Wartości współczynnika cc pierwszych głównych składowych dla wybranych do dalszej analizy przedziałów oraz dla reszty trajektorii, zostały zebrane w poniższej Tabeli 7. Jak widać, wszystkie wartości są poniżej 0,5 co, dla struktury tej wielkości, może być świadectwem dobrego próbkowania hiperpowierzchni energii potencjalnej. Można zatem uznać, że warunek zbieżności trajektorii na wyznaczonych przedziałach został spełniony.

Jako ciekawostkę warto w tym momencie odnotować, iż, jak wynika z Tabeli 7, we wszystkich przypadkach również pozostały fragment trajektorii, pokrywający się z fazą dalszej stabilizacji cząsteczki, spełniał warunek zbieżności. Oznacza to, że etap równoważenia, co prawda dość długi, przebiegał w sposób uporządkowany i pozbawiony chaotycznych oscylacji.

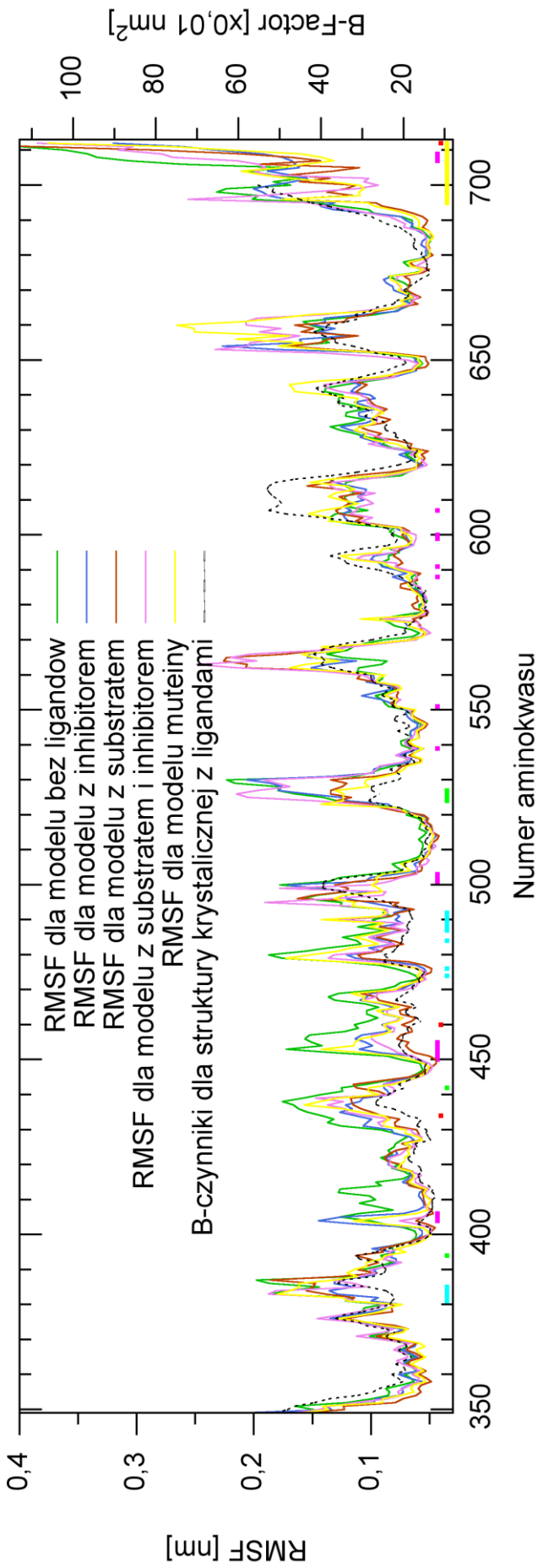
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Na Rysunku 31 przedstawiłam analogiczne do Rysunku 30 porównanie średnich fluktuacji aminokwasów na wyznaczonych przedziałach z krystalograficznymi B-czynnikami. Na wykresie tym widać jeszcze dokładniejsze nakładanie pewnych fragmentów krzywych, świadczące o podobnym stopniu ruchliwości odpowiadających im reszt aminokwasowych. Z drugiej strony, zaobserwować można również istotne rozbieżności w ruchliwości innych fragmentów, które to mogą wynikać z różnic w badanych modelach. Ponieważ część tych fragmentów pokrywa się z miejscami istotnymi dla funkcjonowania białka, tj. z centrum aktywnym, miejscem wiązania inhibitora, ogonami-C czy też aminokwasami ważnymi dla struktury tetramerycznej domeny ISOM, a zatem z widocznych różnic mogą wynikać konsekwencje biologiczne. Wykres ten stanowi zatem dobry punkt wyjścia i podstawę do analizy strukturalnej poddawanych symulacji modeli.

Tabela 7: Wartości współczynnika cosinus content dla pierwszych wektorów własnych domeny ISOM we wszystkich analizowanych wariantach; dla modeli bez substratu I przedział oznacza fragment 20-145 ns a II przedział: 145-300 ns, zaś dla modeli z substratem przedziały te odpowiadają 20-140 i 140-300 ns.

Współczynnik cc		**Pierwszy przedział**	**Drugi przedział**
Model bez ligandów	**Tetramer**	0,502	**0,487**
	A	0,343	**0,415**
	B	0,131	**0,228**
	C	0,056	**0,462**
	D	0,318	**0,461**
Model z inhibitorem	**Tetramer**	0,474	**0,446**
	A	0,288	**0,272**
	B	0,486	**0,490**
	C	0,086	**0,378**
	D	0,158	**0,456**
Model z substratem	**Tetramer**	0,319	**0,439**
	A	0,272	**0,467**
	B	0,021	**0,405**
	C	0,095	**0,229**
	D	0,254	**0,410**
Model z substratem i inhibitorem	**Tetramer**	0,069	**0,359**
	A	0,417	**0,482**
	B	0,007	**0,096**
	C	0,002	**0,235**
	D	0,019	**0,488**
Model muteiny	**Tetramer**	0,299	**0,495**
	A	0,273	**0,182**
	B	0,415	**0,419**
	C	0,221	**0,404**
	D	0,268	**0,000**

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 31: Porównanie wartości krystalograficznych B-czynników modelu domeny ISOM z ligandami (2PUV) z wartościami RMSF obliczonymi dla istotnych dla dalszej analizy przedziałów wszystkich analizowanych modeli domeny ISOM. Wartości RMSF zostały policzone dla atomów Cα i uśrednione po uwzględnianych podjednostkach, wartości B-czynników są uśrednione po atomach danego aminokwasu a następnie po podjednostkach. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.2 Analiza strukturalna

Analiza strukturalna chronologicznie podzielona była na dwa etapy. Pierwszy z nich polegał na porównaniu symulacji modeli tetrameru domen ISOM syntazy GlcN-6-P w stanie wolnym oraz w kompleksie z UDP-GlcNAc i pozwolił zaobserwować pewne zmiany w ruchliwości ważnych z funkcjonalnego punktu widzenia fragmentów domeny ISOM które mogłyby mieć związek z inhibicją enzymu pod wypływem UDP-GlcNAc.

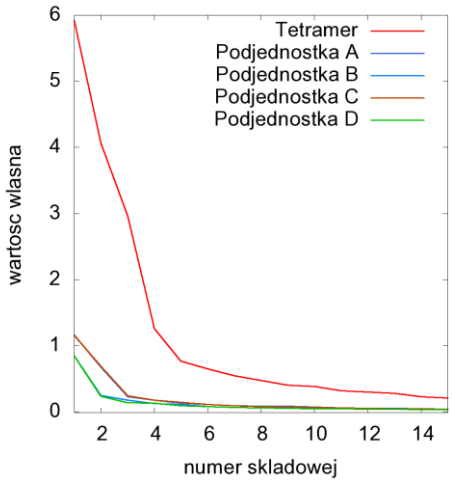
Jednakowoż, propozycje te oparte były na badaniach przeprowadzonych dla domeny izomerazowej bez żadnych ligandów oraz dla jej analogu ze związanym inhibitorem a, jak wiadomo, w każdej z dostępnych struktur krystalicznych domeny ISOM zawierających inhibitor (PDB: 2PUV, 2 PUT, 2POC), obecny jest związany w centrum aktywnym substrat cukrowy enzymu (bądź też jego analog). Ponadto, wciąż pozostaje kwestią otwartą czy UDP-GlcNAc wiąże się do enzymu wolnego, czy też do zawierającego już substrat. Zatem, naturalną koleją rzeczy było przeprowadzenie symulacji dla analogicznych struktur domeny ISOM niezwiązanej i związanej z inhibitorem, różniących się jedynie obecnością fruktozo-6-fosforanu w centrum aktywnym i sprawdzenie czy otrzymane w pierwszym etapie wyniki znajdują potwierdzenie w symulacjach z substratem.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.2.1 Analiza metodą głównych składowych

Aby opisać skorelowane ruchy białka podczas symulacji i wyodrębnić najistotniejsze tendencje zmian geometrii struktury, posłużyłam się opisaną wcześniej metodą głównych składowych, analizując parami modele niezawierające i zawierające związany w centrum aktywnym fruktozo-6-fosforan.

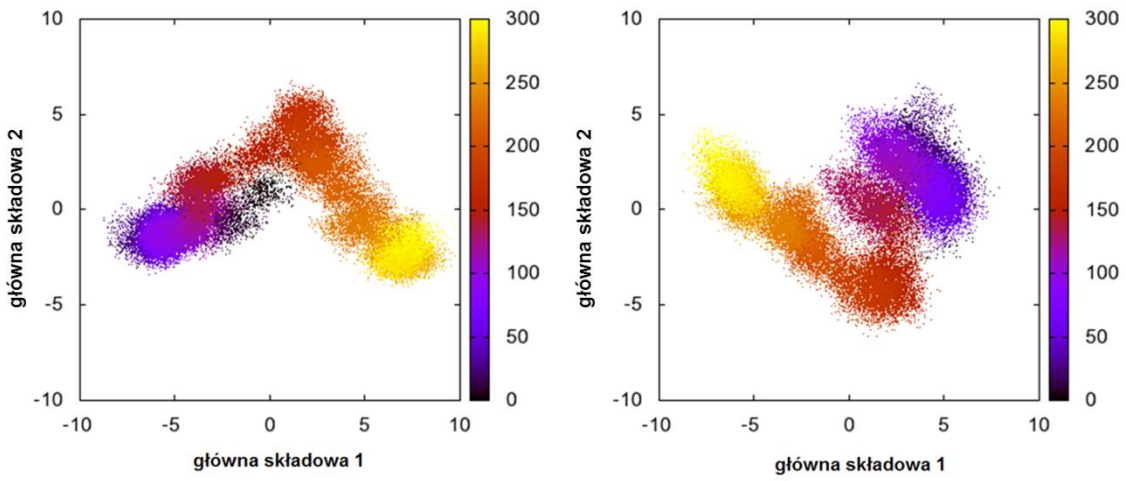
Charakterystyczną cechą metody PCA jest redukcja wymiarowości analizowanego zagadnienia: zwykle już kilka pierwszych głównych składowych pozwala wyjaśnić większość zmienności układu, przy czym procent wyjaśnianej wariancji maleje wraz z każdą kolejną główną składową. W oparciu o wartości własne wektorów, na podstawie wykresów osypiska (którego przykład przedstawiłam na Rysunku 32), zdecydowałam się oprzeć analizy na dwóch pierwszych głównych składowych.



Rysunek 32: Wykres osypiska dla modelu domeny ISOM w stanie wolnym. Krzywe obrazują tempo spadku wartości własnych, czyli procentu wyjaśnionej wariancji dla kolejnych głównych składowych. Składowe znajdujące się na prawo od punktu kończącego osypisko, czyli punktu na wykresie, w którym tempo spadku stabilizuje się, reprezentują znikomą wariancję i przedstawiają w większości losowy szum.

Dwuwymiarowe rzutowania trajektorii uzyskanych dla modeli bez Fru-6-P, na płaszczyznę dwóch pierwszych wektorów własnych (Rysunek 33) wykazało, iż około 150. nanosekundy symulacji, obie wersje białka doświadczyły zmiany kierunku ewolucji strukturalnej. Ponieważ analiza zbieżności wykazała, że dla obu przypadków 145-ta nanosekunda była rozgraniczeniem pomiędzy etapem równoważenia białka a dalszą częścią symulacji, podczas której były zbierane dane do analizy strukturalnej, postanowiłam bliżej przyjrzeć się tej zmianie i zidentyfikować aminokwasy, których dotyczyła ona w największym stopniu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 33: Rzutowanie trajektorii na płaszczyznę pierwszej i drugiej głównej składowej dla modelu domeny ISOM w stanie wolnym (a) i związanej z inhibitorem (b). Skala kolorów ilustruje czas symulacji [ns].

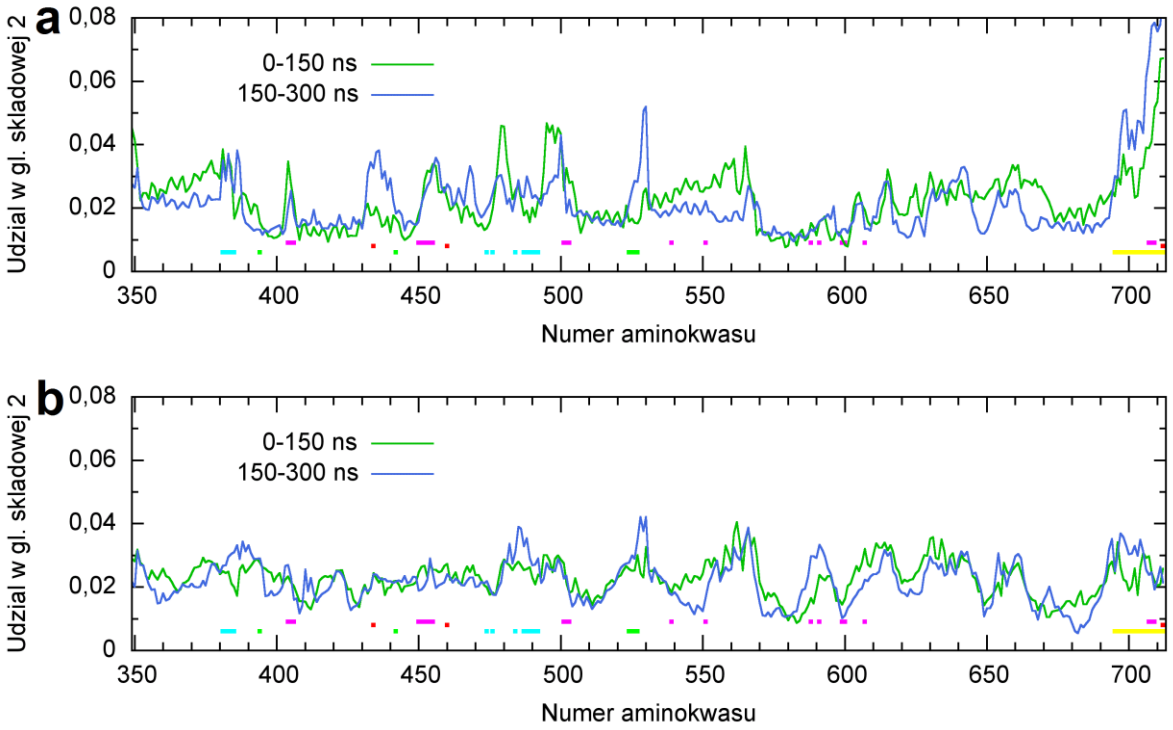
Jak widać na Rysunku 33, można wyróżnić istotne podobieństwa pomiędzy wykresami, aczkolwiek dla modelu białka bez ligandów ewolucja jest zdecydowanie bardziej regularna. Na jej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, że zmiany zachodzące w ewolucji struktury są symetryczne względem prostej równoległej do osi drugiej głównej składowej. W przypadku modelu ze związanym UDP-GlcNAc, ta zmiana jest również widoczna i również ma miejsce około 150. ns symulacji. Najistotniejsze różnice pomiędzy oboma wariantami struktury polegają na tym, że dla białka z inhibitorem symetria wykresu jest mniej uwydatniona niż dla domeny wolnej, co może być wytłumaczone krótszym czasem stabilizacji układu, oraz przeciwnym kierunkiem ruchu wzdłuż zarówno wzdłuż pierwszej, jak i drugiej głównej składowej.

Aby zbadać jak wyżej wymieniona zmiana kierunku ewolucji układów przekłada się na zachowanie białka, zidentyfikowałam reszty najbardziej zaangażowane w ruchy wzdłuż drugiego wektora, względem którego odnotowana została symetria zmian.

Jak wynika z Rysunek 34a, dla modelu domeny ISOM bez ligandów, fragment o największym znaczeniu, wspólny dla zakresów przed i po zmianie kierunku, obejmuje kilkanaście C-końcowych reszt, odpowiadających ogonowi-C. Jest to jednocześnie fragment, którego zmiana dotknęła w największym stopniu – jego i tak największy wkład w ruchy wzdłuż drugiej składowej zwiększył się jeszcze w drugiej połowie dynamiki. Na wykresie wyróżnia się też fragment złożony z reszt 525-530, który to odpowiada powierzchni styku pomiędzy dimerami. Na pierwszym etapie nieznaczny, udział ruchów tego fragmentu w drugiej głównej składowej znacząco wzrósł po zmianie kierunku ewolucji struktury.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Natomiast w przypadku modelu domeny ze związanym inhibitorem, wkład poszczególnych reszt aminokwasowych w ruchy wzdłuż drugiej głównej składowej był bardziej jednorodny niż dla domeny wolnej i nie uległ znaczącym zmianom po wystąpieniu zmiany kierunku ewolucji strukturalnej (Rysunek 34b). Oznacza to, iż ewolucja struktury zachodząca wzdłuż tego wektora nie dotyczy żadnych konkretnych reszt aminokwasowych oraz, że zmiana kierunku nie odzwierciedla gwałtownej zmiany strukturalnej, a raczej stopniową zmianę kierunku ewolucji układu.



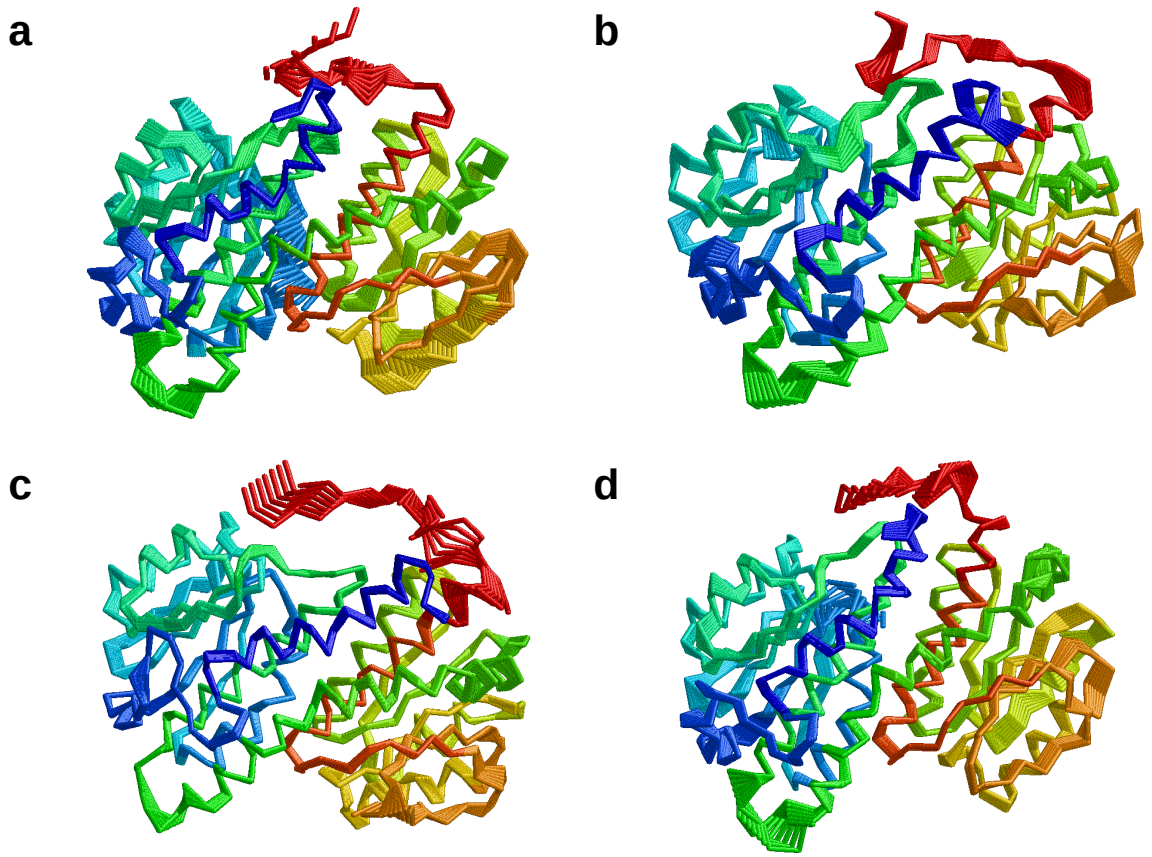
Rysunek 34: Porównanie wkładu poszczególnych aminokwasów w ruchy wzdłuż drugiej głównej składowej pomiędzy wybranymi przedziałami, dla wolnej (a) i związanej z inhibitorem (b) domeny ISOM. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru ; w analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetrameryczne białka (zielony) i ogon-C (żółty).

Porównanie obu wykresów jasno wskazuje, że skoro odpowiadające sobie wektory dla obu wersji domeny ISOM nie opisują tych samych ruchów, zmiany geometrii zachodzące wzdłuż drugiej głównej składowej nie mogą być bezpośrednio porównywane. Tym niemniej, obecność zmiany kierunku ewolucji struktury w około połowie symulacji jest niezaprzeczalna.

Analogiczna analiza przeprowadzona dla modeli ze związanym substratem dała mniej jednoznaczne wyniki, aczkolwiek również widoczna jest zmiana geometrii i również ma ona miejsce w około połowie symulacji. Tym samym, rozgraniczenie trajektorii na dwa niezależne przedziały, sugerowane przez wyniki analizy zbieżności, znalazło dodatkowe uzasadnienie.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

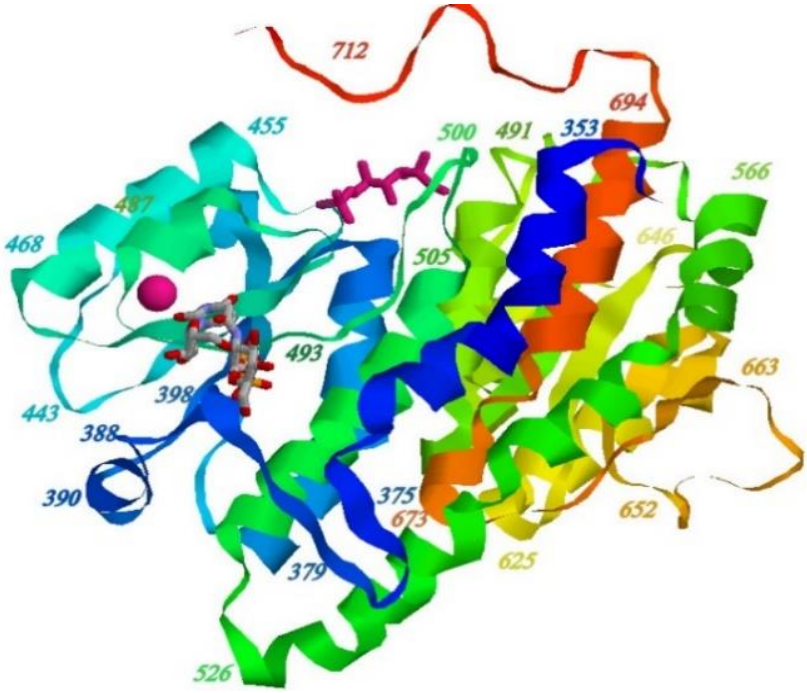
Powyższe rozważania skupiały się na analizie drugiej głównej składowej, gdyż to wzdłuż niej odnotowałam istotną zmiany geometrii układu. Ponieważ jednak to pierwsza składowa wyjaśnia największy procent wariancji układu, w celu zobrazowania głównych ruchów białka na wyznaczonych za pomocą analizy zbieżności przedziałach trajektorii, wyodrębniłam zmiany zachodzące wzdłuż tej składowej. Uśrednione po podjednostkach struktury dla czterech analizowanych wariantów domeny ISOM przedstawione są na Rysunku 35.



Rysunek 35: Zakres ruchów wzdłuż pierwszej głównej składowej dla modeli domeny ISOM w stanie wolnym (a), związanej z inhibitorem (b), związanej z substratem (c) i związanej z substratem i inhibitorem. Rysunki powstały poprzez wizualizację pozycji krańcowych i interpolację pięciu struktur przejściowych pomiędzy nimi. W analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Wartości zostały uśrednione po uwzględnianych podjednostkach (A, B, C, D dla modeli bez substratu ; A i B dla modeli z substratem). Skala kolorów odpowiada pozycji danego aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym, gdzie N-końcowe reszty oznaczone są na granatowo a C-końcowe na czerwono.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wyraźnie widać na nim istotne różnice w ruchliwości poszczególnych fragmentów. Te wyniki wyglądają szczególnie interesująco, gdy zestawi się je z Rysunkiem 36, na którym obecne są ligandy, a poszczególne fragmenty struktury opisane są numeracją odpowiadającą im w strukturze krystalicznej i stosowaną w niniejszych badaniach. Porównanie to pozwala stwierdzić, że w wyniku związania inhibitora, zmniejszył się zakres ruchu m.in. reszt aminokwasowych leżących w sąsiedztwie UDP-GlcNAc oraz tworzących ogon-C. Wydaje się to spójne ze zmianami fluktuacji poszczególnych aminokwasów przedstawionymi na Rysunku 31 i, ze względu na biologiczną funkcjonalność wymienionych fragmentów, zasługuje na bardziej szczegółową analizę.



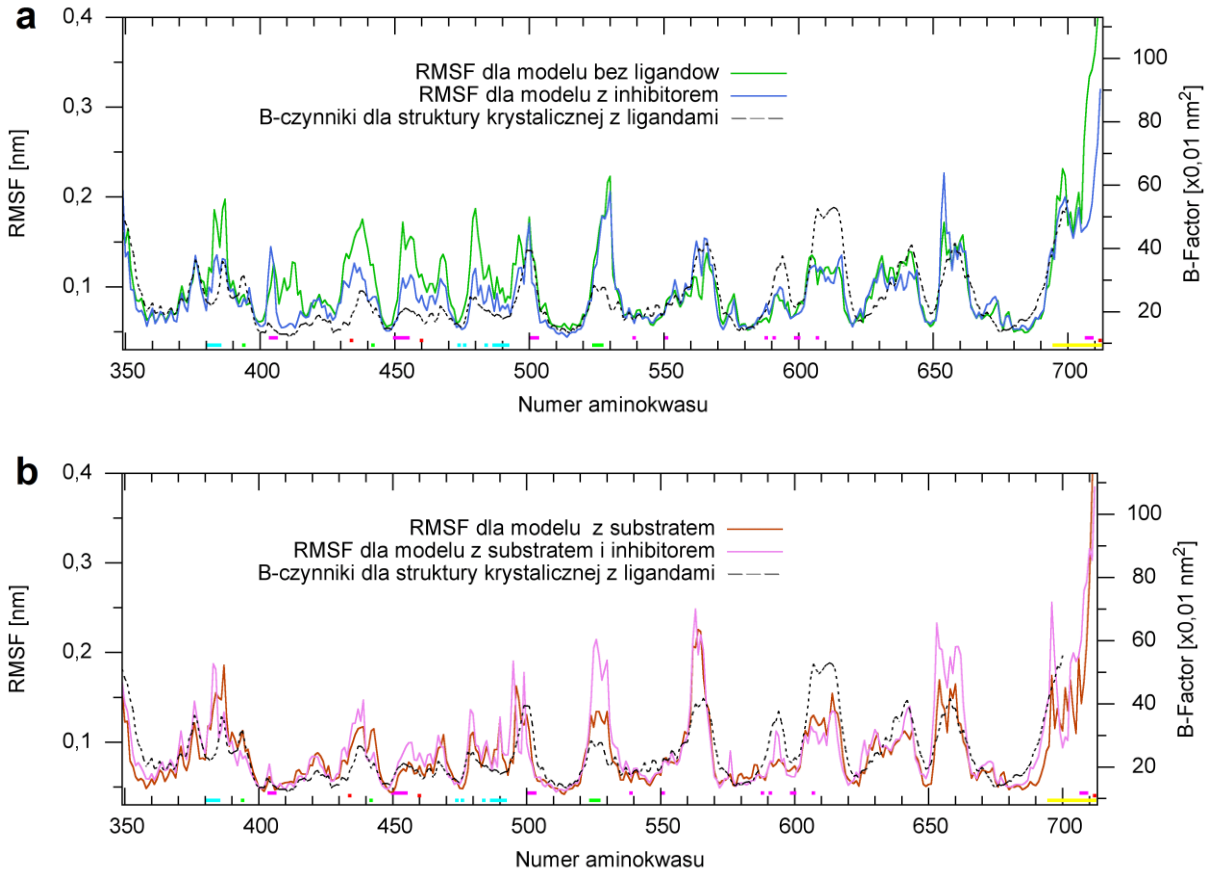
Rysunek 36: Monomer domeny ISOM z białka Gfa1 wraz z numeracją reszt aminokwasowych stosowaną w strukturach krystalicznych (opracowanie własne na podstawie PDB: 2PUT uzupełnionego o brakujące fragmenty za pomocą modelowania homologicznego wykonanego przez dr inż. M. Wojciechowskiego).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.2.2 Porównanie ruchliwości atomów węgla α

Porównanie wartości RMSF dla par symulacji modeli z inhibitorem i bez niego z wartościami krystalicznych czynników temperaturowych przedstawiłam na Rysunku 37.

Jak widać, pod nieobecność substratu fluktuacje atomów dla inhibowanej wersji domeny ISOM bardziej przypominały B-czynniki niż dla jej niezwiązanego z UDP-GlcNAc wariantu. Jest to zgodne z oczekiwaniami, gdyż wartości czynników temperaturowych przedstawionych na wykresie pobrane zostały ze struktury krystalicznej domeny ISOM ze związanym UDP-GlcNAc, z której to wywodzą się struktury początkowe obu modeli.



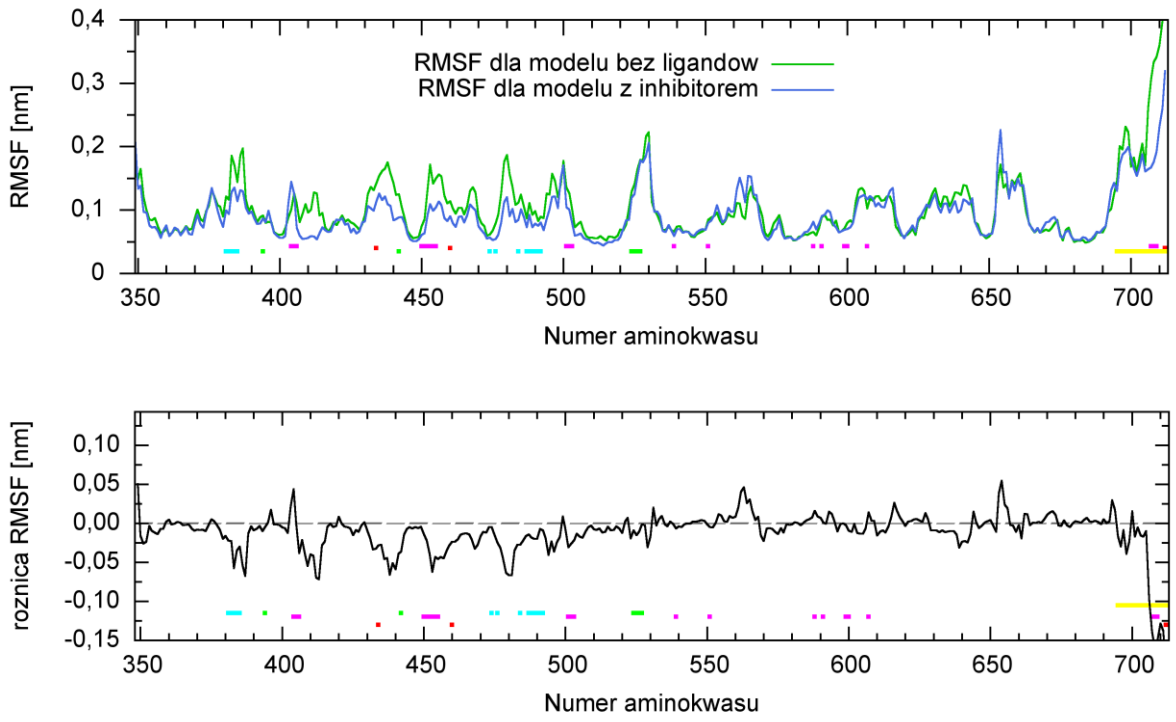
Rysunek 37: Porównanie wartości krystalograficznych B-czynników modelu domeny ISOM z ligandami (2PUV) z wartościami RMSF obliczonymi dla istotnych dla dalszej analizy przedziałów modeli domeny ISOM bez substratu (a) oraz z substratem (b). Wartości RMSF zostały policzone dla atomów Cα i uśrednione po uwzględnianych podjednostkach, wartości B-czynników są uśrednione po atomach danego aminokwasu a następnie po podjednostkach. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Co zaskakujące, wydaje się, że w przypadku modeli ze związanym w centrum aktywnym substratem, sytuacja przedstawiała się odwrotnie i to wykres wartości RMSF dla wariantu nieinhibowanego dokładniej pokrywał się z krzywą B-czynników. Dokładna analiza pozwoliła zauważyć jednak, że zaobserwowane różnice dotyczą głównie fragmentów nieobecnych w strukturze krystalicznej białka bez ligandów, bądź też w strukturach zarówno białka bez jak i z ligandami – dotyczy to m.in. fragmentów 606-616 i 655-651. Z kolei na N-końcowym fragmencie domeny ISOM, w której to ulokowane jest miejsce wiązania inhibitora, wykresy obu symulacji były bardzo podobne i nakładały się na wykres B-czynników nawet dokładniej niż dla modeli bez Fru-6-P.

W celu wyraźniejszego zobrazowania różnic jakościowych i ilościowych w ruchliwości struktury, spowodowanych związaniem inhibitora a także łatwiejszej identyfikacji tych fragmentów, które potencjalnie mogłyby być związane z inhibicją wywołaną związaniem UDP-GlcNAc, przygotowałam wykresy różnic RMSF pomiędzy danymi modelami, przedstawione na Rysunku 38 i Rysunku 39.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

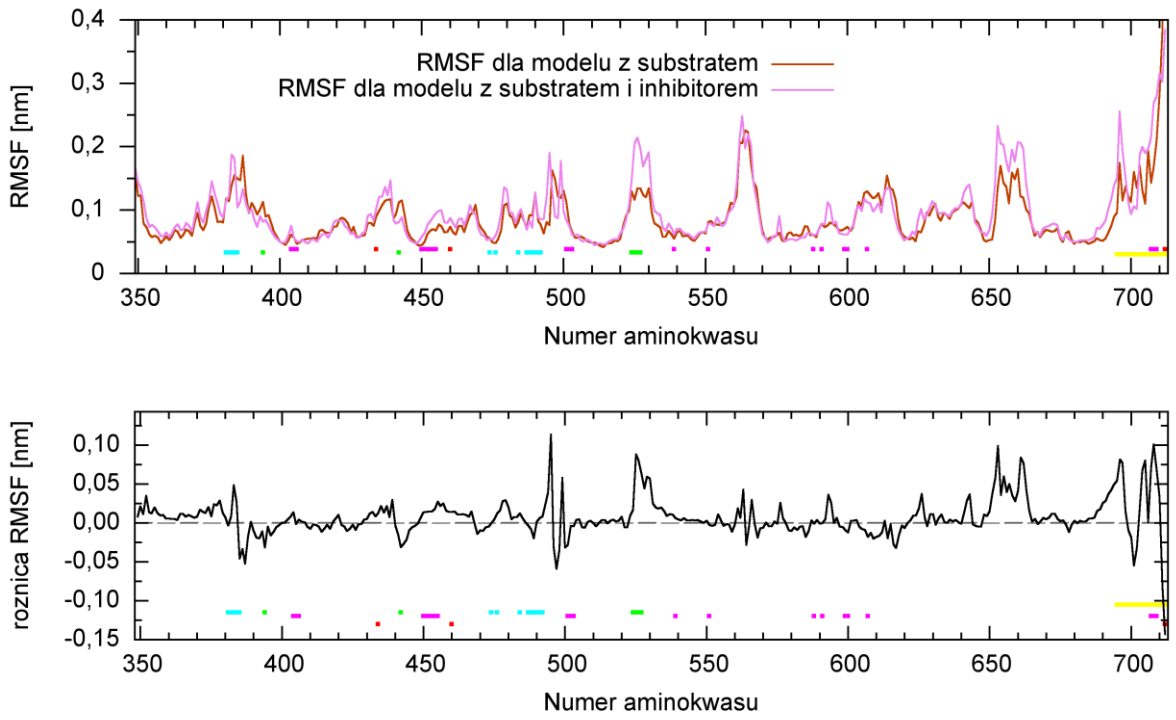


Rysunek 38: Porównanie wartości RMSF (powyżej) oraz wykres różnicowy (poniżej) pomiędzy domeną ISOM stanie wolnym i związanej z inhibitorem. Wartości RMSF zostały policzone dla atomów Cα i uśrednione po podjednostkach tetrameru, wartości B-czynników są uśrednione po atomach danego aminokwasu a następnie po podjednostkach. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty). Interpretacja wykresu dolnego jest następująca: różnica jest dodatnia jeśli dany aminokwas stał się bardziej ruchliwy po związaniu inhibitora i ujemna jeśli uległ on usztywnieniu.

Dla modeli niezawierających substratu, których porównanie obrazuje Rysunek 38, widać wyraźnie, że odnotowane zmiany polegały prawie wyłącznie na zmniejszeniu ruchliwości aminokwasów i dotknęły głównie reszt zlokalizowanych w N-końcowej części domeny (349-500) oraz, w największym stopniu, ogona-C. Usztywnieniu na skutek związania UDP-GlcNAc uległy fragmenty odpowiadające miejscu jego wiązania, a także większość aminokwasów budujących centrum katalityczne.

Biorąc pod uwagę, że ruchliwość atomów jest warunkiem koniecznym dla aktywności, niższe wartości RMSF otrzymane dla białka w wersji z inhibitorem, zwłaszcza dla reszt biorących udział w wiązaniu substratu oraz reakcji katalitycznej, mogłyby być związane z mechanizmem inhibicji. Podczas gdy stabilizacja miejsca wiążącego inhibitor nie jest zaskakująca (może wynikać ze zwiększenia ilości oddziaływań na skutek związania liganda), wyniki dotyczące centrum aktywnego – potencjalnie związane z mechanizmem inhibicji – zasługują na wnikliwą analizę.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

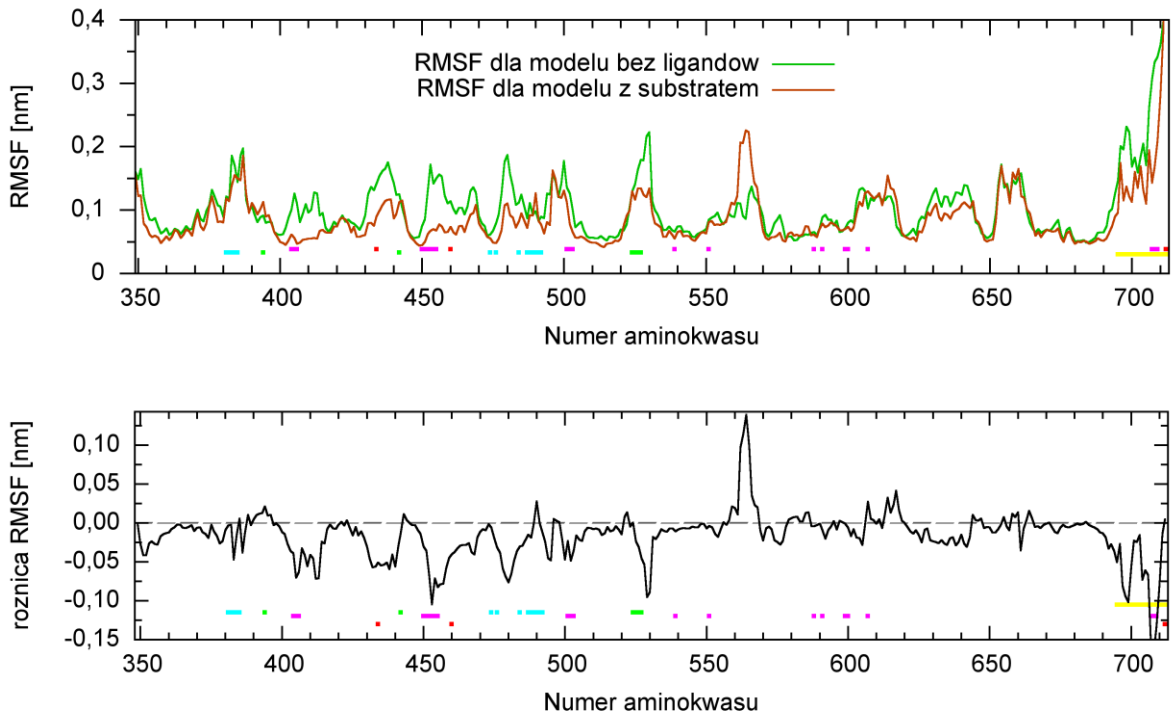


Rysunek 39: Porównanie wartości RMSF (powyżej) oraz wykres różnicowy (poniżej) pomiędzy domeną ISOM w wersji niezwiązanej i związanej z substratem. Analiza przeprowadzona została na przedziale 140-300 ns. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach A i B. W analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty) Interpretacja wykresu dolnego jest następująca: różnica jest dodatnia jeśli dany aminokwas stał się bardziej ruchliwy po związaniu inhibitora i ujemna jeśli uległ on usztywnieniu.

W przypadku modeli, w których w centrum katalitycznym związany był Fru-6-P, zmiany ruchliwości wyglądały nieco inaczej. Choć, jak widać na Rysunku 39, zaobserwowane różnice również dotyczyły fragmentów mających znaczenie biologiczne, nie we wszystkich przypadkach polegały na usztywnieniu aminokwasów – przykładowo, reszty 699-702 i 711-712, wchodzące w skład ogona-C, zostały usztywnione, zaś ruchliwość pozostałych tworzących go aminokwasów znacząco wzrosła.

Ponieważ jedyna różnica pomiędzy dwiema powyższymi analizami polegała na obecności substratu w centrum aktywnym, uznałam, że może to być przyczyną części rozbieżności pomiędzy wykresami. Postanowiłam zatem sprawdzić, które ze zmian wynikały wyłącznie z obecności Fru-6-P. W tym celu, przeprowadziłam analizy porównawcze pomiędzy modelem bez ligandów i wersją z samym substratem a także pomiędzy modelem z samym inhibitorem i kompleksem z dwoma ligandami. Analizy te zobrazowałam na Rysunku 41 i Rysunku 42.

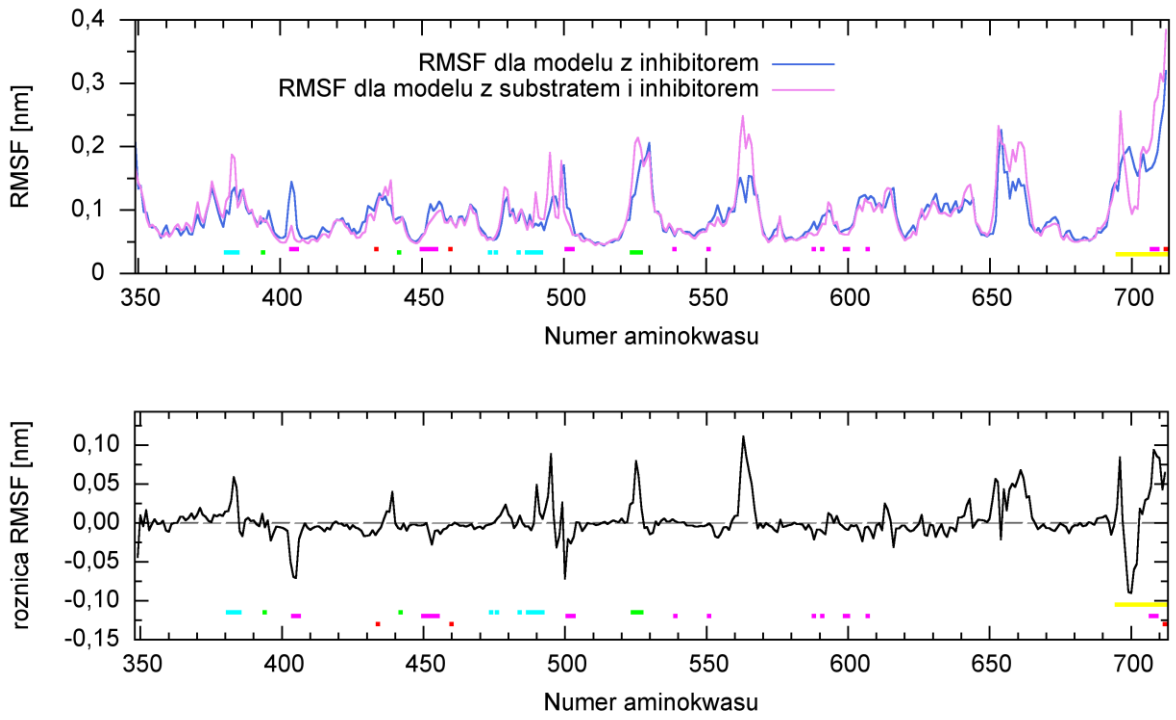
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 40: Porównanie wartości RMSF (powyżej) oraz wykres różnicowy (poniżej) pomiędzy domeną ISOM bez inhibitora w wersji niezwiązanej i związanej z substratem. Analiza przeprowadzona została na przedziale 145-300 ns dla białka bez substratu i na przedziale 140-300 ns dla białka z substratem. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru dla białka bez substratu i po podjednostkach A i B dla białka z substratem. W analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) Interpretacja wykresu dolnego jest następująca: różnica jest dodatnia jeśli dany aminokwas stał się bardziej ruchliwy po związaniu substratu i ujemna jeśli uległ on usztywnieniu.

Na obu porównywanych wykresach rzuca się w oczy duży, charakterystyczny wzrost ruchliwości fragmentu 560-570. Ponieważ nie był on widoczny ani na Rysunku 38 ani na Rysunku 39, wydaje się być bezpośrednio powiązany z obecnością Fru-6-P w centrum aktywnym. Odpowiadające temu fragmentowi aminokwasy należą do helisy CB (Rysunek 7a), dla której Raczyńska i wsp. nie przypisali żadnej szczególnej funkcji biologicznej (Raczyńska et al. 2007) i która nie leży w sąsiedztwie żadnego z miejsc wiążących ligandy. Choć na Rysunku 36 analizowany fragment wydaje się być stosunkowo blisko ogona-C, w rzeczywistości odległość między nimi jest dość duża – wynosi ok.1,5 nm. Biorąc jednak pod uwagę zakres ruchów ogona-C w modelu z substratem, pokazany na Rysunku 35 możliwe jest, że sięgał aż do okolic reszt 560-570 i powodował wzrost ich ruchliwości.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 41: Porównanie wartości RMSF (powyżej) oraz wykres różnicowy (poniżej) pomiędzy domeną ISOM z inhibitorem w wersji niezwiązanej i związanej z substratem. Analiza przeprowadzona została na przedziale 145-300 ns dla białka bez substratu z inhibitorem i na przedziale 140-300 ns dla białka z substratem i inhibitorem. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru dla białka bez substratu i po podjednostkach A i B dla białka z substratem. W analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty). Interpretacja wykresu dolnego jest następująca: różnica jest dodatnia jeśli dany aminokwas stał się bardziej ruchliwy po związaniu substratu i ujemna jeśli uległ on usztywnieniu.

Z Rysunku 41 wynika, że związanie substratu do domeny ISOM bez ligandów miało podobne konsekwencje do związania inhibitora do tego samego modelu – skutkowało usztywnieniem struktury głównie w jej N-końcowej części oraz w obrębie ogona-C. Może to sugerować, że zaobserwowane zmniejszenie ruchliwości atomów w porównaniu do domeny w stanie wolnym wynika głównie z obecności dodatkowych wiązań wodorowych i mostków solnych, utworzonych na skutek związania liganda a nie z natury tego ostatniego. Doniesienia literaturowe dotyczące bakteryjnej syntazy GlcN-6-P mówią o znaczącym wzroście uporządkowania jej struktury na skutek związania substratu cukrowego, a obserwacja ta dotyczy w szczególności ogona-C, który w białku w stanie wolnym ma nieuporządkowaną budowę i formuje regularną pętlę dopiero w obecności Fru-6-P (Mouilleron et al. 2008). Zatem, opisywane przeze mnie zjawisko mogłoby mieć podobne podłoże i dowodzić prawidłowego zachowania domeny ISOM wobec wiązania substratu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

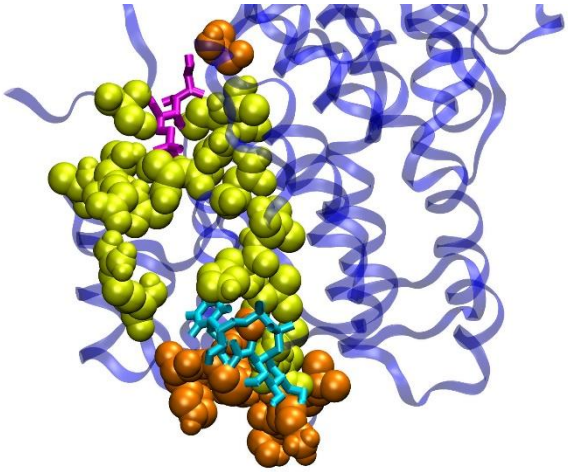
W świetle tych wniosków, w przypadku rozbieżności pomiędzy wynikami dotyczącymi wpływu związania inhibitora na ruchliwość domeny ISOM, bardziej uzasadnione wydawałoby się sugerowanie rezultatami analiz uwzględniającymi obecność Fru-6-P, choć należy przypomnieć, że wciąż nie ma pewności czy UDP-GlcNAc wiąże się do enzymu wolnego, czy też do zawierającego już substrat (Raczyńska et al. 2007). W każdym razie, występowanie pewnych wspólnych dla obu analiz zmiany ruchliwości ogona-C i reszt aminokwasowych budujących miejsca wiązania ligandów oraz odpowiedzialnych za zachowanie struktury tetramerycznej domeny, pozwalają sądzić, że mają one związek z inhibicją pod wpływem UDP-GlcNAc.

Miejsce wiązania inhibitora

Miejsce wiążące inhibitor położone jest w N-końcowej części domeny ISOM, a tworzą je reszty aminokwasowe: 381-388, 474, 476, 484 i 487-492. Jak zostało już wspomniane wcześniej, wiązaniu do białka podlega głównie uracylowa część cząsteczki, która wpasowuje się w zlokalizowaną na powierzchni domeny ISOM kieszeń wiążącą.

Porównanie fluktuacji aminokwasów dla symulacji struktur niezawierających substratu wykazało, że na skutek związania UDP-GlcNAc, usztywnieniu uległy prawie wszystkie reszty budujące miejsce wiązania tegoż inhibitora. Natomiast dla symulacji uwzględniających obecność Fru-6-P w centrum aktywnym, wyniki są bardziej zróżnicowane: aminokwasy 385-388 i 487-489 uległy usztywnieniu, podczas gdy reszty 383-384, 476, 484 i 490-492 stały się bardziej ruchliwe. Obserwacja ta jest o tyle interesująca, że jak widać na Rysunku 42, spadek ruchliwości dotyczył aminokwasów ulokowanych na powierzchni białka, zaś wzrost – reszt znajdujących się w zagłębieniu kieszeni wiążącej. Można przypuszczać, że usztywnienie jest bezpośrednim skutkiem ustabilizowania całej struktury na skutek związania liganda, natomiast wzrost ruchliwości reszt otaczających uracylową część inhibitora, a w szczególności Val476 i His492, może mieć znaczenie biologiczne – jako że te dwa aminokwasy usytuowane są niejako pomiędzy oboma ligandami, ich wzmożona ruchliwość mogłaby wpływać destabilizująco na centrum aktywne enzymu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 42: Fragment jednej z podjednostek domeny ISOM ze związanymi ligandami, przedstawionymi jako patyczki (Fru-6-P w kolorze fuksji zaś UDP-GlcNAc w kolorze turkusowym). Miejsca wiążące oba ligandy zostały pokazane jako kule, których kolor oznacza wzrost ruchliwości danej reszty w wyniku związania inhibitora (żółty) bądź jego usztywnienie (pomarańczowy).

Porównanie struktur statycznych domeny ISOM w stanie wolnym oraz ze związanym inhibitorem, które przeprowadziła Raczyńska i in., wykazało nieznaczną zmianę konformacyjną mającą miejsce na skutek związania inhibitora. Zmiana ta dotyczyła tworzących pętlę reszt aminokwasowych 381-388, którymi połączone zostały grupy fosforanowe oraz pierścień rybozowy UDP-GlcNAc. Dodatkowo zaś, łańcuch boczny końcowego Trp388 uległ przemieszczeniu względem enzymu w stanie wolnym (Raczyńska et al. 2007). Zmiany dotyczące wymienionego fragmentu są również widoczne na wykresach obrazujących wyliczone przeze mnie różnice RMSF pomiędzy modelami różniącymi się jedynie obecnością inhibitora (Rysunek 38 i Rysunek 39. W obu przypadkach na skutek związania UDP-GlcNAc, usztywnieniu uległy reszty 385-388, w tym Trp388. Powyższe obserwacje potwierdzają zgodność przeprowadzonych przeze mnie symulacji z badaniami prowadzonymi metodami tradycyjnymi.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Struktura oligomeryczna białka

Tetrameryczną strukturę domen izomerazowych pochodzenia eukariotycznego można określić mianem dimera prokarioto-podobnych dimerów: AB oraz CD (Rysunek 25). Podobnie jak w przypadku podatności na regulację pod wpływem UDP-GlcNAc, budowa czwartorzędowa jest cechą charakterystyczną eukariotycznej wersji enzymu a reszty aminokwasowe uczestniczące w tworzeniu interfejsy między dimerami u eukariotów, nie są zakonserwowane w strukturach prokariotycznych (Durand et al. 2008). Badania przeprowadzone niedawno przez Kwiatkowską-Semrau pozwoliły zidentyfikować reszty aminokwasowe odgrywające szczególnie istotną rolę w tworzeniu wspomnianego interfejsu, dzięki któremu utrzymywana jest struktura tetrameryczna eukariotycznej syntazy GlcN-6-P (Kwiatkowska-Semrau 2015). Resztami tymi, ulokowanymi wyłącznie w N-końcowej części łańcucha polipeptydowego, są: Arg394, Arg442, Asp524, Ser525, Ser527. W ramach moich badań postanowiłam sprawdzić czy nie da się wykryć zależności pomiędzy tymi dwiema charakterystycznymi dla eukariotów cechami tj. pomiędzy związaniem UDP-GlcNAc a zmianami w obrębie powierzchni kontaktu między podjednostkami tetrameru.

Przeprowadzone przeze mnie analizy RMSF dla aminokwasów tworzących powierzchnię kontaktu pomiędzy dimerami sugerują istotne zmiany w ich ruchliwości, mające miejsce na skutek związania inhibitora. Zmiany te widoczne są pomiędzy modelami ze związanym substratem (Rysunek 39) i polegają na znaczącym wzroście ruchliwości pętli 524-527, tworzącej powierzchnię kontaktu pomiędzy ułożonymi symetrycznie względem siebie łańcuchami A i D (Rysunek 7b) oraz niewielkim usztywnieniu reszt Arg394 i Arg442, odpowiedzialnych za kontakt pomiędzy diagonalnie ułożonymi podjednostkami A i C (Rysunek 7c). Dla porównania, samo związanie substratu ma niewielki skutek, przejawiający się jedynie usztywnieniem reszt 525-527 (Rysunek 40).

Powyższe obserwacje wspólnie z wynikami analizy ilości wiązań wodorowych pomiędzy dimerami (Tabela 4 i Rysunek 27) pozwalają przypuszczać, że zmiany w powierzchni kontaktu mające miejsce w wyniku związania UDP-GlcNAc, nie powodują rozsuwania się dimerów. Wzrost ilości wiązań wodorowych pomiędzy dimerami przy jednoczesnych zmianach ruchliwości tworzących powierzchnię kontaktu aminokwasów, mogą być oznaką wzajemnej reorientacji dimerów. W ten sposób, zwiększenie ruchliwości pętli 524-527, w wyniku którego tworzenie wymaganych wiązań wodorowych z pętlą 524-527 domeny naprzeciwległej nie byłoby możliwe, skutkowałoby zmianą jakościową w powierzchni kontaktu – inne reszty przejęłyby funkcję podtrzymywania struktury tetramerycznej białka. Choć zmiany w powierzchni kontaktu pomiędzy dimerami wydają się być powiązane z obecnością UDP-GlcNAc, powyższe spekulacje dotyczące wzajemnej reorientacji dimerów, wymagają jednak dalszych badań.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Centrum aktywne

Kontynuując rozważania dotyczące zmian zachodzących w obrębie istotnych z biologicznego punktu widzenia fragmentów struktury, przeanalizowałam różnice w ruchliwości pomiędzy symulacjami dla reszt tworzących centrum katalityczne enzymu. W przypadku eukariotycznej domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P, jest ono zbudowane z reszt aminokwasowych: 403-406, 450-455, 501-503, 539, 551, 588, 591, 599, 600, 607$^{\#}$, 707, należących zarówno do N-końcowej jak i C-końcowej części domeny ISOM.

Jak wspomniałam już wcześniej, związanie fruktozo-6-fosforanu w centrum katalitycznym domeny ISOM w stanie wolnym, poskutkowało usztywnieniem wszystkich budujących kieszeń wiążącą aminokwasów należących do N-końcowej części białka oraz należącej do ogona-C reszty Lys707. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi dla prokariotycznej wersji enzymu, w przypadku której nieuporządkowana struktura ogona-C tworzy regularną pętlę dopiero i jedynie po związaniu substratu w centrum aktywnym (Mouilleron et al. 2008). Jak sugerują Raczyńska i wsp., prawdopodobne jest, że w syntazie GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans*, struktura ogona-C musi zostać uporządkowana aby cykliczny substrat mógł prawidłowo ułożyć się w kieszeni wiążącej i aby umożliwić katalitycznej His607$^{\#}$ otwarcie pierścienia cukrowego (Raczyńska et al. 2007). W świetle tych stwierdzeń, odnotowane zmiany ruchliwości wydają się odzwierciedlać rzeczywiste zachowanie białka.

Z Rysunku 38 wynika, że związanie inhibitora pod nieobecność substratu spowodowało usztywnienie reszt aminokwasowych znajdujących się w N-końcowej części domeny ISOM, tj. 403-406, 450-455 i 501-503, a także, w największym stopniu, reszty Lys707, która wchodzi w skład ogona-C. Jak zostało powiedziane wcześniej, powyższa obserwacja może wynikać z ogólnej stabilizacji struktury na skutek utworzenia dodatkowych wiązań wodorowych i mostków solnych w sąsiedztwie miejsca wiążącego ligand. Z drugiej strony jednak nie wyjaśnia to usztywnienia oddalonego o 1,5 nm ogona-C – do wyjaśnienia tej kwestii przejdę w dalszej części tego rozdziału.

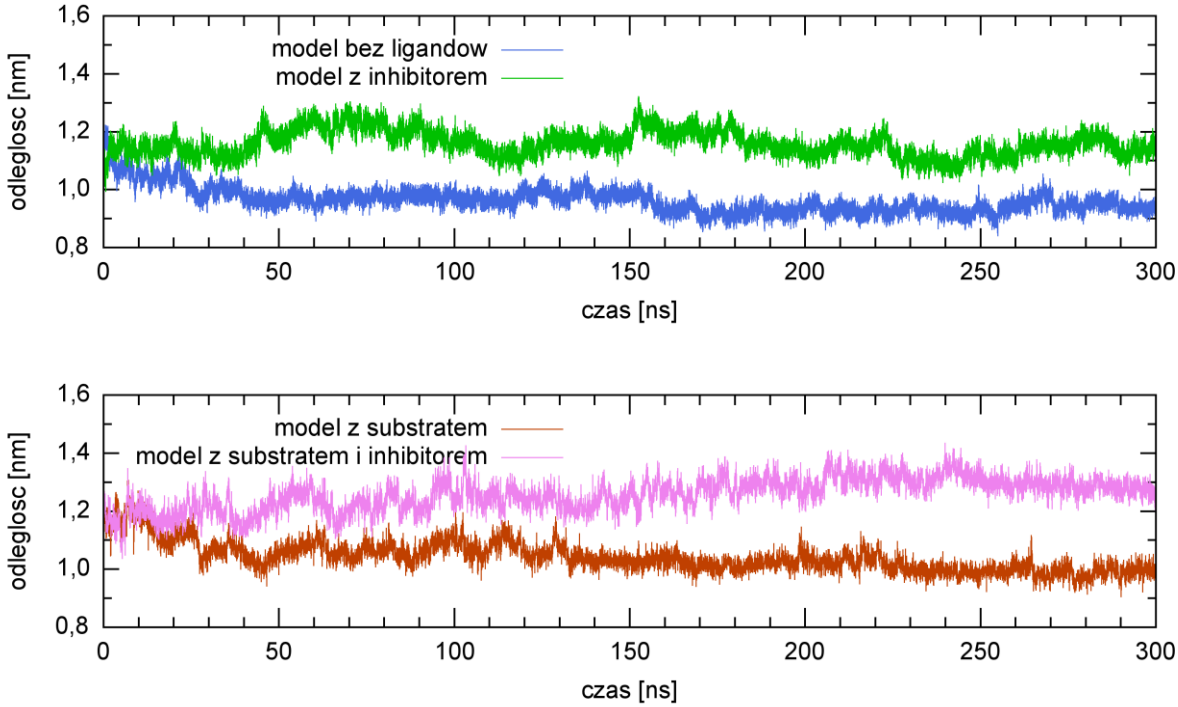
Analiza konsekwencji związania inhibitora w obecności substratu, przedstawiona na Rysunku 39, wykazała bardzo małe zmiany ruchliwości budujących centrum katalityczne enzymu aminokwasów. Poza resztą Lys707, dla której odnotowałam znaczący wzrost ruchliwości, podobnym zmianom, aczkolwiek w zdecydowanie mniejszym stopniu, uległy tylko fluktuacje aminokwasów 450-455, tworzących pętlę otaczającą fosforanową część substratu oraz reszty Val501 i His607$^{\#}$, które z kolei zostały usztywnione.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Reszta His607# należy do sąsiadującej podjednostki tego samego dimera i ma kluczowe znaczenie w reakcji katalitycznej. Co charakterystyczne, może ona prawidłowo wypełniać swą rolę jedynie przy odpowiednim ułożeniu względem siebie podjednostek dimera (Raczyńska et al. 2007). Porównanie wartości RMSF dla domeny zawierającej i niezawierającej inhibitor w obecności substratu (Rysunek 39) wskazuje na zmniejszenie się ruchliwości tej reszty aminokwasowej pod wpływem UDP-GlcNAc. Co ciekawe, usztywnienie nie wynika ze związania samego substratu, gdyż jak widać na Rysunku 40, to ostatnie skutkuje raczej wzrostem ruchliwości His607#. Sugeruje to związek wzrostu ruchliwości tej reszty z obecnością inhibitora a biorąc pod uwagę jej rolę w mechanizmie katalizowanej reakcji, może również mieć implikacje dla inhibicji zachodzącej na skutek związania UDP-GlcNAc. Warto zauważyć, że wyniki te są zgodne z obserwacjami opisanymi przez Raczyńską i wsp., według których w strukturach krystalicznych domeny ISOM pochodzącej z *C. albicans*, reszta His607# jest albo całkowicie (w strukturach bez inhibitora) albo częściowo (w strukturach z inhibitorem) niewidoczna, przy czym reszty widoczne są w formie nieaktywnej – są za daleko od centrum aktywnego, zaś niewidoczne mogłyby być aktywne przy założeniu, że ruchliwość jest warunkiem koniecznym do aktywności (Raczyńska et al. 2007).

Obserwowany przeze mnie spadek ruchliwości mógłby oznaczać, że reszta His607# została odsunięta od centrum katalitycznego domeny. W celu weryfikacji tej hipotezy, przenalizowałam i zobrazowałam na Rysunku 43 zmiany odległości pomiędzy His607# a środkiem masy centrum aktywnego sąsiedniej podjednostki, po czym porównałam je pod kątem związku z obecnością inhibitora zarówno dla modeli bez substratu jak i z substratem. Uzyskane wyniki potwierdzają, że w obu przypadkach, His607# była o około 0,25 nm bliżej centrum aktywnego niż w modelu domeny ze związanym UDP-GlcNAc, co prawdopodobnie uniemożliwiało jej wypełnianie roli w mechanizmie katalizowanej reakcji.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



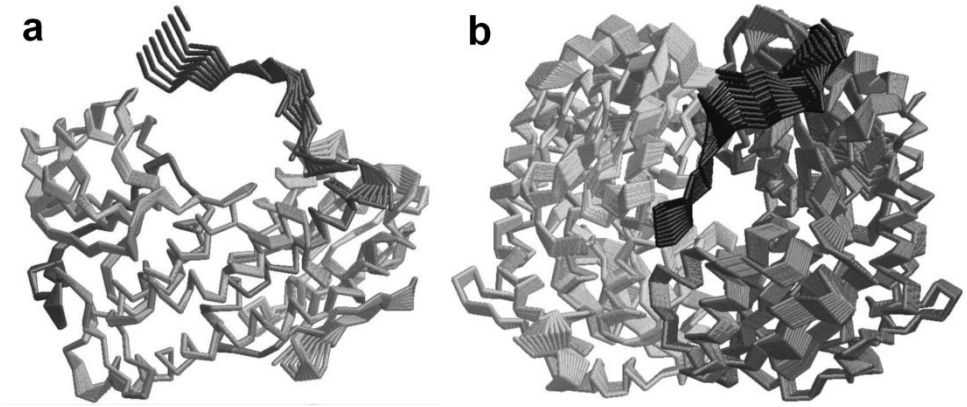
Rysunek 43: Porównanie ewolucji odległości pomiędzy His607# a środkiem masy centrum aktywnego pomiędzy modelami domeny ISOM różniącymi się jedynie obecnością inhibitora. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru da symulacji bez substratu (powyżej) i po podjednostkach dimeru AB dla symulacji z substratem (poniżej).

Ogon-C

We wszystkich przeprowadzonych przeze mnie symulacjach ogon-C był najbardziej ruchliwym fragmentem domeny izomerazowej, co doskonale widoczne jest na Rysunku 31. Analizy przeprowadzone metodą głównych składowych dla wszystkich wariantów domeny ISOM, potwierdziły tę obserwację – szerokiemu zakresowi ruchów towarzyszyły zmiany konformacyjne: naprzemienne rozwijanie się i zwijanie w mniej lub bardziej regularną pętlę (Rysunek 35), swobodnie sięgającą sąsiedniej podjednostki i zachodzącą na nią (Rysunek 44), co jest zgodne z obserwacjami odnotowanymi dla ogona-C syntazy GlcN-6-P pochodzenia prokariotycznego (Mouilleron et al. 2008). Ruchliwość tego fragmentu struktury znajduje potwierdzenie również w eksperymencie krystalograficznym – wyjątkowo duża labilność jest przyczyną jego nieobecności we wszystkich otrzymanych dotychczas strukturach domeny ISOM pochodzenia eukariotycznego. Kwestia ta została wyczerpująco opisana w dedykowanym strukturom krystalicznym artykule (Raczyńska et al. 2007). W użytych przeze mnie modelach domeny ISOM, ogony-C, podobnie jak pozostałe brakujące atomy, zostały dodane do struktury metodami modelowania homologicznego w oparciu o strukturę prokariotyczną pochodzącą z *E. coli*.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Porównanie zmian RMSF wywołanych obecnością substratu w centrum aktywnym domeny ISOM w stanie wolnym wykazało, że związanie Fru-6-P wydaje się stabilizować strukturę białka (Rysunek 40), a w szczególnym stopniu ogon-C, spośród którego największa amplituda zmian dotyczyła reszty Lys707. Ponieważ należy ona do aminokwasów bezpośrednio zaangażowanych w wiązanie substratu, powyższa obserwacja jest spójna z wynikami badań dotyczącymi struktury prokariotycznej domeny ISOM pochodzącej z *E. coli*, dla której odnotowano wzrost uporządkowania C-końcowych reszt, formujących pętlę ogona-C na skutek związania substratu cukrowego (Mouilleron et al. 2008). Należy jednak sprecyzować, że pomimo domniemanej analogii, skala opisywanego zjawiska musi być inna – w przeciwieństwie do enzymu z *C. albicans*, ogony-C w białku pochodzącym z *E. coli* są doskonale widoczne w strukturach krystalicznych. Sugeruje to, że stopień usztywnienia ogonów-C w syntazie eukariotycznej jest o wiele mniejszy niż w bakteryjnym analogu (Raczyńska et al. 2007) i sam w sobie nie wystarcza do uwidocznienia tych fragmentów w eksperymentach krystalograficznych.



Rysunek 44: Zakres ruchów wzdłuż pierwszej głównej składowej dla przykładowej struktury pokazany w izolowanej podjednostce (a) oraz w dimerze (b); ogon-C wyróżniono kolorem czarnym.

Wspomniałam wcześniej, że w wyniku związania inhibitora pod nieobecność substratu, w największym stopniu usztywniona została reszta Lys707 oraz pozostałe aminokwasy tworzące ogon-C (Rysunek 38). Zakres zmian ruchliwości i ważna rola, jaką odgrywa on w procesie wiązania substratu w organizmach prokariotycznych sugerują, że zaobserwowane rozbieżności mogą mieć związek z inhibicją pod wpływem UDP-GlcNAc. Z kolei wyniki badań przeprowadzonych przez Olchowego i wsp. sugerują, że obniżenie aktywności enzymu wywołane obecnością fizjologicznego inhibitora związane jest z zaburzaniem komunikacji pomiędzy domenami ISOM i GAT a nie z bezpośrednim hamowaniem aktywności którejkolwiek z nich. Wiadomo również, że w przekazywanie sygnału zaangażowane są cztery C-końcowe aminokwasy ogona-C: Val709, Thr710, Val711 i Glu712 (Olchowy et al. 2007). Zatem, usztywnienie tych reszt musi mieć konsekwencje w postaci pogorszenia komunikacji między domenami, co z kolei wpływa na aktywność całego enzymu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W przypadku, gdy w centrum aktywnym związany był Fru-6-P, ruchliwość ogona-C również uległa znaczącym zmianom na skutek związania UDP-GlcNAc. Różnice te, doskonale widoczne na Rysunku 39, miały jednak mniej jednorodny charakter: usztywnione zostały reszty Asp700 i Glu712, odpowiadające skrajom ogona-C, natomiast jego środkowa część stała się bardziej ruchliwa. Kluczem do wyjaśnienia rozbieżności może być reszta Lys707, należąca do aminokwasów wiążących substrat w centrum aktywnym. Znajduje się ona w środkowej części ogona-C, tak więc gdy wiąże się Fru-6-P, w tej właśnie części ogona-C tworzą się nowe oddziaływania, dzięki którym zostaje ona w szczególnym stopniu usztywniona (Rysunek 40). Gdy zaś do tej domeny z substratem wiąże się inhibitor, można odnotować zwiększenie ruchliwości aminokwasów budujących centrum aktywne, w tym również Lys707.

To zjawisko daje się zaobserwować zarówno na Rysunku 39 jak i na Rysunku 41. Biorąc pod uwagę, że do prawidłowego związania liganda wymagana jest stabilność jego miejsca wiążącego, można przypuszczać, że wzrost ruchliwości reszt tworzących centrum aktywne zaburza wiązanie substratu. Przypuszczenie nie znajduje co prawda bezpośredniego potwierdzenia w strukturze krystalicznej (Raczyńska et al. 2007), aczkolwiek sami autorzy eksperymentu przyznają, że nie wszystkie aspekty aktywności enzymu zostały wyjaśnione, co pozostawia miejsce na spekulacje i przewidywania dotyczące między innymi procesu inhibicji zachodzącego pod wpływem wiązania UDP-GlcNAc.

Tak czy inaczej, widoczny na Rysunku 39 wzrost ruchliwości reszty Lys707 i usztywnienie sąsiadujących z nią czterech reszt mających wpływ na komunikację i przekazywanie sygnału między domenami enzymu wydaje się potwierdzać hipotezę inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc, dotyczącą upośledzenia przenoszenia sygnału pomiędzy domenami enzymu za pośrednictwem ogona-C, jak również destabilizacji centrum aktywnego na skutek związania inhibitora.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

III.2.2.3 Porównanie symulacji dzikiego białka w stanie wolnym oraz mutanta – mechanizm „ogonozamka”

W trakcie rozważań dotyczących zmian ruchliwości ogona-C na skutek związania ligandów, nasunęła mi się analogia do postawionej wcześniej w Katedrze Technologii Leków i Biochemii PG hipotezy „zamka” ogona-C. Hipoteza ta zakłada, że struktura domeny ISOM pochodzącej z organizmów prokariotycznych różni się od swojego, podatnego na inhibicję przez UDP-GlcNAc, eukariotycznego odpowiednika nie tylko brakiem miejsca wiązania tego inhibitora, ale również obecnością dodatkowego mechanizmu stabilizującego ogon-C, nazwanego roboczo „zamkiem ogona-C” lub „ogonozamkiem” (ang. *C-tail lock*).

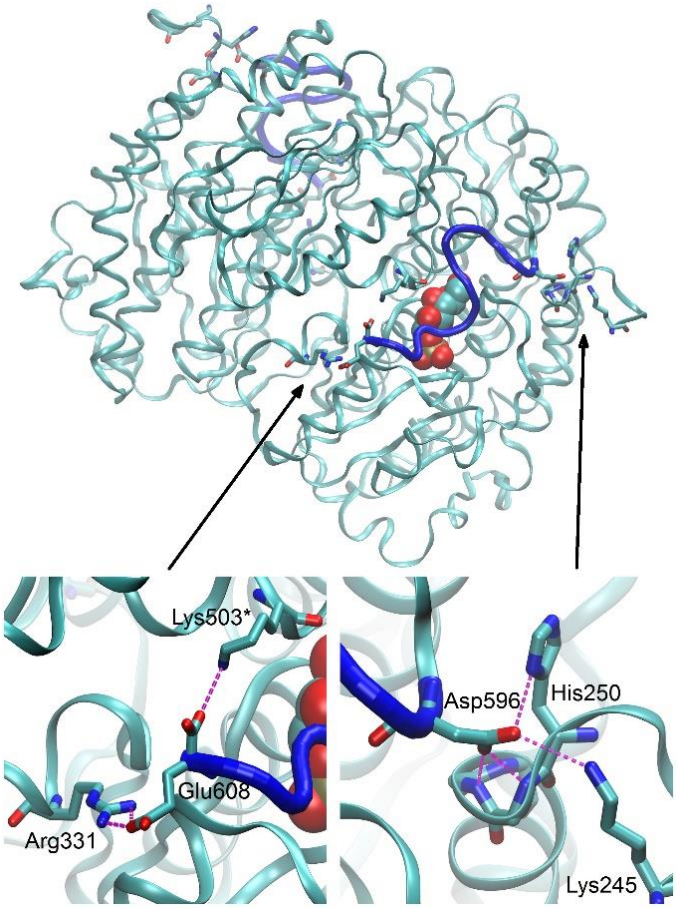
Opisane w poprzednim rozdziale analizy pokazały, że ogon-C jest blokowany w formie bardzo ruchliwej, aczkolwiek spiętej na obu końcach, pętli. W strukturach bakteryjnych mechanizm ten jest, właśnie ze względu na obecność kompletnego „ogonozamka”, zdecydowanie bardziej efektywny i, jak opisano w licznych doniesieniach literaturowych, po związaniu Fru-6-P, nieregularna forma tego fragmentu łańcucha ulega uporządkowaniu (Mouilleron et al. 2008) do tego stopnia, że możliwe jest jego uwidocznienie w strukturze krystalicznej.

```
GFPT1_HUMAN  333 IMKGNFSSFMQKEIFEQPESVVNTMRGRVNFDDYTVNLGGLKDHIKEIQRCRRLILIACG 392
GLMS_ECOLI   243 GDKGIYRHYMQKEIYEQPNAIKNTLTGRISHGQVDLSELGPN-ADELLSKVEHIQILACG 301
GFA1_CANAL   345 IMKGPYKHFMQKEIFEQPDSAFNTMRGRIDFENCVVTLGGLKSWLSTIRRCRRIIMIACG 404
                   ** :  :*****:***::  **: **:.. :  :.  * :   . : : .:: ::***

GFPT1_HUMAN  393 TSYHAGVATRQVLEELTELPVMVELASDFLDRNTPVFRDDVCFFLSQSGETADTLMGLRY 452
GLMS_ECOLI   302 TSYNSGMVSRYWFESLAGIPCDVEIASEFRYRKSAVRRNSLMITLSQSGETADTLAGLRL 361
GFA1_CANAL   405 TSYHSCLATRSIFEELTEIPVSVELASDFLDRRSPVFRDDTCVFVSQSGETADSILALQY 464
                 ***.: :.:*  :*.*: :*  **:**:*  *.: * *:.  . :********:: .*:

                 ............................................................

GFPT1_HUMAN  571 EGALKIKEITYMHSEGILAGELKHGPLALVDKLMPVIMIIMRDHTYAKCQNALQQVVARQ 630
GLMS_ECOLI   481 EGALKLKEISYIHAEAYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNNELLEKLKSNIEEVRARG 540
GFA1_CANAL   584 EGALKIKEISYMHSEGVLAGELKHGILALVDEDLPIIAFATRDSLFPKVMSAIEQVTARD 643
                 *****:***:*:*:*.  ******* ***:*  :*:* .  .:    *  . :::* **

GFPT1_HUMAN  631 GRPVVICDKEDTETI-KNTKRTIKVPHSVDCLQGILSVIPLQLLAFHLAVLRGYDVDFPR 689
GLMS_ECOLI   541 GQLYVFADQDAGFVSSDN-MHIIEMPHVEEVIAPIFYTVPLQLLAYHVALIKGTDVDQPR 599
GFA1_CANAL   644 GRPIVICNEGDAIISNDKVHTTLEVPETVDCLQGLLNVIPLQLISYWLAVNRGIDVDFPR 703
                 *:  *:.::       .:    :::*.  : :  :: .:****::: :*: :* *** **

GFPT1_HUMAN  690 NLAKSVTVE 698
GLMS_ECOLI   600 NLAKSVTVE 608
GFA1_CANAL   704 NLAKSVTVE 712
                 *********
```

Rysunek 45: Nałożenie wielosekwencyjne domen ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzącej z komórek ludzkich, z C. albicans oraz z E. coli. Reszty tworzące ogon-C są podkreślone kolorem żółtym ; Glu608, aminokwasy tworzące „ogonozamek” jak również aminokwasy zastąpione z powodów sterycznych oznaczono na czerwono ; Asp596 i aminokwasy tworzące strukturę podobną do pętli-P i unieruchamiające N-końcową część ogona-C wyszczególniono kolorem zielonym.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Jak zauważył dr inż. M. Wojciechowski, porównanie struktur i nałożenie wielosekwencyjne domen izomerazowych syntazy GlcN-6-P pochodzących z organizmów prokariotycznych i eukariotycznych (Rysunek 45) ujawnia pewne interesujące cechy obu wersji enzymu. Na samym początku domeny można wyróżnić małą, dodatnio naładowaną kieszeń, zbudowaną z kilku silnie zakonserwowanych reszt aminokwasowych. Resztami tymi są mianowicie Lys245 i His250, których łańcuchy boczne, wspólnie ze skierowanymi do środka grupami aminowymi szkieletów reszt Tyr251, Met252 i Gln253, tworzą strukturę podobną do tzw. pętli-P, obecnej w wielu enzymach wiążących ugrupowania fosforanowe i mającej zdolność wiązania ujemnie naładowanych reszt (Rysunek 46). Wymienione grupy aminowe reszt Tyr251, Met252 i Gln253 ulokowane są na N-końcu α-helisy, tak jak ma to miejsce we wspomnianej strukturze pętli-P. Co ciekawe, w tym konkretnym przypadku wiązane przez nie jest nie ugrupowanie fosforanowe, lecz grupa karboksylowa łańcucha bocznego reszty Asp596, która jest bardzo dobrze zakonserwowana w sekwencjach syntazy GlcN-6-P. Ponieważ reszta ta jest ulokowana w pobliżu C-końca, wspomniane oddziaływanie skutkuje ustabilizowaniem struktury całej domeny poprzez spięcie razem jej C- i N- terminalnych fragmentów. Pozostałe aminokwasy ogona-C tworzą strukturę nieregularnej pętli, zamykającej centrum aktywne domeny ISOM niczym wieko skrzyni, którego zawiasem jest wspomniana struktura.



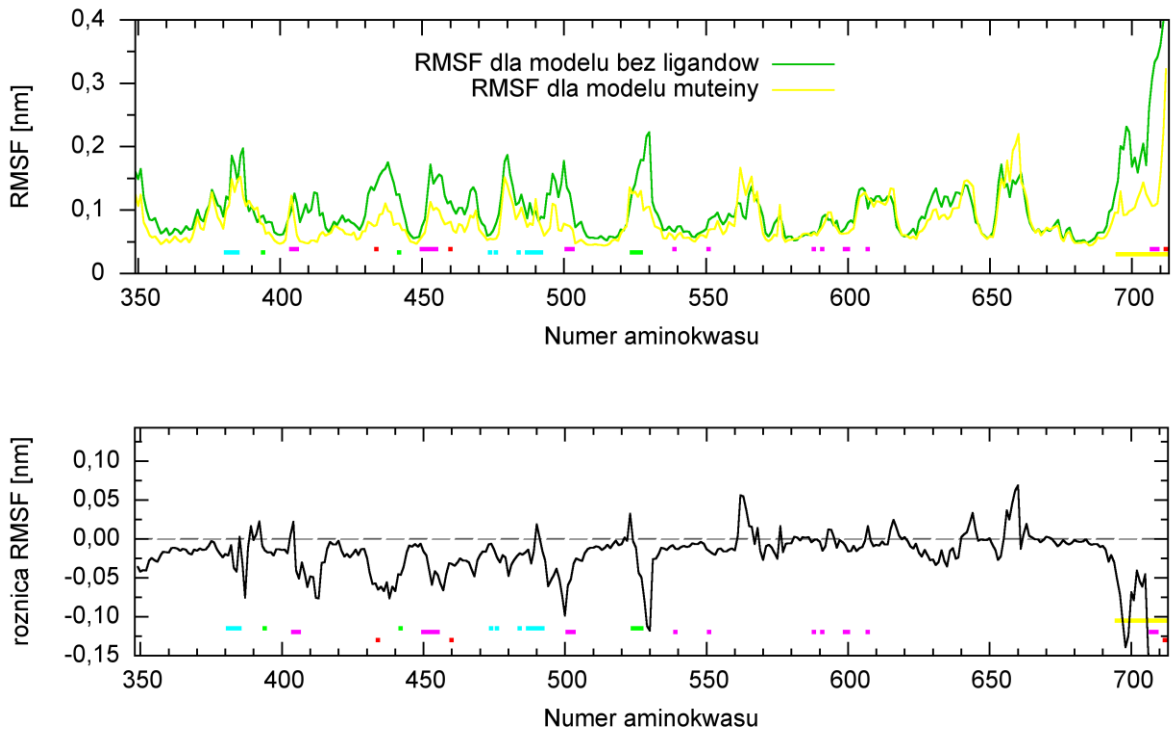
Rysunek 46: Dimer domen ISOM syntazy GlcN-6-P pochodzenia bakteryjnego (PDB: 1JXA). N-końcowa część łańcucha tworzącego ogon-C pokazana jest jako niebieska rurka, a substrat w centrum aktywnym – jako patyczki. Na dole pokazano zbliżenie początku (p prawej) i końca (po lewej) ogona-C. Dla przejrzystości rysunku, pokazane zostały tylko atomy szkieletu reszt: Tyr251, Met252 i Gln253 obejmujące N-koniec pierwszej α-helisy w tej domenie.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

C-końcowa reszta Glu608 (stanowiąca jednocześnie koniec ogona-C) ulokowana jest po przeciwnej stronie kieszeni wiążącej, a jej otoczenie różni się nieco w strukturach eukariotycznych i prokariotycznych tej domeny. Dla białka pochodzącego z *E. coli*, położenie tej reszty zablokowane jest dwoma mostkami solnymi, powstałymi w wyniku oddziaływań pomiędzy Glu608 a łańcuchami bocznymi Lys503[#] i Arg331. Aminokwasy te tworzą zamknięcie wieka wspomnianej skrzyni nazwane właśnie „zamkiem ogona-C" lub „ogonozamkiem" (Rysunek 46). Natomiast w enzymach pochodzenia eukariotycznego, reszta Arg331 zastąpiona jest leucyną, przez co w strukturze „ogonozamka" brakuje istotnego elementu (Rysunek 45). W konsekwencji tego braku, ruchliwość ogona-C w enzymach pochodzących z organizmów ludzkich i z *C. albicans* jest zdecydowanie mniej ograniczona niż w bakteryjnych syntazach GlcN-6-P i tym łatwiej może być modulowana na przykład poprzez. wiązanie dodatkowych ligandów. Warto przypomnieć, że to właśnie enzymy z organizmów eukariotycznych podatne są na inhibicję pod wpływem UDP-GlcN-6-P, podczas gdy białko z *E. coli* nie jest. Zatem, można przypuszczać, że obecność lub brak „ogonozamka" w strukturze enzymu warunkuje stopień ruchliwości ogona-C oraz jego podatność na zmiany w ruchliwości wywołane dodatkowymi czynnikami, takimi jak. związanie inhibitora.

W celu weryfikacji tej hipotezy, przygotowana została zmodyfikowana wersja eukariotycznej domeny ISOM, oparta – podobnie jak dla wszystkich analizowanych modeli – na strukturze krystalicznej PDB: 2PUV. Modyfikacja dotyczyła wprowadzenia „ogonozamka" poprzez zastąpienie Leu434 – odpowiednika Arg331 z *E. coli* w strukturze pochodzącej z *C. albicans* – przez resztę arginylową. Głównym celem eksperymentu było sprawdzenie w jaki sposób wyżej wymieniona zmiana wpłynie na ruchliwość ogona-C, a konkretnie czy ruchliwość ta ulegnie obniżeniu na skutek działania „ogonozamka".

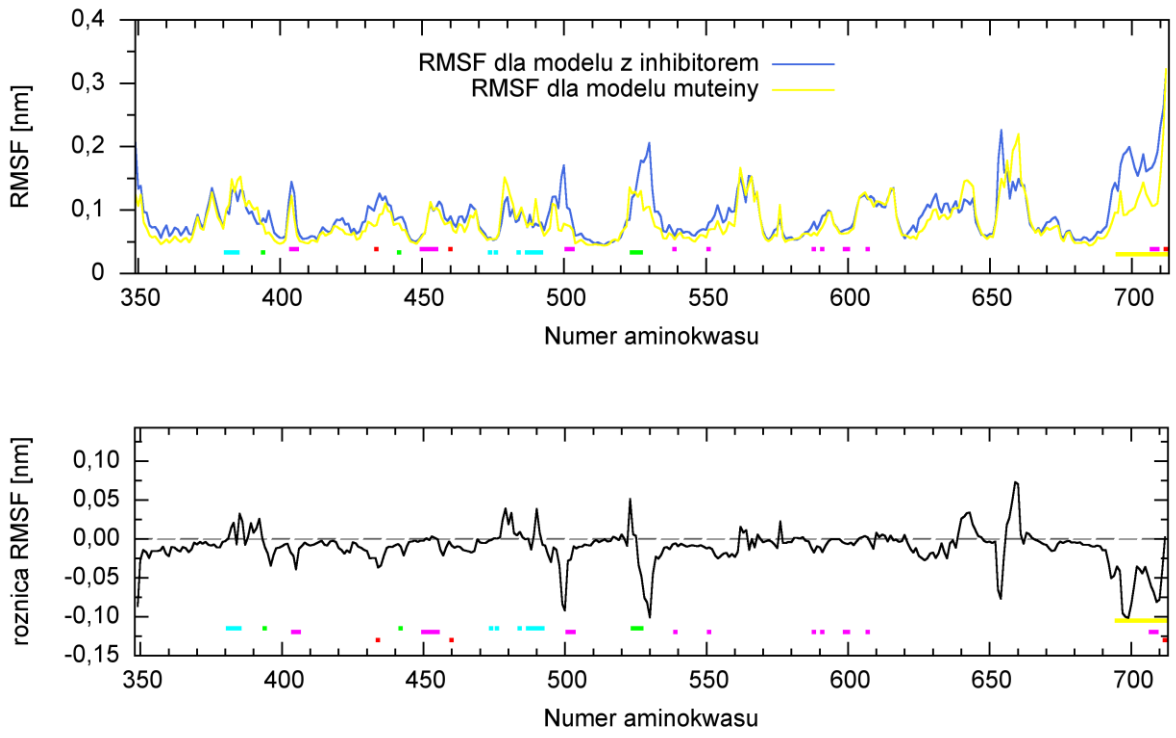
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 47: Porównanie wartości RMSF (powyżej) oraz wykres różnicowy (poniżej) pomiędzy modelem domeny ISOM bez ligandów i muteiny. Analiza przeprowadzona została na przedziale 145-300 ns. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru. W analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty). Interpretacja wykresu dolnego jest następująca: różnica jest dodatnia jeśli dany aminokwas stał się bardziej ruchliwy w wyniku wprowadzenia „ogonozamka" i ujemna jeśli uległ on usztywnieniu.

Przeprowadzone przeze mnie analizy strukturalne opierały się przede wszystkim na porównaniu fluktuacji węgli α pomiędzy symulacjami modelu muteiny a białka natywnego. Jak widać na Rysunku 47, wprowadzenie struktury „ogonozamka" bez wątpienia wywarło wpływ na ruchliwość białka, a mianowicie przyczyniło się do usztywnienia niemal całej jego struktury. Tak jak oczekiwano, fragmentem dla którego zmiany te były najbardziej widoczne był ogon-C – średnie wartości RMSF dla tworzących go reszt aminokwasowych zmalały o około 0,15 – 0,20 nm. Tym samym, hipoteza wpływu „ogonozamka" na usztywnienie ogona-C została potwierdzona. Osobną kwestią jest aktywność tak zmodyfikowanego enzymu, a w szczególności zmiana jego podatności na inhibicję w wyniku związania UDP-GlcNAc, która to powinna zostać sprawdzona eksperymentalnie.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 48: Porównanie wartości RMSF (powyżej) oraz wykres różnicowy (poniżej) pomiędzy modelem domeny ISOM ze związanym inhibitorem i muteiny. Analiza przeprowadzona została na przedziale 145-300 ns. Wartości zostały uśrednione po podjednostkach tetrameru. W analizie uwzględniono jedynie atomy Cα. Paski wzdłuż osi poziomej oznaczają istotne regiony domeny ISOM: wprowadzone mutacje (czerwony), centrum aktywne (fuksja), miejsce wiążące inhibitor (turkusowy), aminokwasy istotne dla zachowania struktury tetramerycznej białka (zielony) i ogon-C (żółty). Interpretacja wykresu dolnego jest następująca: różnica jest ujemna jeśli dany aminokwas został silniej usztywniony w wyniku wprowadzenia „ogonozamka" niż w wyniku związania inhibitora.

Ciekawe obserwacje przyniosło porównanie zmian ruchliwości wywołanych przez wprowadzenie mutacji ze zmianami mającymi miejsce na skutek związania inhibitora. Jak widać na Rysunku 48, krzywe obrazujące RMSF dla porównywanych symulacji w dużym stopniu nakładały się, co świadczy o dużym stopniu podobieństwa fluktuacji atomów. Tym niemniej można jednak wyróżnić kilka regionów, dla których na podstawie rozpiętości zmian RMSF, da się stwierdzić silniejszy wpływ mutacji niż inhibitora. Do tych fragmentów należy ogon-C, skąd wnioskuję, że wprowadzenie struktury „ogonozamka" miałoby jakościowo podobny wpływ na ruchliwość enzymu jak związanie UDP-GlcNAc.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Znaczenie „ogonozamka” dla unieruchomienia ogona-C znajduje potwierdzenie również w analizie porównawczej struktur krystalicznych prokariotycznej (PDB: 1JXA) i eukariotycznej (PDB: 2PUV) domeny ISOM syntazy GlcN-6-P. W wersji pochodzącej z *C. albicans*, gdzie brak „ogonozamka”, część łańcucha domeny położona za „zapięciem” podobnej do pętli-P struktury (czyli wszystkie reszty za Asp700), nie była widoczna w eksperymencie krystalograficznym. Tymczasem dla białka z *E. coli*, obecność „ogonozamka” efektywnie przyczyniła się do spięcia obu końców ogona-C, wskutek czego został on przymocowany na powierzchni cząsteczki, i, w konsekwencji, kompletna struktura krystaliczna mogła zostać z powodzeniem otrzymana.

Powyższe rozważania sugerują, że hipoteza dotycząca zmniejszenia ruchliwości ogona-C na skutek wprowadzonej mutacji Leu434Arg, stanowi interesujący tematem badań, który powinien zostać rozwinięty i zasługuje na weryfikację za pomocą eksperymentu laboratoryjnego.

Podsumowując, zablokowanie obu końców ogona-C w strukturze eukariotycznej za pomocą mechanizmu analogicznego do działającego w organizmach prokariotycznych, powoduje uporządkowanie jego struktury i uformowanie pętli o unieruchomionych końcówkach i bardzo ruchliwym środku. Jako, że ogon-C pełni istotną rolę w przekazywaniu sygnału pomiędzy domenami ISOM i GAT syntazy GlcN-6-P, zmiany jego ruchliwości mogą przyczyniać się do utraty aktywności katalitycznej enzymu.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

IV. Wnioski i podsumowanie

Obecny stan wiedzy na temat syntazy GlcN-6-P nie pozostawia wątpliwości co do występowania zarówno licznych podobieństw, jak i wielu istotnych różnic na poziomie łańcucha polipeptydowego enzymu prokariotycznego i eukariotycznego. Do najistotniejszych cech odróżniających wersję eukariotyczną syntazy GlcN-6-P od jej bakteryjnego odpowiednika należą m.in.: budowa tetrameryczna, obecność dodatkowego fragmentu w strukturze domeny GAT, regulacja poprzez mechanizmy fosforylacji-defosforylacji oraz podatność enzymu na inhibicję pod wpływem fizjologicznego inhibitora, jakim jest UDP-GlcNAc.

Wieloletnie badania nad syntazą GlcN-6-P pochodzącą z *C. albicans*, prowadzone w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej zaowocowały rozwiązaniem pewnych do tej pory niejasnych aspektów funkcjonowania enzymu. W szczególności, udało się potwierdzić lokalizację miejsca fosforylacji białka przez cAMP-zależną kinazę białkową, ustalić wpływ fosforylacji-defosforylacji enzymu na metabolizm *C. albicans* (Gabriel et al. 2004) oraz uzyskać pewne informacje na temat roli dodatkowego fragmentu obecnego w domenie GAT (Olchowy et al. 2007). Ponadto, ostatnie doniesienia dotyczące wyników badań prowadzonych przez Kwiatkowską-Semrau (Kwiatkowska-Semrau 2015) pozwoliły potwierdzić metodami eksperymentalnymi szczególnie istotną rolę odgrywaną w procesie wiązania cząsteczki inhibitora przez reszty: Gly474, Thr487, Gly490 i His492, a także rolę reszt: Arg394, Arg442, Asp524, Ser525 i Ser527 w tworzeniu powierzchni kontaktu pomiędzy dimerami. W ramach moich badań skupiłam się na analizie molekularnych aspektów regulacji syntazy GlcN-6-P poprzez jej inhibicję za pomocą UDP-GlcNAc. Badania prowadzone były metodami obliczeniowymi w oparciu o strukturę domeny ISOM syntazy GlcN-6-P z *C. albicans*.

Do dziś dnia podejmowano liczne próby poznania dokładnej, kompletnej struktury eukariotycznej wersji syntazy GlcN-6-P, niestety żadna z nich nie zakończyła się całkowitym powodzeniem. Udało się natomiast uzyskać strukturę krystaliczną jej domeny ISOM dla wersji niezwiązanej z ligandami (PDB: 2PUW) oraz w formie kompleksu z substratem i inhibitorem (PDB: 2PUT) a także orientacyjne, bardzo przybliżone dane strukturalne białka kompletnego, otrzymane metodą SAXS (Raczyńska et al. 2007).

Różnice pomiędzy tymi strukturami są stosunkowo niewielkie (około 0,06 nm pomiędzy 1339 atomami Cα wspólnymi dla obu wariantów) i nie da się na ich podstawie wyjaśnić mechanizmu inhibicji pod wpływem UDP-GlcNAc. Porównanie obu struktur krystalicznych, wyczerpująco opisane przez Raczyńską i wsp., nie wykazało ani różnic w strukturze oligomerycznej domeny ISOM, ani też żadnych istotnych zmian konformacyjnych w jej centrum aktywnym. Autorzy badań przyznają jednak, że ze względu

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

na słabą jakość struktury 2PUW, ewentualne zmiany związane z niewidocznymi w modelach fragmentami nie zostałyby dostrzeżone (Raczyńska et al. 2007). W szczególności dotyczy to istotnych z katalitycznego punktu widzenia aminokwasów, które to nie są obecne w strukturach krystalicznych na skutek braku odpowiedniej gęstości elektronowej. Ostatnich dwanaście reszt ogona-C, zaangażowanych w wiązanie substratu i stabilizowanie go w centrum aktywnym, jest niewidoczne w każdej z podjednostek wszystkich opisywanych modeli. Z kolei pętla zawierająca His607$^{\#}$, resztę odpowiedzialną za przeniesienie protonu z atomów O2 na P5 (Teplyakov et al. 1999) oraz za otwierania pierścienia cukrowego, jest widoczna jedynie w dwóch z czterech podjednostek i tylko w strukturze z inhibitorem. Co istotne, konformacja tych pętli odpowiada enzymowi w stanie nieaktywnym, jako że His607$^{\#}$ znajduje się za daleko od substratu aby mogły zachodzić oddziaływania między nimi (Raczyńska et al. 2007). Stad też, jako że różnice pomiędzy kluczowymi resztami w centrum aktywnym nie zostały całkowicie odkryte, pozostaje trochę miejsca na zastosowanie metod modelowania molekularnego w celu opracowania mechanizmu inhibicji zachodzącej pod wpływem wiązania cząsteczki UDP-GlcNAc.

Reakcja katalizowana przez syntazę GlcN-6-P zachodzi na trzech etapach, obejmujących: hydrolizę glutaminy, transfer uwolnionego amoniaku na Fru-6-P i izomeryzację tak powstałego produktu do GlcN-6-P (Milewski 2002). Kolejność wiązania substratów jest ściśle zdefiniowana: w pierwszym kroku substrat cukrowy wiąże się do domeny ISOM (Badet et al. 1988), a dopiero wówczas L-glutamina może związać się do domeny GAT. Ewidentnie świadczy to o obecności systemu komunikacji umożliwiającego, za pomocą oddziaływań między domenami enzymu, przekazywanie zmian konformacyjnych zapoczątkowanych związaniem Fru-6-P w domenie ISOM, do domeny glutaminowej. Istnienie takiego mechanizmu zostało dowiedzione dla białka bakteryjnego (Bera et al. 2000).

Dla eukariotycznej wersji enzymu wykazano, że na skutek związania UDP-GlcNAc zahamowany zostaje proces hydrolizy glutaminy i, co za tym idzie, aktywność katalityczna całego enzymu. Z drugiej strony, obecność inhibitora nie wpływa w żaden sposób na hydrolizę glutaminy w izolowanej domenie GAT ani też na izomeryzację fosforylowanej heksozy przez izolowaną domenę ISOM (Olchowy et al. 2007). Można zatem przypuszczać, że obniżenie aktywności enzymu wywołane obecnością UDP-GlcNAc, związane jest z zaburzaniem komunikacji pomiędzy domenami a nie z bezpośrednim hamowaniem aktywności którejkolwiek z nich. Dowiedziono również, że w białku pochodzącym z *C. albicans,* cztery C-końcowe aminokwasy, wchodzące w zakres ogona-C, mająYkluczowe znaczenie dla komunikacji i przekazywania sygnału pomiędzy domenami – ich delecja silnie zaburza oba te procesy (Olchowy et al. 2007).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wyjątkowa ruchliwość ogona-C oraz podatność na zmiany tej ruchliwości pod wpływem związania ligandów, wykazane w trakcie moich badań, pozwalają przypuszczać, iż elastyczność i ruchliwość tego fragmentu mają wpływ na komunikację między domenami, w której biorą udział reszty wchodzące w skład ogona-C, a w szczególności: Lys705, Ala706 i, szczególnie, cztery C-końcowe reszty 709-712. Ponadto, jako że ogon-C stanowi ważny element kanału amoniakowego oraz powierzchni oddziaływań między domenami, jakiekolwiek zmiany w jego ruchliwości musiałyby mieć odzwierciedlenie w jakości przekazywania sygnałów pomiędzy domeną ISOM a GAT, a to z kolei przekładałoby się na zmiany aktywności całego enzymu.

We wszystkich przeprowadzonych przeze mnie symulacjach ogon-C był najbardziej ruchliwym fragmentem domeny izomerazowej – szerokiemu zakresowi ruchów towarzyszyły zmiany konformacyjne: naprzemienne rozwijanie się i zwijanie w mniej lub bardziej regularną pętlę, swobodnie sięgającą sąsiedniej podjednostki i zachodzącą na nią. Zmiany w ruchliwości ogona-C oraz poszczególnych reszt aminokwasowych wchodzących w jego zakres, mające miejsce na skutek związania substratu i inhibitora, stanowiły najważniejszy wynik moich badań. Związanie substratu spowodowało usztywnienie wszystkich aminokwasów wchodzących w skład ogona-C. Natomiast na skutek związania inhibitora, nastąpiło znaczne zwiększenie ruchliwości reszt budujących centrum aktywne, w tym również środkowej części ogona-C. Z drugiej strony, oba jego końca uległy usztywnieniu, przez co ten fragment został zablokowany w formie bardzo ruchliwej, spiętej z obu stron pętli. W rezultacie, zmiany ruchliwości wywołane związaniem UDP-GlcNAc, mogłyby w znaczącym stopniu zaburzać przekazywanie sygnału pomiędzy domenami ISOM i GAT, przyczyniając się w ten sposób do utraty aktywności katalitycznej enzymu.

Mechanizm odpowiedzialny za zmiany w ruchliwości ogona-C wywołane związaniem inhibitora nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Biorąc pod uwagę, że ogon-C oddalony jest od miejsca wiążącego inhibitor o około 2 nm, dość oczywista wydaje się tu ingerencja innych aminokwasów. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach udało się wykazać istnienie jakościowych różnic w ruchliwości reszt Val476 i His492. Te dwa aminokwasy położone są pomiędzy oboma ligandami, tak więc odnotowany dla nich wzrost ruchliwości mógłby mieć destabilizujący wpływ na reszty wchodzące w zakres centrum aktywnego, w tym, poprzez zaburzanie sieci wiązań wodorowych wokół substratu, należącej do ogona-C reszty Lys707. Usztywnienie tej ostatniej w pozycji niekorzystnej dla przenoszenia sygnału pomiędzy domenami ISOM i GAT mogłoby zahamować mechanizm reakcji katalitycznej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W reakcji tej kluczowe znaczenie ma reszta His607#, jedyny aminokwas biorący udział w reakcji katalitycznej a jednocześnie położony z dala od centrum aktywnego swojej podjednostki, na peryferiach domeny. Przykład tej reszty pokazuje jak ważna dla aktywności enzymatycznej syntazy GlcN-6-P jest jej budowa oligomeryczna, gdyż His607# z jednego łańcucha bierze udział w reakcji katalitycznej zachodzącej w łańcuchu sąsiednim (Badet-Denisot et al. 1993; Bera et al. 2000). Zaobserwowany przeze mnie spadek ruchliwości His607# przy jednoczesnym zwiększeniu odległości tego aminokwasu od centrum aktywnego mógłby oznaczać, że reszta His607# została zablokowana na pozycji uniemożliwiającej jej odegranie roli w reakcji katalitycznej. Wyniki te są zgodne z obserwacjami opisanymi przez Raczyńską i wsp., według których w strukturach krystalicznych domeny ISOM pochodzącej z *C. albicans*, reszta His607# jest częściowo niewidoczna, przy czym reszty widoczne są w formie nieaktywnej – są za daleko od centrum aktywnego, zaś niewidoczne mogłyby być aktywne, opierając się na założeniu, że ruchliwość jest warunkiem koniecznym do aktywności (Raczyńska et al. 2007).

Obecność ogona-C jest jedną z głównych różnic pomiędzy otrzymanymi dotychczas prokariotycznymi a eukariotycznymi strukturami krystalicznymi syntazy GlcN-6-P. Aby fragment ten był widoczny w krysztale, musi mieć bardzo uporządkowaną strukturę, a do tego wymagana jest nie tylko obecność substratu w centrum aktywnym, ale również aktywny mechanizm „ogonozamka". Dla białka z *E. coli* wiadome jest, że ten początkowo nieuporządkowany fragment dopiero na skutek związania Fru-6-P ogon-C przyjmuje strukturę regularnej pętli (Mouilleron et al. 2008), a stopień jego uporządkowania jest wystarczający aby był on widoczny w strukturze krystalicznej. Podobnie jakościowo wydaje się zachowywać ogon-C w wersji białka pochodzącej z *C. albicans*, co potwierdza znaczące zmniejszenie jego ruchliwości zachodzące na skutek związania Fru-6-P, będące wynikiem moich badań. Jak sugerują Raczyńska i wsp., prawdopodobne jest, że podobnie jak w organizmach bakteryjnych, w syntazie GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans*, struktura ogona-C musi zostać uporządkowana aby cykliczny substrat mógł prawidłowo ułożyć się w kieszeni wiążącej i aby umożliwić katalitycznej His607# otwarcie pierścienia cukrowego (Raczyńska et al. 2007). Należy jednak sprecyzować, że pomimo domniemanej analogii, skala opisywanego zjawiska musi być inna – w przeciwieństwie do enzymu z *C. albicans*, ogony-C w białku pochodzącym z *E. coli* są doskonale widoczne w strukturach krystalicznych. Sugeruje to, że stopień usztywnienia ogonów-C w syntazie eukariotycznej jest o wiele mniejszy niż w prokariotycznym analogu. Związanie substratu samo w sobie, wobec braku obecnej w enzymach bakteryjnych struktury „ogonozamka", nie wystarcza do uwidocznienia tych fragmentów w eksperymentach krystalograficznych. Wydaje się jednak wysoce prawdopodobne, że cały ogon byłby widoczny w strukturze krystalicznej muteiny z wprowadzonym „ogonozamkiem", związanej z substratem bądź inhibitorem, choć już niekoniecznie z oboma tymi ligandami.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W rzeczy samej, UDP-GlcNAc może być brany pod uwagę jako modulator aktywności eukariotycznej syntazy GlcN-6-P, działający poprzez wywoływanie zmian ruchliwości reszt biorących udział w przekazywaniu sygnału między domenami enzymu. Przedstawione powyżej wyniki badań *in silico* sugerują również, że podobne zmiany może wywoływać obecność „ogonozamka" w strukturze domeny ISOM. Planowane eksperymenty laboratoryjne, które dotyczyć będą białka pochodzącego z *C. albicans* ze sztucznie wprowadzoną strukturą „ogonozamka" mogą pozwolić odkryć nowe aspekty mechanizmu inhibicji syntazy GlcN-6-P pod wpływem UDP-GlcNAc i potwierdzić powyższe hipotezy dotyczące roli, jaką odgrywa w nich ogon-C.

Wyniki moich badań zapewniły wgląd w zmiany ruchliwości ważnych z funkcjonalnego punktu widzenia fragmentów domeny izomerazowej syntazy GlcN-6-P pochodzącej z *C. albicans*, mające miejsce na skutek związania fizjologicznego inhibitora, jakim jest UDP-GlcNAc. Zmiany te obejmują między innymi zaburzenia katalitycznej aktywności kilku reszt aminokwasowych, w tym His607$^{\#}$, oraz stopień ruchliwości ogona-C. Jako że cztery końcowe aminokwasy ogona-C odgrywają kluczową rolę w komunikacji i przekazywaniu sygnału pomiędzy domenami enzymu (Olchowy et al. 2007), wspomniane zmiany mogą być odpowiedzialne za inhibicję enzymu pod wpływem UDP-GlcNAc.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

V. Podziękowania

Praca została wykonana z wykorzystaniem Infrastruktury PL-Grid.

Obliczenia wykonano w pracowni Modelowania Molekularnego Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej oraz na komputerach Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej w Gdańsku oraz Cyfronetu w Krakowie. Serdecznie dziękuję wymienionym ośrodkom za udostępnienie zasobów komputerowych niezbędnych do przeprowadzenia symulacji oraz analiz trajektorii.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

VI. Literatura

Amadei, A., Linssen, A.B.M. & Berendsen, H.J.C., 1993. Essential dynamics of proteins. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 17(4), pp.412–425.

Amaro, R. & Luthey-Schulten, Z., 2004. Molecular dynamics simulations of substrate channeling through an α–β barrel protein. *Chemical Physics*, 307(2–3 SPEC.ISS.), pp.147–155.

Amaro, R.E. et al., 2005. Structural elements in IGP synthase exclude water to optimize ammonia transfer. *Biophysical Journal*, 89(1), pp.475–87.

Atsumi K., Oiwa R., Omura S., 1975. Production of bacillin by *Bacillus* sp. strain No. KM-208 and its identity with tetaine (bacilysin). *Journal of Antibiot*ics, 28, pp.77–78.

Badet-Denisot, M.A., Rene, L. & Badet, B., 1993. Mechanistic investigations on Glucosamine-6-phosphate synthase. *Bulletin De La Societe Chimique De France*, 130(3), pp.249–255.

Badet, B., Vermoote, P. & Le Goffic, F., 1988. Glucosamine synthetase from *Escherichia coli* - kinetic mechanism and inhibition by N^3-Fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry*, 27(7), pp.2282–2287.

Baldauf, S.L. & Palmer, J.D., 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), pp.11558–62.

Balsera, M.A. et al., 1996. Principal component analysis and long time protein dynamics. *Journal of Physical Chemistry*, 100(7), pp.2567–2572.

Barrick, J.E. et al., 2004. New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), pp.6421–6.

Bates, C.J., Adams, W.R. & Handschumacher, R.E., 1966. Control of the formation of uridine diphospho-*N*-acetyl-hexosamine and glycoprotein synthesis in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 241(8), pp.1705–1712.

Bera, A.K., Smith, J.L. & Zalkin, H., 2000. Dual role for the glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase ammonia channel - interdomain signaling and intermediate channeling. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), pp.7975–7979.

Berendsen, H.J., 1984. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Chemical Physics*, 81(8), pp.3684–3690.

Bernstein, H.J., 2000. Recent changes to RasMol, recombining the variants. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(9), pp.453–455.

Bontemps-Gracz, M., Milewski, S. & Borowski, E., 1991. The Influence of L-Norvalyl-N^3-4-methoxyfumaroyl-L-2,3-diaminopropanoic acid, an antifungal agent, on mammalian cells in tissue culture. *Acta Biochimica Polonica*, 38(2), pp.229–239.

Borgia, P.T., 1992. Roles of the *orlA*, *tsE*, and *bimG* genes of *Aspergillus nidulans* in chitin synthesis. *Journal of Bacteriology*, 174(2), pp.384–9.

Brooks, B.R. et al., 1983. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2), pp.187–217.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Bruhl W., Brzozowski R., 1979. *Vademecum Lekarza Ogólnego*. Warszawa: PZWL.

Buse, M.M.G., 2006. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology-Endocrinology*, 290(1), pp.1–15.

Chang, Q. et al., 2000. Phosphorylation of human glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), pp.21981–21987.

Cheatham, T.E.I. et al., 1995. Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular systems: the particle mesh Ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA, and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 117(14), pp.4193–4194.

Chmara, H., Andruszkiewicz, R. & Borowski, E., 1986. Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthetase from Salmonella typhimurium LT2 by fumaroyl diaminopropanoic acid derivatives, a novel group of glutamine analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, 870(2), pp.357–366.

Chmara H., et al., 1998. Antibacterial action of dipeptides containing an inhibitor of glucosamine-6-phosphate isomerase. *Microbiology (UK,)* 144, pp. 1349–1358.

Clark, M., 1989. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *Journal of Computational Chemistry*, 10(8), pp.982–1012.

Czermiński, J.B. et al., 1986. *Metody statystyczne dla chemików*, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe.

Devilliers, J., Karcher, W. (red.), 1991. *Applied Multivariate Analysis in SAR and Environmental Studies*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.

Donchev, A.G. et al., 2005. A quantum mechanical polarizable force field for biomolecular interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), pp.7829–7834.

Dossena, L., Curti, B. & Vanoni, M.A., 2007. Activation and coupling of the glutaminase and synthase reaction of glutamate synthase is mediated by E1013 of the ferredoxin-dependent enzyme, belonging to loop 4 of the synthase domain. *Biochemistry*, 46(15), pp.4473–4485.

Durand, P. et al., 2008. Highlights of glucosamine-6P synthase catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474(2), pp.302–17.

Endo, A., Kakiki, K. & Misato, T., 1970. Feedback inhibition of L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase by uridine diphosphate *N*-acetylglucosamine in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 103(3), pp.588–594.

Etchebehere, L.C. & da Costa Maia, J., 1989. Phosphorylation-dependent regulation of amidotransferase during the development of *Blastocladiella emersonii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 272(2), pp.301–310.

Floquet, N. et al., 2007. Ammonia channeling in bacterial glucosamine-6-phosphate synthase (Glms): molecular dynamics simulations and kinetic studies of protein mutants. *FEBS Letters*, 581(16), pp.2981–7.

Floquet, N., et al., 2009. Collective motions in glucosamine-6-phosphate synthase: influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site. *Journal of Molecular Biology*, 385(2), pp.653–664.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Freese, E.B. et al., 1970. Growth, sporulation, and enzyme defects of glucosamine mutants of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 101(3), pp.1046–1062.

Frisa, P.S. & Sonneborn, D.R., 1982. Developmentally regulated interconversions between end product-inhibitable and noninhibitable forms of a first pathway-specific enzyme activity can be mimicked in vitro by protein dephosphorylation-phosphorylation reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(20), pp.6289–93.

Gabriel, I. et al., 2004. Phosphorylation of glucosamine-6-phosphate synthase is important but not essential for germination and mycelial growth of *Candida albicans*. *Fems Microbiology Letters*, 235(1), pp.73–80.

Golinelli-Pimpaneau, B. & Badet, B., 1991. Possible involvement of Lys603 from *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase in the binding of its substrate fructose 6-phosphate. *European Journal of Biochemistry*, 201(1), pp.175–182.

Haile, J. M., 1993. Molecular dynamics simulation: Elementary methods. *Computers in Physics*, 7(6), pp. 625-625.

Hess, B., 2002. Convergence of sampling in protein simulations. *Physical Review E*, 65(3), pp.1–10.

Hess, B. et al., 2008. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(3), pp.435–447.

Hess, B. et al., 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), pp.1463–1472.

Hess, B., 2008. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(1), pp.116–122.

Hess, B., 2000. Similarities between principal components of protein dynamics and random diffusion. *Physical Review E*, 62(6), pp.8438–8448.

Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K., 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), pp.33–38.

Isupov, M.N. et al., 1996. Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: Evidence from the 1.8 angstrom crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase. *Structure*, 4(7), pp.801–810.

Jorgensen, W.L. & Tirado-Rives, J., 1988. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, 110(6), pp.1657–1666.

Kalamorz, F. et al., 2007. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 65(6), pp.1518–1533.

Kao, A.S. et al., 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(5), pp.1164–1170.

Karplus, M., 2003. Molecular dynamics of biological macromolecules: A brief history and perspective. In *Biopolymers*. pp. 350–358.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Klein, D.J. & Ferré-D'Amaré, A.R., 2006. Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5794), pp.1752–6.

Kneller, G.R. & Mülders, T., 1996. Nose-Andersen dynamics of partially rigid molecules: Coupling all degrees of freedom to heat and pressure baths. *Physical Review E*, 54(6), pp.6825–6837.

Kornfeld, R., 1967. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, (13).

Kryński S., et al., 1952. Badania nad własnościami antybiotycznymi szczepu *B. cereus*. *Bulletin of the State Institute of Marine and Tropical Medicine*, 4, pp.310–318.

Kucharczyk N., et al., 1990. Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*: determination of the mechanism of inactivation by N^3-fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry*, 29, pp. 3668–367.

Kwiatkowska-Semrau, K., 2015. Modyfikacja właściwości syntazy glukozamino-6-fosforanu z *Candida albicans* poprzez ukierunkowaną mutagenezę (rozprawa doktorska), Politechnika Gdańska, Gdańsk.

Lifson, S., Hagler, A. T. & Dauber, P., 1979. Consistent Force Field Studies of Intermolecular Forces in Hydrogen-Bonded Crystals. 1. Carboxylic Acids, Amides and the C=O...H-Hydrogen Bonds. *Journal of the American Chemical Society*, 101(AUGUST 1979), pp.5111–5121.

Maia, J.C., 1994. Hexosamine and cell wall biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *FASEB Journal*, 8(11), pp.848–853.

Mała Encyklopedia Zdrowia (1967). Warszawa: PWN.

Mantsala P., Zalkin H., 1984. Glutamine amidotransferase function. Replacement of the active-site cysteine in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by site-directed mutagenesis. *Journal of Biololgical Chemistry*, 256, pp. 14230-14236.

Marshall, S., 2006. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006(346), p.re7-re7.

Marshall, S., Bacote, V. & Traxinger, R.R., 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), pp.4706–12.

Massiere F., Badet-Denisot M.A., 1998. The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cellular and Mololecular Life Science*, 54, pp. 205–222.

McCammon, J.A. & Harvey, S.C., 1987. *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014579389809792.

Mei, B. & Zalkin, H., 1989. A cysteine-histidine-aspartate catalytic triad is involved in glutamine amide transfer function in purF-type glutamine amidotransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(28), pp.16613–9.

Mei, B.G. & Zalkin, H., 1990. Amino-terminal deletions define a glutamine amide transfer domain in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase and other purF-type amidotransferases. *Journal of Bacteriolology*, 172(6), pp.3512–3514.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Milewski, S. et al., 1988. Antifungal peptides with novel specific inhibitors of Glucosamine 6-phosphate synthase. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 14(7), pp.461–465.

Milewski, S. et al., 1998. Antihistoplasmal in vitro and in vivo effect of Lys-Nva-FMDP. *Medical Mycology*, 36(3), pp.177–180.

Milewski, S., 2002. Glucosamine-6-phosphate synthase-the multi-facets enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597(2), pp.173–192.

Milewski, S. et al., 1991. Mechanism of action of anticandidal dipeptides containing inhibitors of Glucosamine-6-phosphate synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(1), pp.36–43.

Milewski, S., et al., 1999. Oligomeric structure and regulation of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), pp.4000–8.

Miyagi, T. & Tsuiki, S., 1971. Effect of phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate on UDP-*N*-Acetylglucosamine inhibition of l-glutamine:d-fructose 6-phosphate aminotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology*, 250(1), pp.51–62.

Mouilleron, S. et al., 2011. Dynamics of glucosamine-6-phosphate synthase catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(1), pp.1–12.

Mouilleron, S., Badet-Denisot, M.-A.A. & Golinelli-Pimpaneau, B., 2008. Ordering of C-terminal loop and glutaminase domains of glucosamine-6-phosphate synthase promotes sugar ring opening and formation of the ammonia channel. *Journal of Molecular Biology*, 377(4), pp.1174–1185.

Mouilleron, S., Badet-Denisot, M.A. & Golinelli-Pimpaneau, B., 2006. Glutamine binding opens the ammonia channel and activates glucosamine-6P synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), pp.4404–4412.

Mouilleron, S. & Golinelli-Pimpaneau, B., 2007. Domain motions of glucosamine-6P synthase: Comparison of the anisotropic displacements in the crystals and the catalytic hinge-bending rotation. *Protein Science*, 16(3), pp.485–493.

Oki, T. et al., 1999. cDNA cloning and mapping of a novel subtype of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT2) in human and mouse. *Genomics*, 57(2), pp.227–234.

Olchowy, J. et al., 2005. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the isomerase domain of glucosamine-6-phosphate synthase from *Candida albicans*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 61, pp.994–996.

Olchowy, J., Gabriel, I. & Milewski, S., 2007. Functional domains and interdomain communication in *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *The Biochemical journal*, 404(1), pp.121–30.

Paluh J., et al., 1985. Study of anthranilate synthase function by replacement of cysteine84 using site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chem*istry, 260, pp. 1889-1894.

Pantano, S. et al., 2004. Molecular dynamics simulations on HIV-1 Tat. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 33(4), pp.344–351.

Pierce, J., Serianni, A. S., & Barker, R., 1985. Anomerization of furanose sugars and sugar

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

phosphates. *Journal of the American Chemical Society*, 107(8), pp.2448-2456.

Plumbridge, J. & Kolb, A., 1995. Nag repressor-operator interactions: protein-DNA contacts cover more than two turns of the DNA helix. *Journal of Molecular Biology*, 249(5), pp.890–902.

Pluta, W., 1977. *Wielowymiarowa analiza porównawcza w badaniach ekonomicznych*. Warszawa: PWE.

Raczyńska, J. et al., 2007. The crystal and solution studies of glucosamine-6-phosphate synthase from *Candida albicans*. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), pp.672–688.

Rapp C., et al., 1988. Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an antifungal dipeptide with an unusual chlorine-containing amino acid. *Angewandte Chemie. Int. Ed. Engl.*, 27, pp. 1733–1734.

Rogers H.J., Newton G.G.F., Abraham E.P., 1965. Production and purification of bacilysin. *Biochemical Journal*, 97, pp. 573–578.

Sarvas, M., 1971. Mutant of Escherichia coli K-12 defective in D-glucosamine biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 105(2), pp.467–471.

Sayeski, P. P. et al., 1997. Cloning and partial characterization of the mouse glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (*GFAT*) gene promoter. *Nucleic Acids Research*, 25(7), pp.1458–1466.

Schlick, T., 2010. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*, New York, NY: Springer New York.

Schuttelkopf, A. W. & van Aalten, D.M.F., 2004. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 60, pp.1355–1363.

Sharaf, M. A., Illman, D. L., & Kowalski, B. R., 1986. *Chemometrics* (Vol. 82). John Wiley & Sons.

Smith J. L., 1995. Structures of glutamine amidotransferases from the purine biosynthetic pathway. *Biochemical Society Transactions*, 23, pp.894–898.

Van der Spoel, D. et al., 2005. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), pp.1701–1718.

Sudarsan, N., Barrick, J.E. & Breaker, R.R., 2003. Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(6), pp.644–647.

Teplyakov, A. et al., 2001. Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase1. *Journal of Molecular Biology*, 313(5), pp.1093–1102.

Teplyakov, A., et al., 2002. From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. *Natural Product Reports*, 19(1), pp.60–69.

Teplyakov, A., et al., 2002. From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. *Natural Product Reports*, 19(1), pp.60–69.

Teplyakov, A. et al., 1998. Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 angstrom crystal structure of the isomerase domain. *Structure with Folding & Design*, 6(8), pp.1047–1055.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Teplyakov, A. et al., 1999. The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Science*, 8(3), pp.596–602.

Todorova, R., 2001. Isomerase activity of the C-terminal fructose-6-phosphate binding domain of glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Enzyme Inhibition*, 16(4), pp.373–380.

Tourian, A., Callahan, M. & Hung, W., 1983. L-glutamine D-fructose-6-P aminotransferase regulation by glucose-6-P and UDP-*N*-acetylglucosamine. *Neurochemical Research*, 8(12), pp.1589–1595.

Traxinger, R.R. & Marshall, S., 1991. Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine: Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), pp.10148–10154.

Tsuiki, S. & Miyagi, T., 1975. Carcinofetal alterations in glucosamine-6-phosphate synthetase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 259, pp.298–306.

Urban, J.H. et al., 2007. A conserved small RNA promotes discoordinate expression of the glmUS operon mRNA to activate GlmS synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 373(3), pp.521–528.

Warren, L., Fuhrer, J. P., & Buck, C. A., 1972. Surface glycoproteins of normal and transformed cells: a difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(7), pp.1838-1842.

Warzocha, K., 2008. Diagnostyka i leczenie układowych zakażeń grzybiczych w onkohematologii Diagnosis and treatment of fungal infections in oncohematology. *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 4(1), pp.15–24.

Weiner, S.J. et al., 1986. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *Journal of Computational Chemistry*, 7(2), pp.230–252.

Whelan, W.L. & Ballou, C.E., 1975. Sporulation in D-glucosamine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*: meiosis with defective ascospore wall formation. *Journal of Bacteriology*, 124(3), pp.1545–57.

Winkler, W.C. et al., 2004. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, 428(6980), pp.281–286.

Winkler, W.C. & Breaker, R.R., 2005. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), pp.487–517.

Winterburn, P.J. & Phelps, C.F., 1971. Studies on the control of hexosamine biosynthesis by glucosamine synthetase. *The Biochemical Journal*, 121(4), pp.711–20.

Woynarowska B., Witkowski A., Borowski E., 1985. Differential inhibition of DNA and RNA biosynthesis in HeLa S3 cells by tetaine, a dipeptide antibiotic. *Acta Biochimica Polonica*, 34, pp. 199–206.

Wojciechowski M., Mazerski J., Borowski E., 1995. Constrained search of conformational hyperspace of inactivators of glucosamine-6-phosphate synthase. *Journal of Enzyme Inhition.*, 10, pp. 17–26.

Yamazaki, K. et al., 2000. Cloning and characterization of mouse glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 gene promoter. *Gene*, 261(2), pp.329–336.

Yki-Jarvinen, H. et al., 1999. Glutamine: Fructose-6-phosphate amidotransferase activity

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

and gene expression are regulated in a tissue-specific fashion in pregnant rats. *Life Sciences*, 65(2), pp.215–223.

Zalkin H., eta., 1985. Identification of a trp-related glutamine amide transfer domain in *Escherichia coli* GMP Synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 260, pp. 3350-3354.

Zalkin, Howard., 1993. The amidotransferases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 66, pp. 203-203.

Zheng, J., Khalil, M. & Cannon, J.F., 2000. Glc7p protein phosphatase inhibits expression of glutamine-fructose-6-phosphate transaminase from *GFA1*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), pp.18070–18078.

Zhou, J. et al., 1998. Regulation of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase. *Diabetes*, 47(12), pp.1836–1840.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

VIII. Dorobek naukowy

Publikacje

1. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S. (2011*) Long range molecular dynamics study of regulation of eukaryotic lucosamine-6-phosphate synthase activity by UDP-GlcNAc*, Journal of Molecular Modeling, Vol. 17, No. 12, 2011, s. 3103-3115, ISSN 1610-2940
2. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M.. (2016*) Long range molecular dynamics study of interactions of the eukaryotic glucosamine-6-phosphate synthase with fructose-6-phosphate and UDP-GlcNAc* – manuskrypt w przygotowaniu

Materiały pokonferencyjne

1. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Metoda głównych składowych w analizie wyników otrzymanych za pomocą dynamiki molekularnej*, VII Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne: Biomeditech: Badania i Innowacje / Biomeditech: badania i innowacje: zeszyty naukowe / M. Czubenko, T. Merta / Politechnika Gdańska - Gdańsk : Expol, P. Rybiński, J. Dąbek, sp.j., 2011, s. 157/61-66, ISBN 978-83-89836-79-3.
2. **Miszkiel A.**, *Computational methods for calculation of binding free energy for ligand–receptor complexes*, 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers :"Advances in Chemical and Mechanical Engineering" / Cyprian Fijało / Faculty of Mechanical Engineering, Gdansk University of Technology - Gdańsk - 2/2, 2011, s. 92-97, ISBN 978-83-88579-67-7.
3. **Miszkiel A.**, *Modelowanie molekularne w projektowaniu nowych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych*, CreativeTime: Science&Business: Rola dokonań młodych naukowców a możliwości osiągnięcia sukcesu naukowego i zawodowego / mgr inż. Marcin Kuczera - Kraków : CREATIVETIME, 2011, s. 216/99-102, ISBN 978-83-63058-08-1
4. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Coarse-grained simulation – an efficient approach for studying motions of large proteins*, 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: "Advances in Chemical and Mechanical Engineering" / Cyprian Fijało / Faculty of Mechanical Engineering, Gdansk University of Technology - Gdańsk - 2/2, 2012, s. 63-67, ISBN 978-83-88579-08-0.
5. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Molecular dynamics and verisimilitude – to what extent can one trust a computational simulation*, PhD Interdisciplinary Journal N°1 (2012) s. 24-25, ISBN 978-83-63041-25-0.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wystąpienia ustne oraz plakaty

1. **Miszkiel A.**, *Regulacja aktywności enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu pochodzącego z C. albicans*, III Ogólnopolska Konferencja: Biotechnologia Molekularna: Biotechnologia - od badań podstawowych do wdrożeń : BioMillenium 2009, Gdańsk, 22-24 października 2009 (plakat)
2. **Miszkiel A.**, *Ocena zbieżności trajektorii w analizie wyników otrzymanych metodą dynamiki molekularnej*, VI Ogólnopolskie Studencie Seminarium Naukowo-Technologiczne : Biomeditech : badania i innowacje, Poznań, 12-17 kwietnia 2010 (plakat)
3. **Miszkiel A.**, *Regulacja aktywności enzymu syntazy glukozamino-6-fosforanu pochodzącego z C. albicans przy udziale jej fizjologicznego inhibitora, UDP-GlcNAc*, VI Ogólnopolskie Studencie Seminarium Naukowo-Technologiczne: Biomeditech: badania i innowacje, Poznań, 12-17 kwietnia 2010 (wystąpienie ustne)
4. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Kształty pudełek symulacyjnych stosowanych w dynamice molekularnej przeprowadzanej przy użyciu programów pakietu obliczeniowego GROMACS*, VII Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne : Biomeditech : Badania i Innowacje, Sopot, 9-13 maja 2011 (plakat)
5. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Metoda głównych składowych w analizie wyników otrzymanych za pomocą dynamiki molekularnej*, VII Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne: Biomeditech: Badania i Innowacje, Sopot, 9-13 maja 2011(wystąpienie ustne)
6. **Miszkiel A.**, *Computational methods for calculation of binding free energy for ligand–receptor complexes*, 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers, Gdańsk, 5-7 maja 2011 (wystapienie ustne)
7. **Miszkiel A.**, *Modelowanie molekularne w projektowaniu nowych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych*, CreativeTime: Science&Business: Rola dokonań młodych naukowców a możliwości osiągnięcia sukcesu naukowego i zawodowego, Kraków, 10-11 czerwca 2011 (plakat)
8. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Structural features responsible for control of the eukaryotic GlcN-6-P synthase activity*, IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH : Four Colours of Biotechnology Central European Congress of Life Sciences, Kraków, 12-15 października 2011 (plakat)
9. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Coarse-grained simulation – an efficient approach for studying motions of large proteins*, 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers, Gdańsk, 16-19 maja 2012 (wystapienie ustne)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

10. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Activity regulation of GlcN-6-P synthase as an alternative way for diabetes treatment*, Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting Biochemistry for Health and Environment, Poznań 11-14 września 2012 (wystąpienie ustne)
11. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Computational methods for determining the role of water molecules present in a protein-ligand binding site*, 10th Workshop on Bioinformatics and 5th Symposium of the Polish Bioinformatics Society, Gdańsk, 25-27 maja 2012 (plakat)
12. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Molecular dynamics and verisimilitude – to what extent can one trust a computational simulation?*, International Conference BioTech 2012, Gdańsk, 28-30 września 2012 (wystapienie ustne)
13. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *From letters to graphics – biological data visualization via molecular graphics*, International Conference BioTech 2012, Gdańsk, 28-30 września 2012 (plakat)
14. **Miszkiel A.**, Wojciechowski M., Milewski S., *Influence of equilibration parameters on performance of molecular dynamics simulation for a coarse-grained model of a large protein*, 10th European Conference on Computational Chemistry (EuCO-CC 2015), Fulda 31 września – 3 października 2015 (plakat)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Stypendia naukowe i staże:

1. Udział w warsztatach naukowych „Accelrys Polish Molecular Modelling Workshop and User Group Meeting in Warsaw" organizowanej przez ICM, Uniwersytet Warszawski; Warszawa; czerwiec 2011
2. Udział w warsztatach naukowych „Vienna Summer School – Drug Design", organizowanych przez European Phrmacoinformatics Initiative EUROPIN ; Wiedeń, Austria; wrzesień 2011
3. Stypendium projakościowe; rok akademicki 2011/2012
4. Stypendium dla najlepszych doktorantów; rok akademicki 2011/2012
5. Stypendium Rektora Politechniki Gdańskiej dla najlepszych doktorantów; rok akademicki 2011/2012
6. Stypendium naukowe InterPhD dla doktorantów uzyskane w ramach III edycji projektu "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" (POKL.04.01.01-00-368/09, 2009-2015); rok akademicki 2011/2012
7. Stypendium naukowe w ramach V edycji projektu „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów", realizowanego przez Pomorską Specjalną Strefę Ekonomiczną sp. zoo i Gdański Park Naukowo-Technologiczny; rok akademicki 2012-2013
8. Zagraniczne stypendium wyjazdowe InterPhD dla doktorantów uzyskane w ramach projektu "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" (POKL.04.01.01-00-368/09, 2009-2015): staż w Institute for Protein Design, University of Washington, Seattle, USA; październik – grudzień 2013
9. Grant NCN *Preludium* nr UMO-2013/09/N/NZ2/02616

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl