

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Jakub Barciszewski

**Strukturalne podstawy działania
ludzkiej mięśniowej
fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu**

Poznań 2016

Praca wykonana
w Zakładzie Krystalografii – Centrum Badań Biokrytalograficznych
Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu

Promotor
Prof. dr hab. Mariusz Jaskólski

Praca przedstawiona
Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia
doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii

Dziękuję

*Prof. dr hab. Mariuszowi Jaskólskiemu
Za cierpliwość i wyrozumiałość,
eleganckie rozmowy i owocne cross-talks,
ironiczne i inteligentne komentarze
oraz precyzyjne sugestie.*

*Prof. dr hab. Andrzejowi Dżugajowi
i Prof. dr hab. Dariuszowi Rakusowi
za owocną współpracę.*

*Prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi
za życzliwość.*

*Research is to see what everybody else has seen,
And to think what nobody else has thought.*

Albert Szent Györgi

Dane dyfrakcyjne wykorzystane w tej pracy zarejestrowane zostały przy użyciu promieniowania synchrotronowego w ośrodku HZB BESSY II w Berlinie

Badania były częściowo finansowane:

- przez NCN w ramach konkursu OPUS 5 nr projektu 2013/09/B/NZ1/01081**
- ze środków 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej na lata 2007-2013 w ramach projektu BioStruct-X (N 283570)**

Podstawą pracy jest osiem struktur zdeponowanych w banku struktur białkowych PDB (ang. Protein Data Bank):

- 5ET5 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in active R-state
- 5ET6 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in inactive T-state in complex with AMP
- 5ET7 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in inactive T-state
- 5ET8 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in active R-state in complex with F6P
- 5K56 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in active R-state in complex with F-1,6-BP
- 5K54 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase E69Q mutant in active R-state
- 5K55 – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase E69Q mutant in active R-state in complex with F6P
- 5L0A – Human muscle fructose-1,6-bisphosphatase E69Q mutant in active R-state in complex with F-1,6-BP

Obrazy dyfrakcyjne zostały zdeponowane w Repozytorium Otwartych Danych Uniwersytetu Warszawskiego (RepOD):

1. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in inactive T-state. <http://dx.doi.org/10.18150/2374334>
2. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in inactive T-state in complex with AMP. <http://dx.doi.org/10.18150/8324764>
3. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in active R-state. <http://dx.doi.org/10.18150/6428373>
4. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in active R-state in complex with F6P. <http://dx.doi.org/10.18150/2073150>
5. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase in active R-state in complex with F-1,6-BP. <http://dx.doi.org/10.18150/7369446>
6. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase E69Q mutant in active R-state. <http://dx.doi.org/10.18150/3279048>
7. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase E69Q mutant in active R-state in complex with F6P. <http://dx.doi.org/10.18150/2931163>
8. Raw X-ray diffraction data for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase E69Q mutant in active R-state in complex with F-1,6-BP. <http://dx.doi.org/10.18150/3968588>

Część wyników była tematem następujących wystąpień konferencyjnych, posterów i publikacji naukowych:

“Structural basis of fructose biphosphatase function” - komunikat ustny
17th Heart of Europe bio-Crystallography Meeting, Berlin, Niemcy (25-27.09.2014)

“Unique rearrangement observed in the crystals of human muscle fructose-1,6-bisphosphatase” - poster
5th Joint BER II and BESSY II User Meeting, - Berlin, Niemcy (4-6.12.2013)

“Evolution of regulatory properties of fructose-1,6-bisphosphatase” - poster
FEBS EMBO 2014 Conference, Paryż, Francja (30.08-4.09.2014),

“A dramatic conformational change is involved in allosteric regulation of muscle FBPase” - poster
1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics, Warszawa, Polska (9-12.09.2014)

Barciszewski, J., Wisniewski, J., Kolodziejczyk, R., Jaskolski, M., Rakus, D. Dzugaj, A. (2016). T-to-R switch of muscle FBPase involves extreme changes of secondary and quaternary structure. *Acta Cryst. D72*, 536–550.

1. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	11
2. WPROWADZENIE I CEL PRACY	14
3. MECHANIZMY REGULACJI POZIOMU GLUKOZY W ORGANIZMIE	16
3.1. Glukostaza	16
3.1.1. Glukoza i glikogen	18
3.1.2. Glikoliza	20
3.1.3. Glikogenoliza	26
3.1.4. Glikogenogeneza	27
3.1.5. Glukoneogeneza	28
3.1.6. Glikoneogeneza	30
3.1.7. Regulacja glukostazy	31
3.2. Fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu	33
3.2.1. Enzymy prokariotyczne	34
3.2.2. Enzymy eukariotyczne	36
3.2.2.1. FBPazy roślinne	36
3.2.2.2. Wątrobowy i mięśniowy izoenzym FBPazy	38
3.3. Patologie związane z zaburzeniami metabolizmu węglowodanów	49
4. MATERIAŁY I METODY	52
4.1. Odczynniki i bufony	52
4.2. Otrzymywanie i oczyszczanie białka	55
4.2.1. Nadekspresja w bakteriach <i>Escherichia coli</i>	55
4.2.2. Liza komórek	55
4.2.3. Oczyszczanie wstępne	56
4.2.4. Chromatografia powinowactwa	59
4.2.5. Przygotowanie białka do krystalizacji	60

4.2.6. Usuwanie AMP z białka	60
4.3. Ocena jakości preparatów	60
4.3.1. Oznaczanie stężenia białka	60
4.3.2. Oznaczanie czystości białka	61
4.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym	61
4.3.4. Oznaczanie aktywności enzymatycznej FBPazy	61
4.4. Krystalizacja	62
4.5. Pomiary dyfrakcyjne i obróbka danych	63
4.6. Rozwiązywanie struktur	66
4.7. Udokładnianie struktur	68
4.8. Ocena jakości struktur	69
4.9. Analiza i prezentacja wyników	70
5. WYNIKI BADAŃ	71
5.1. Otrzymywanie i oczyszczenie FBPazy	71
5.2. Krystalizacja FBPazy	76
5.2.1. Krystalizacja białka natywnego w kompleksie z AMP	76
5.2.2. Krystalizacja białka natywnego wolnego od AMP	77
5.2.3. Krystalizacja mutantu E69Q wolnego od AMP	78
5.3. Pomiary dyfrakcyjne, rozwiązywanie i udokładnianie struktur FBPazy	78
5.3.1. Białko natywne w kompleksie z AMP	78
5.3.2. Białko natywne po nasączeniu jonami magnezu	81
5.3.3. Białko natywne wolne od AMP	84
5.3.4. Białko natywne wolne od AMP nasączone produktem (F6P)	87
5.3.5. Białko natywne wolne od AMP nasączone substratem (F-1,6-BP)	89
5.3.6. Mutant E69Q wolny od AMP	92
5.3.7. Mutant E69Q wolny od AMP nasączone produktem (F6P)	94
5.3.8. Mutant E69Q wolny od AMP nasączone substratem (F-1,6-BP)	96

6. DYSKUSJA WYNIKÓW	99
6.1. Struktury krystaliczne ludzkiej mięśniowej FBPazy	99
6.2. Protomer	101
6.2.1. Budowa ogólna	101
6.2.2. Miejsce allosteryczne/inhibitorowe	105
6.2.3. Miejsce aktywne	109
6.2.4. Pętla katalityczna	115
6.2.5. Mutacja E69Q	116
6.3. Dimer	117
6.3.1. Budowa ogólna	117
6.4. Tetramer	122
6.4.1. Budowa ogólna	122
6.4.2. Zatrząsk leucynowy	124
6.4.3. Obrót dimer-dimer	126
6.5. Mechanizm przenoszenia sygnału aktywacji/inhibicji	130
7. PODSUMOWANIE	134
8. STRESZCZENIE	137
9. ABSTRACT	139
10. BIBLIOGRAFIA	141

1. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

ADP	– difosforan 5'-adenozyny
ALDO	– aldolaza fruktozobisfosforanowa
AMP	– fosforan 5'-adenozyny
APS	– nadsiaraczan amonu
ARI	– Art Robbins Instruments (nazwa firmy)
ATP	– trifosforan 5'-adenozyny
BAA	– N,N'-metylenobisakryloamid
BLOSUM	– macierz substytucji (ang. Blocks Substitution Matrix)
BSA	– albumina z surowicy wołowej
BTP	– 1,3-bis-Tris propan
CCD	– detektor półprzewodnikowy (ang. Charge coupled device)
CCP4	– Collaborative Computing Project Number 4 (pakiet programów do obliczeń krystalograficznych)
CoA	– koenzym A
CSD	– baza struktur Cambridge (ang. Cambridge Structural Database)
Da	– dalton
DHAP	– fosforan dihydroksyacetonu
DTT	– ditiotreitól
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy
ENO	– hydrataza fosfopirogronianowa
F-1,6-BP	– fruktozo-1,6-bisfosforan
F-2,6-BP	– fruktozo-2,6-bisfosforan
F6P	– fruktozo-6-fosforan
FAD	– dinukleotyd flawinoadeninowy
FADH ₂	– zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy
FBPaza	– fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu
G1P	– glukoza-1-fosforan
G6PDH	– dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa
G6PI	– izomeraza glukoza-6-fosforanowa
GAP	– aldehyd-3-fosfoglicerynowy
GAPDH	– dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego

GDP	– difosforan 5'-guanozyny
GLUT	– białko transportujące glukozę
GTP	– trifosforan 5'-guanozyny
HEPES	– kwas β -hydroksy-4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynopropanosulfonowy
HR	– Hampton Research (nazwa firmy)
$I_{0,5}$	– stężenie inhibitora wymagane dla 50% hamowania aktywności enzymu (znane również jako IC50, I_{50})
IPTG	– izopropylo- β -D-tiogalaktopiranozyd
LB	– pożywka Luria-Bertani
LDH	– dehydrogenaza mleczanowa
MAD	– dostrajana dyfrakcja anomalna (ang. Multi-wavelength Anomalous Diffraction)
MDL	– Molecular Dimensions Ltd (nazwa firmy)
MIR	– wielokrotne podstawienie izomorficzne (ang. Multiple Isomorphus Replacement)
MPD	– 2-metylo-2,4-pentanodiol
MR	– podstawienie cząsteczkowe (ang. Molecular Replacement)
NAD^+	– utleniony dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADH	– zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
$NADP^+$	– utleniony ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy
NADPH	– zredukowany ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
PC	– karboksylaza pirogronianowa
PDB	– bank struktur białkowych (ang. Protein Data Bank)
PEG 6000	– glikol polietylenowy o średniej masie cząsteczkowej 6000 Da
PEP	– fosfoenolopirogronian
PFK	– fosfofruktokinaza
PFK2	– fosfofruktokinaza 2
PFKFB	– kinaza 2 fruktozo-6-fosforanu/fosfataza fruktozo-2,6-bisfosforanu
PGAM	– mutaza fosfoglicerynianowa
PGK	– kinaza fosfoglicerynowa
P_i	– fosforan nieorganiczny (ortofosforan)
PK	– kinaza pirogronianowa

PP _i	– nieorganiczny pirofosforan
rmsd	– średnie kwadratowe odchylenie (ang. root-mean square deviation)
rpm	– obroty na minutę (ang. revolutions per minute)
SDS	– dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	– elektroforeza w poliakrylamidowym żelu denaturującym z użyciem SDS
SIR	– pojedyncze podstawienie izomorficzne (ang. Single Isomorphus Replacement)
SPS	– syntaza fosforanowa sacharozy
TEMED	– N,N,N',N'-tetrametylenodiamina
TIM	– izomeraza triozofosforanowa
TLS	– parametry opisujące drgania bryły sztywnej (ang. translation, libration, screw motion)
TPI	– izomeraza glukozofosforanowa
Tris	– 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
U	– jednostka aktywności enzymatycznej
UDP	– difosforan urydyny
UTP	– trifosforan urydyny

2. WPROWADZENIE I CEL PRACY

Przemiany chemiczne zachodzące w organizmach żywych składają się na potężny metabolizm komórkowy, którego głównym celem jest wytworzenie energii oraz składników komórkowych takich jak kwasy nukleinowe, białka, niektóre kwasy tłuszczowe oraz związki małowcząsteczkowe. Głównym źródłem energii dla organizmu jest glukoza dostarczana z pokarmem lub wytwarzana z niecukrowych prekursorów. Glukoza jest niezbędna do prawidłowego działania wszystkich narządów wewnętrznych i szlaków metabolicznych, szczególnie dla centralnego układu nerwowego i erytrocytów. Utrzymanie optymalnego jej poziomu we krwi (glukostaza) jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów, a jej nadmiar lub niedobór jest przyczyną wielu chorób, które mogą ostatecznie doprowadzić do śmierci całego organizmu.

Za glukostazę odpowiada szereg wzajemnie połączonych szlaków metabolicznych. Najważniejsze z nich to glikoliza, w której glukoza rozkładana jest do pirogronianu oraz zachodzące w wątrobie i mięśniach procesy glukoneogenezy i glikoneogenezy polegające na resyntezie glukozy. Procesy rozkładu i resyntezy to przeciwstawne szlaki, w których biorą udział w większości te same enzymy. Oba procesy podlegają jednakowemu systemowi kontroli, ale nie zachodzą jednocześnie w danej komórce. Gdy jeden szlak jest nieaktywny, drugi w tym samym czasie charakteryzuje się dużą aktywnością.

Kluczowym enzymem glikoneogenezy i glukoneogenezy jest fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu (FBPaza, EC 3.1.3.11), która działa przeciwnie do fosfofruktokinazy (głównego enzymu glikolizy). FBPaza katalizuje hydrolizę fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu, a dzięki temu jest odpowiedzialna za kontrolę resyntezy glukozy. Fruktozo-1,6-bisfosfataza pełni również funkcje regulatorowe w jądrze komórkowym i mitochondriach.

FBPaza jest znana od ponad 80 lat, ale mimo głębokiej charakterystyki biochemicznej i strukturalnej nasza wiedza o precyzyjnych mechanizmach molekularnych aktywacji i deaktywacji tego organospecyficznego enzymu jest w dalszym ciągu ograniczona. U kręgowców występują dwa izoenzymy FBPazy, wątrobowy i mięśniowy. Oba charakteryzują się zbliżoną budową (u ssaków podobieństwo sekwencji wynosi 70%), ale zróżnicowaną podatnością na działanie tych samych substancji powodujących inhibicję.

Materiał doświadczalny zgromadzony w banku danych strukturalnych PDB dotyczy głównie FBPazy wątrobowej (ponad 80 struktur krystalicznych). Rozwiązane niedawno struktury enzymu mięśniowego (głównie w stanie nieaktywnym) nie przyniosły odpowiedzi na pytanie o przyczyny zróżnicowanej aktywności obu izoenzymów oraz wrażliwości na działanie inhibitorów. Wydawało się, że dopiero poznanie struktury enzymu w stanie aktywnym pozwoli zrozumieć molekularne podstawy mechanizmu aktywacji/inaktywacji FBPazy.

Celem moich badań było poznanie struktury ludzkiej mięśniowej FBPazy w stanie wolnym oraz w kompleksach. Otrzymałem czysty preparat rekombinowanej ludzkiej mięśniowej FBPazy, z którego uzyskałem kryształy białka w stanie wolnym oraz w kompleksach z inhibitorem, produktem i substratem reakcji. Rozwiązałem osiem struktur krystalicznych FBPazy. Dobra jakość kryształów oraz wysoka rozdzielczość map gęstości elektronowej pozwoliła znaleźć ugrupowanie reszt leucynowych na krawędziach podjednostek tetrameru FBPazy oraz przeanalizować ich charakterystyczne wzajemne oddziaływanie. Okazało się, że tworzą one swoistą strukturę, którą nazwałem „zatrzaskiem leucynowym”. Identyfikacja i wykazanie działania tej nowej domeny strukturalnej białka jest kluczowym wynikiem rozprawy oraz ważnym wkładem do zrozumienia mechanizmów regulujących aktywność oligomerycznych białek i enzymów.

3. MECHANIZM REGULACJI POZIOMU GLUKOZY W ORGANIZMIE

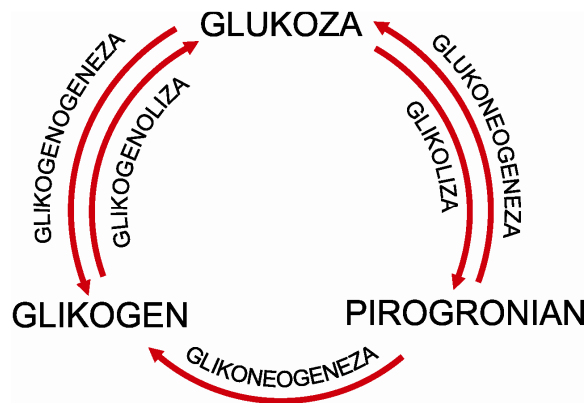
3.1. GLUKOSTAZA

Każda żywa komórka do swojego funkcjonowania potrzebuje stałego dopływu energii oraz substancji odżywczych dostarczanych wraz z pokarmem, który jest enzymatycznie hydrolizowany do kwasów tłuszczowych, cukrów prostych i aminokwasów. W kolejnych etapach są one przekształcane w składniki komórkowe. Podstawowym celem tych przemian jest stałe wytwarzanie energii komórkowej w postaci ATP i NADPH oraz synteza prekursorów makrocząsteczek. Zarówno rośliny jak i zwierzęta energię komórkową uzyskują w wyniku rozkładu substancji odżywczych. Rośliny (organizmy fototroficzne) same syntetyzują glukozę w procesie fotosyntezy, natomiast zwierzęta (organizmy chemotroficzne) pobierają ją z pokarmu.

Organizmy zwierzęce są wrażliwe zarówno na zbyt wysoki, jak i zbyt niski poziom glukozy. Już krótkotrwały niedobór cukru powoduje zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym, natomiast zbyt wysokie jego stężenie może prowadzić do nieenzymatycznej glikozylacji białek. Zatem poziom glukozy we krwi jest bardzo ważnym czynnikiem decydującym o prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, a jego utrzymanie (glukostaza) wymaga precyzyjnej kontroli metabolizmu węglowodanów. W utrzymaniu glukostazy uczestniczy ośrodkowy, współczulny i przywspółczulny układ nerwowy, a także gruczoły wydzielania wewnętrznego, takie jak trzustka oraz kora i rdzeń nadnerczy, wydzielające hormony: insulinę, glukagon, kortyzol i adrenalinę. W procesie regulacji glukostazy wciąż odkrywany jest udział nowych hormonów, jak np. leptyny i stosunkowo niedawno odkrytej greliny. Leptyna i grelina to dwa przeciwstawnie działające hormony odpowiadające za uczucie sytości i głodu. Uczestniczą w homeostazie glukozy i wpływają na wydzielanie insuliny [Otto-Buczowska i Chobot, 2012; Granata et al., 2010]. Także amyлина, która jest wytwarzana w trzustce, bierze udział w utrzymaniu glukostazy poprzez hamowanie opróżniania żołądka i wątrobowej produkcji glukozy po posiłku [Kruger et al., 2006].

W wielu organizmach wykryto geny zegarowe [Vitaterna et al., 1994; Eckel-Mahan i Sassone-Corsi, 2013]. Centralny zegar biologiczny zlokalizowany jest w przedniej części podwzgórza, w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN *suprachiasmatic nucleus*) zawierającym 10000-15000 neuronów. Podwzgórzowe neurony oreksynergiczne kontrolują równowagę energetyczną organizmu poprzez sterowanie syntezą glukozy

oraz jej wykorzystaniem [Tsuneki et al., 2012; Venner et al., 2011]. Działanie zegara polega na okresowej ekspresji genów zegarowych regulujących aktywację wybranych składników genomu, przez co ograniczony zostaje przebieg różnych procesów fizjologicznych i metabolicznych. Zegar biologiczny wpływa na syntezę glukozy w wątrobie i jej pobieranie przez różne tkanki [Frescas et al., 2005; Kalsbeek et al., 2010]. Zaburzenia w funkcjonowaniu zegara biologicznego są przyczyną wielu chorób [Sahar i Sassone-Corsi, 2012].



Rysunek 1. Podstawowe przemiany glukozy w organizmie.

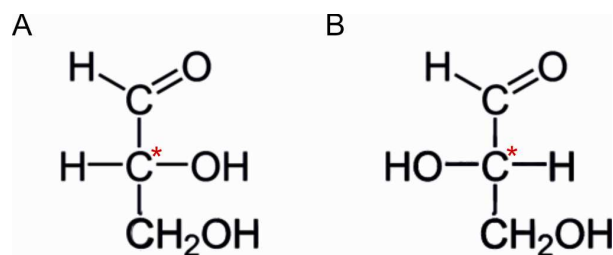
Poziom glukozy jest kontrolowany poprzez szereg wzajemnie połączonych wieloetapowych procesów (Rysunek 1). W procesie glikolizy glukoza przechodzi w pirogronian, który jest substratem do dalszych przemian energetycznych. W przypadku braku łatwo przyswajalnych węglowodanów organizm uruchamia zapas glikogenu, który w procesie glikogenolizy rozkładany jest do glukozy-6-fosforanu. Proces ten występuje w okresie między posiłkami, a także w czasie zwiększonego zapotrzebowania na energię, zarówno w czasie pracy mięśni, jak i mózgu. Gdy poziom glukozy jest zbyt wysoki, uruchomiona zostaje glikogenogeneza, czyli synteza glikogenu. Podczas długotrwałego wysiłku lub głodu, gdy zapas glikogenu ulega wyczerpaniu, do wytwarzania glukozy wykorzystywane są prekursorzy niecukrowe (aminokwasy, glicerol, mleczan). W procesach glukoneogenezy oraz glikoneogenezy przekształcane są one odpowiednio w glukozę oraz glukozy-6-fosforan, który jest substratem do syntezy glikogenu.

U ssaków największym konsumentem glukozy jako głównego źródła energii jest mózg [Howarth et al., 2012]. U dorosłych osobników mózg stanowi 2% masy ciała, ale zużywa 20% energii pochodzącej z metabolizmu glukozy [Mergenthaler et al., 2013]. Szlaki metaboliczne glukozy dostarczają prekursorów do biosyntezy neuroprzekazników,

a jeden z końcowych produktów glikolizy - mleczan, bierze udział w tworzeniu pamięci długotrwałej [Suzuki et al., 2011]. Każde zakłócenie prawidłowego metabolizmu glukozy jest podstawą patofizjologicznych zaburzeń pracy mózgu [Mergenthaler et al., 2013]. Tak więc warunkiem prawidłowego funkcjonowania organizmów wyższych jest utrzymanie optymalnego poziomu glukozy we krwi.

3.1.1. Glukoza i glikogen

Glukoza ($C_6H_{12}O_6$, cukier gronowy) należy do cukrów prostych, które zbudowane są z węgla, wodoru i tlenu, posiadają grupę aldehydową (aldozy) lub ketonową (ketozy) oraz liczne grupy OH. Występujące w nich asymetryczne atomy węgla determinują stereospecyficzność w reakcjach biochemicznych. Cukry proste występują w dwóch konfiguracjach, które wyprowadza się od aldehydu glicerynowego. Możliwe są dwie formy przestrzennego ułożenia podstawników przy asymetrycznym atomie węgla (*) (Rysunek 2). Jeśli w projekcji Fishera u góry umieścimy grupę aldehydową, a na dole $-CH_2OH$, to gdy grupa $-OH$ przy asymetrycznym atomie węgla jest po prawej stronie mamy formę D, a gdy po lewej formę L. W ten sposób przyporządkowano wszystkie cukry do szeregu D lub L (biorąc pod uwagę grupę $-OH$ przy najdalszym atomie węgla od grupy aldehydowej).

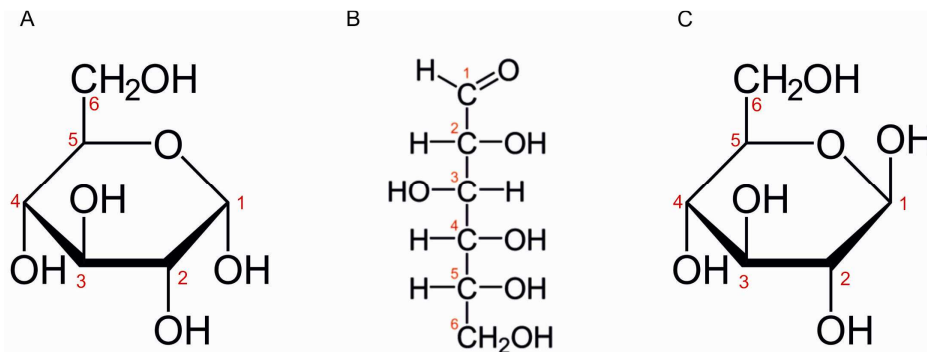


Rysunek 2. Ułożenie podstawników przy asymetrycznym atomie węgla (*) aldehydu glicerynowego.
A – forma D, B – forma L (Wzory zapisane są w projekcji Fishera).

Poza kilkoma wyjątkami, cukry proste występujące w organizmach żywych należą do szeregu D.

Ze względu na małą stabilność termodynamiczną węglowodany nie występują w środowisku wodnym w formie liniowej. Znajdujące się blisko siebie grupy aldehydowa i hydroksylowa reagują ze sobą tworząc hemiacetal i pierścieniową formę cukru, gdzie

węgiel C1 staje się węglem asymetrycznym. W wyniku zamknięcia pierścienia możliwa do uzyskania jest jedna z dwóch form optycznie czynnych. Ponadto w środowisku wodnym pierścienie hemiacetalu mogą ulegać mutarotacji z anomeru α do anomeru β i odwrotnie (Rysunek 3). Przejście pomiędzy anomerami przebiega poprzez liniowy stan przejściowy. Powyższy system nazewnictwa anomerów optycznie czynnych stosowany jest również dla fruktozy i innych cukrów prostych.

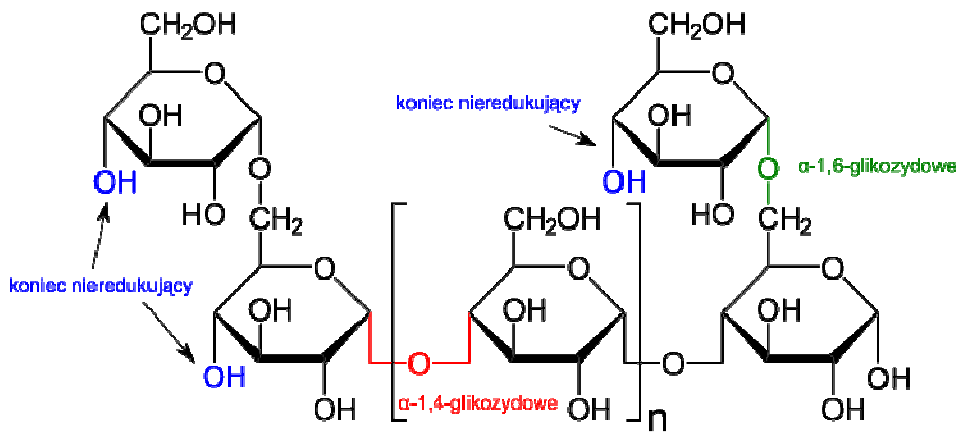


Rysunek 3. Formy glukozy. A - cykliczny anomer α , B - przejściowa forma liniowa, C - cykliczny anomer β .

Glukoza należy do aldoheksoz. W postaci wielocukrów stanowi główne źródło zmagazynowanej energii dla organizmu. Po hydrolizie, uwalniany cukier prosty transportowany przez krew do wszystkich komórek ciała jest wykorzystywany jako substrat do produkcji energii. Nadmiar glukozy jest odkładany w formie skrobi u roślin lub w postaci glikogenu w wątrobie i mięśniach u zwierząt. Wolna glukoza znajdująca się we krwi, po wprowadzeniu do komórki przy pomocy specyficznych białek transportujących (GLUT1-GLUT5), zostaje enzymatycznie przekształcona w glukozo-6-fosforan. Białka GLUT zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z ok. 500 reszt aminokwasowych. Charakteryzują się obecnością 12 segmentów transbłonowych o strukturze helikalnej. GLUT1 i GLUT3 transportują glukozę w sposób ciągły. GLUT2 reaguje na wysokie stężenie glukozy, transportując glukozę z wątroby do krwi. GLUT 4 zależny jest od insuliny, a GLUT5 preferencyjnie transportuje fruktozę [Wasserman et al., 2011; Czech i Corvera, 1999; Wood i Trayhum, 2003].

Glikogen jest rozgałęzionym polisacharydem zapasowym u zwierząt o masie cząsteczkowej przekraczającej 100 milionów Daltonów. Może zawierać kilka tysięcy reszt glukozy połączonych wiązaniami α -glikozydowymi. Rozgałęzienia łańcuchów w glikogenie tworzone są za pomocą wiązań α -1,6- glikozydowych. Pojedynczy łańcuch składa się z n ($n=7-11$) cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi

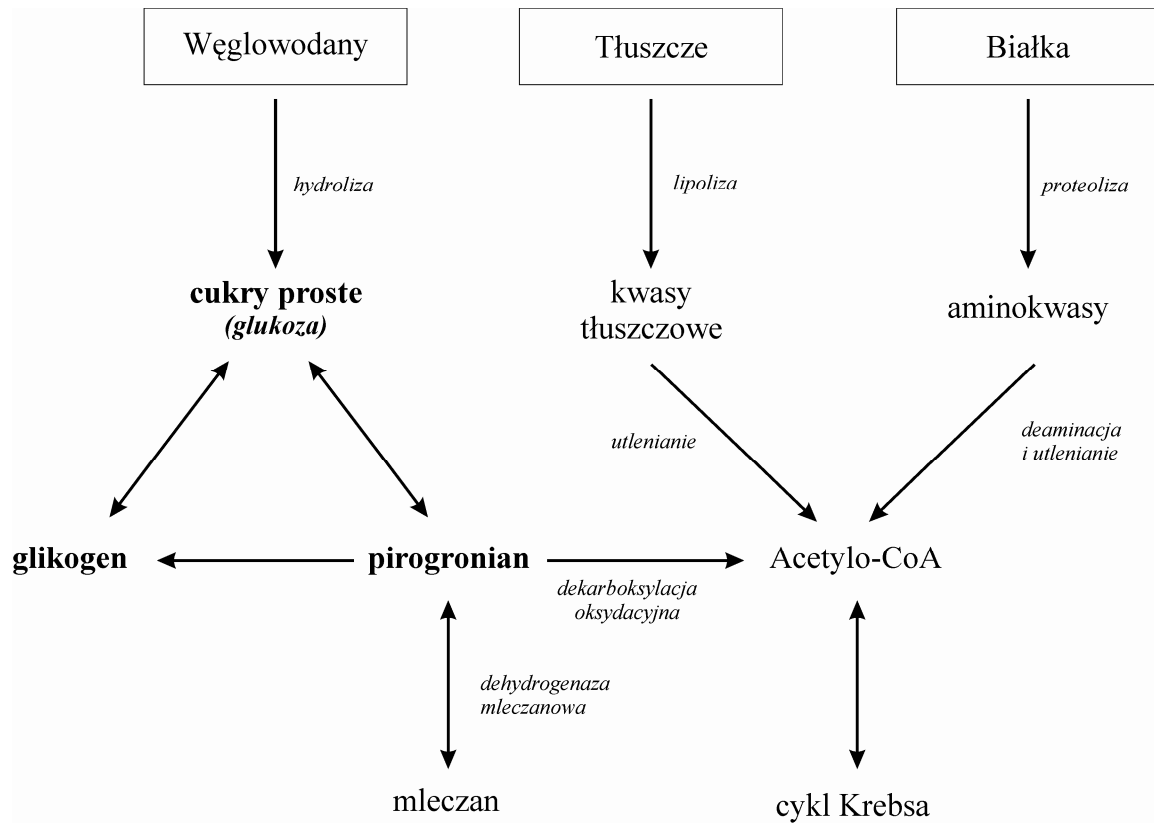
(Rysunek 4). Glikogen odkłada się głównie w mięśniach szkieletowych (ok. 1% ich masy) oraz w wątrobie (ok. 8% jej masy). W komórce przechowywany jest w postaci ziaren zawieszonych w cytozolu. W przypadku spadku poziomu glukozy we krwi, glikogen wątrobowy jest w pierwszej kolejności wykorzystywany przez organizm do utrzymania glukostazy. Z uwagi na brak w mięśniach szkieletowych glukozy-6-fosfatazy, enzymu niezbędnego do uwalniania glukozy z komórki, dostępność zgromadzonego w mięśniach glikogenu jest ograniczona.



Rysunek 4. Ogólny schemat budowy glikogenu z zaznaczonymi wiązaniami O-glikozydowymi.

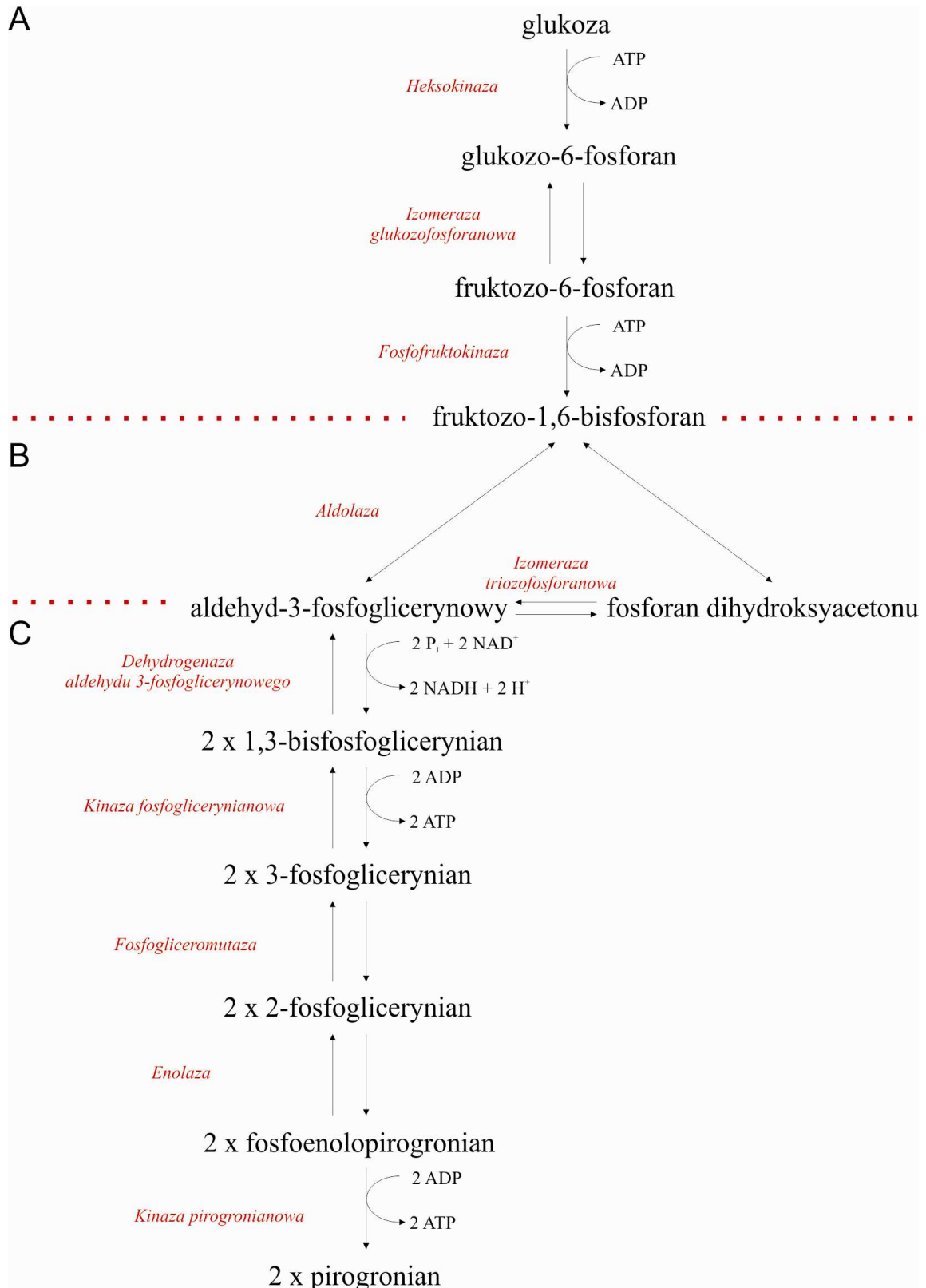
3.1.2. Glikoliza

Glikoliza jest ciągiem reakcji, których celem jest przekształcenie glukozy w pirogronian, wytworzenie niewielkich ilości ATP oraz dostarczenie elementów budulcowych do syntezy składników komórki. Poprzedza cykl kwasu cytrynowego (cykl Krebsa) i łańcucha transportującego elektrony, w trakcie których pozyskiwana jest większość energii (Rysunek 5). Substratami w procesie glikolizy są cukry proste, głównie glukoza [Guo et al., 2012].



Rysunek 5. Miejsce glukozy i jej przemian w metabolizmie komórkowym.

Glikoliza, nazywana również szlakiem Embdena-Meyerhofa-Parnasa, została poznana i opisana dla *Eucaryota* w latach trzydziestych XX wieku [Meyerhof, 1943, 1945]. Jest to ewolucyjnie stary szlak, rozpowszechniony wśród wszystkich organizmów. U eukariontów i wielu prokariotów przebiega w cytoplazmie, a u roślin dodatkowo w plastydach. U niektórych organizmów zachodzi w glikosomach [Guo et al., 2012; Michels et al., 2006]. U bakterii (*E. coli*, *Rhizobium*, *Acetobacter*), które nie posiadają niektórych enzymów, funkcjonuje szlak Entnera-Doudoroffa [Conway, 1992; Fliege et al., 1992], którego produktem końcowym jest pirogonian oraz po jednej cząsteczce ATP i NADH. Proces glikolizy obejmuje 10 reakcji zgrupowanych w trzy fazy (Rysunek 6) i przebiega w cytoplazmie, do której glukoza przenoszona jest z krwi przez białka transportujące.



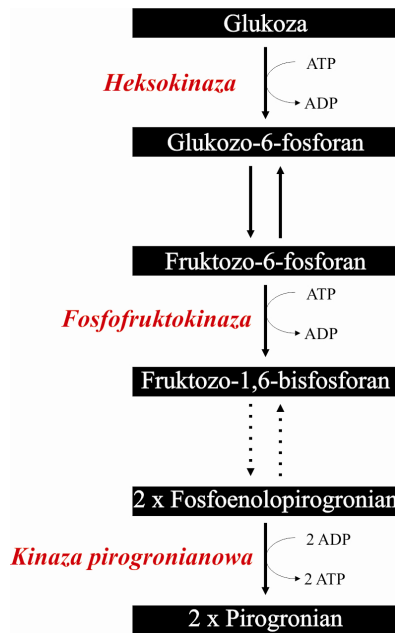
Rysunek 6. Schemat glikolizy. A – faza pierwsza, B – faza druga, C – faza trzecia. Rysunek pokazuje reakcje przemiany glukozy w pirogronian oraz enzymy, katalizujące każdą z reakcji.

Faza pierwsza (Rysunek 6A) obejmuje 3 reakcje. Przyłączenie fosforanu przy węglu C6 następuje w obecności ATP, heksokinazy lub glukokinazy w wątrobie i jonów Mg^{2+} . Utworzony glukozy-6-fosforan ulega izomeryzacji do fruktozy-6-fosforanu pod wpływem izomerazy glukozyfosforanowej [Mulichak et al., 1998]. Przy udziale fosfofruktokinazy następuje reakcja fosforylacji glukozy przy węglu C1 i powstaje fruktozy-1,6-bisfosforan oraz ADP. Podczas tych reakcji zużywane są dwie cząsteczki ATP na każdą cząsteczkę glukozy.

W drugiej fazie (Rysunek 6B) fruktozy-1,6-bisfosforan (heksoza) jest hydrolizowany przez aldolazę do fosforanu dihydroksyacetonu (DHAP) i aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAP). Następnie DHAP zostaje przekształcony przez izomerazę triozofosforanową (TIM) w GAP. Kolejne reakcje glikolizy przebiegają z udziałem dwóch cząsteczek trójwęglowych (trioz).

W trzeciej fazie glikolizy (Rysunek 6C) aldehyd-3-fosfoglicerynowy w obecności NAD^+ jest utleniany i fosforylowany do 1,3-bisfosfoglicerynianu, a następnie przekształcany do 3-fosfoglicerynianu tworząc również ATP. Jest to pierwsza reakcja syntezy ATP w procesie glikolizy. Pozyskana w tym etapie energia jest wykorzystywana do fosforylacji glukozy (fosforylacja substratowa). 3-fosfoglicerynian ulega przekształceniu w 2-fosfoglicerynian przez fosfogliceromutazę. Dehydratacja 2-fosfoglicerynianu przez enolazę prowadzi do utworzenia fosfoenolopirogronianu, który przy udziale kinazy pirogronianowej tworzy stabilny pirogronian oraz ATP. Ostatecznie w procesie glikolizy jedna cząsteczka glukozy zostaje przekształcona w dwie cząsteczki pirogronianu z wytworzeniem czterech cząsteczek ATP i dwóch cząsteczek NADH, podczas gdy do przeprowadzenia tego procesu zużyte zostają tylko dwie cząsteczki ATP. Z tego wynika, że sumaryczny bilans energetyczny glikolizy jest dodatni [Murray et al., 2015]

Przebieg glikolizy kontrolują trzy odrębne reakcje katalizowane nieodwracalnie przez trzy kinazy (Rysunek 7).



Rysunek 7. Uproszczony schemat procesu glikolizy, czerwonym kolorem zaznaczono enzymy katalizujące reakcje nieodwracalne.

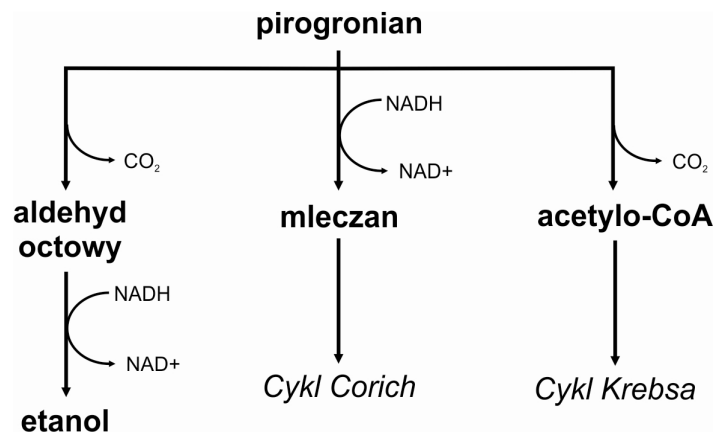
Heksokinaza [EC 2.7.1.1] katalizuje pierwszą reakcję glikolizy, fosforylację glukozy. Aktywność heksokinazy jest ograniczona przez glukozo-6-fosforan ulegający kumulacji przy nieaktywnej fosfofruktokinazie. Defekty działania tego enzymu prowadzą do cukrzycy [Gidh-Jain et al., 1993; Henquin et al., 2013]. Wysokie stężenie glukozo-6-fosforanu wskazuje, że zapotrzebowanie komórki na glukozę jest minimalne.

Fosfofruktokinaza [EC 2.7.1.11] fosforyluje fruktozo-6-fosforan do fruktozo-1,6-bisfosforanu [Mansour i Ahlfors, 1968]. Wysokie stężenie ATP zmniejsza powinowactwo enzymu do fruktozo-6-fosforanu, któremu przeciwdziała AMP. Aktywność enzymu zależy więc od stosunku ATP/AMP. Inhibitorem enzymu jest również cytrynian. Hamowanie fosfofruktokinazy przez ATP i cytrynian wyjaśnia, przynajmniej częściowo, zjawisko Pasteura czyli obniżenie wydajności glikolizy w warunkach tlenowych, w których następuje intensyfikacja cyklu kwasów trójkarboksylowych i oksydatywnej fosforylacji, w wyniku czego wzrasta stężenie cytrynianu i ATP. Obniżenie pH hamuje aktywność fosfofruktokinazy i zapobiega nadmiernej syntezie kwasu mlekowego. Natomiast fruktozo-2,6-bisfosforan silnie aktywuje enzym.

Kinaza pirogronianowa [EC 2.7.1.40] katalizuje ostatnią reakcję glikolizy. Pirogronian powstaje w wyniku przeniesienia grupy fosforanowej z fosfoenolopirogronianu na ADP. U ssaków występują cztery izoenzymy kinazy pirogronianowej (M1, M2, R, L) różniące się strukturą pierwszorzędową, właściwościami

kinetycznymi i ekspresją tkankowo-specyficzną [Tani et al., 1988; van Wijk et al., 2009]. Aktywność izoenzymów PK zależy od obecności jonów Mg^{2+} i K^+ [Larsen et al., 1997; Laughlin i Reed 1997]. Formy M2, R i L są enzymami regulowanymi allosterycznie. Efektorem zwiększającym ich aktywność jest fruktozo-1,6-bifosforan (F-1,6-BP). Ich aktywność zmniejsza się pod wpływem ATP i alaniny. Izoenzym M1 nie podlega regulacji allosterycznej. W wątrobie szczególne znaczenie ma izoenzym L, którego aktywność jest regulowana dwójako: w wyniku przyłączenia wspomnianych efektorów (F-1,6-BP, ATP i alanina), a także poprzez fosforylację w odpowiedzi na glukagon [Jurica et al., 1998; Ikeda i Noguchi, 1998]. Przy małym stężeniu glukozy, glukagon wyzwała kaskadę cAMP wywołując fosforylację izoenzymu L, przez co zmniejsza powinowactwo enzymu do PEP i F-1,6-BP. Ta modyfikacja zapobiega zużyciu glukozy przez wątrobę, gdy mózg lub mięśnie potrzebują cukru [Fenton i Alontaga, 2009; Ishibashi i Cottam, 1978].

Proces glikolizy zachodzi we wszystkich komórkach. Pirogronian katabolizowany jest poprzez utlenienie do acetylo-CoA, który dalej ulega utlenieniu w cyklu Krebsa (Rysunek 8). Przekształcenie do acetylo-CoA obserwuje się przy zapotrzebowaniu na ATP i związki dwuwęgłowe do syntezy lipidów.

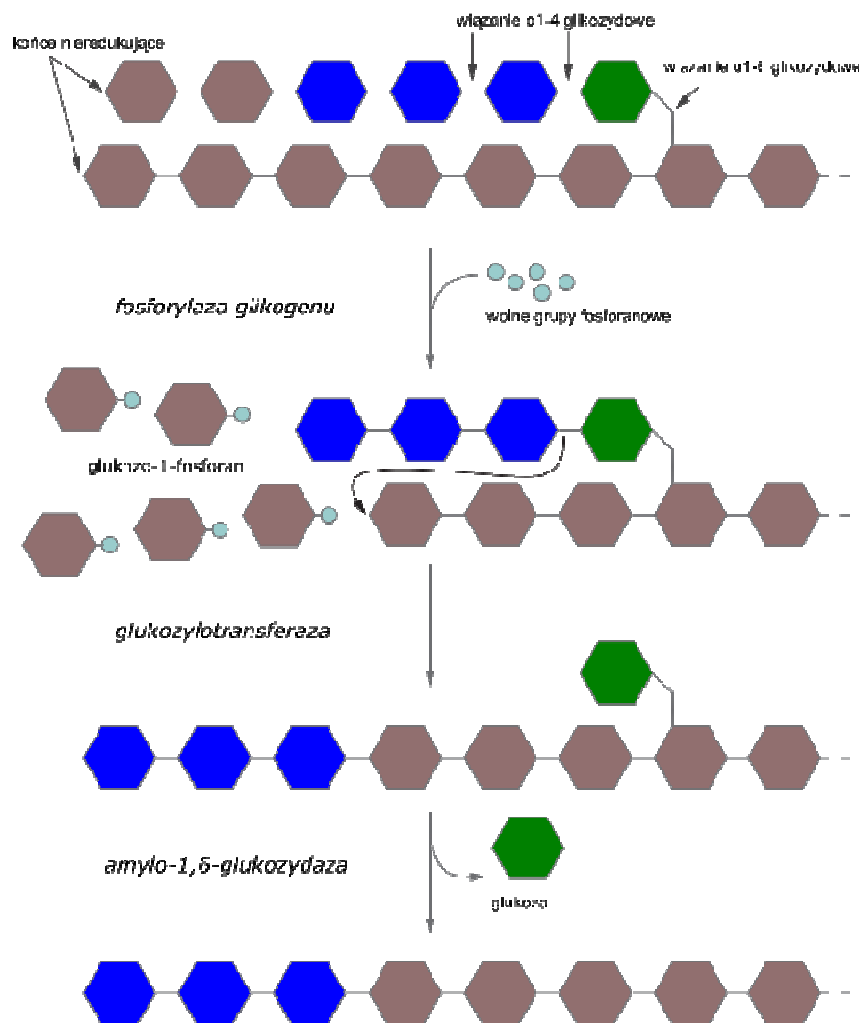


Rysunek 8. Metaboliczne przemiany pirogronianu.

Przy niedoborze tlenu pirogronian powstający w mięśniach jest redukowany do mleczanu lub etanolu. Tak więc w warunkach beztlenowych glikoliza stanowi dla komórek zwierzęcych jedyne źródło pozyskiwania ATP. Część mleczanu przechodzi do wątroby i tam jest wykorzystywana do syntezy glukozy, która poprzez krwioobieg wraca do mięśni. Proces ten został zaobserwowany w latach dwudziestych XX wieku i od nazwisk swoich odkrywców nosi nazwę „cyklu Corich” [Cori i Cori, 1929].

3.1.3. Glikogenoliza

Rozkład glikogenu jest jednym z kluczowych procesów komórkowych, ponieważ umożliwia utrzymywanie odpowiedniego poziomu glukozy we krwi. Glikogen zmagazynowany jest głównie w wątrobie i w mięśniach, a jego zawartość w innych narządach jest niewielka. Przy zwiększonym zapotrzebowaniu na glukozę (głód, intensywny wysiłek) glukagon, hormon wytwarzany przez trzustkę, aktywuje proces uwalniania glukozy w postaci ufosforylowanej [Jiang i Zhang, 2003]. Proces glikogenolizy przebiega w kilku etapach (Rysunek 9).



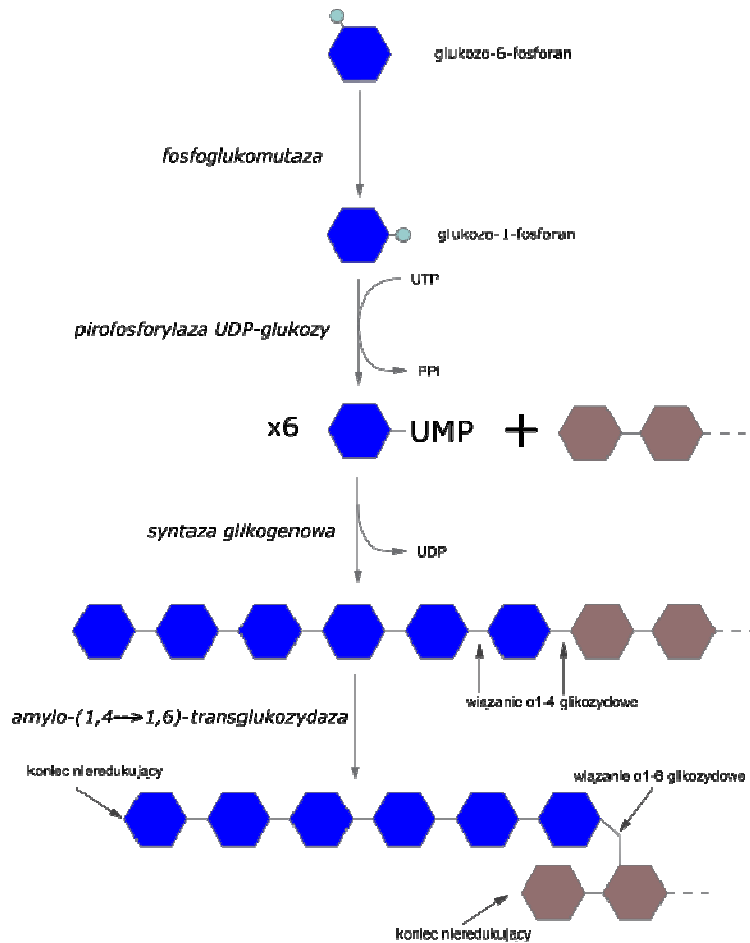
Rysunek 9. Schemat glikogenolizy. Sześciokąty oznaczają pojedyncze reszty glukozy.

Fosforylaza glikogenu (EC 2.4.1.1) hydrolizuje wiązanie α -1,4-glikozydowe, usuwając z końca z wolną grupą 4'-OH glikogenu pojedyncze cząsteczki glukozy w postaci glukozę-1-fosforanu. Fosforylaza jest regulowana przez efektory allosteryczne i odwracalne modyfikacje kowalencyjne. Aktywna forma enzymu powstaje w wyniku fosforylacji

pojedynczej reszty serynowej w każdej podjednostce [Johnson, 1992]. Enzym ten działa dopóki w danym odgałęzieniu glikogenu pozostaną tylko 4 reszty glukozy, tzw. dekstryna graniczna. Kolejne wiązania nie są podatne na działanie enzymu. Glukozylotransferaza (EC 2.4.1.25) przenosi trzy pozostałe cząsteczki glukozy (kolor niebieski na Rysunku 9) dekstryny granicznej na koniec innego łańcucha. Następnie amylo-1,6-glukozydaza (EC 3.2.1.33) hydrolizuje wiązanie α -1,6-glikozydowe z uwolnieniem glukozy (kolor zielony na Rysunku 9) i usunięciem rozgałęzienia glikogenu, przez co umożliwia wznowienie działania enzymu fosforylasy glikogenu. Fosfoglukomutaza (EC 2.7.5.1) przekształca glukozo-1-fosforan w glukozo-6-fosforan (G6P). Glukozo-6-fosfataza (EC 3.1.3.9) odłącza fosforan podczas przechodzenia G6P z hepatocytów do krwi. Enzym ten nie występuje w mięśniach, dlatego w miocytach G6P jest kierowany bezpośrednio do procesu glikolizy [Adeva-Andany et al., 2016].

3.1.4. Glikogenogeneza

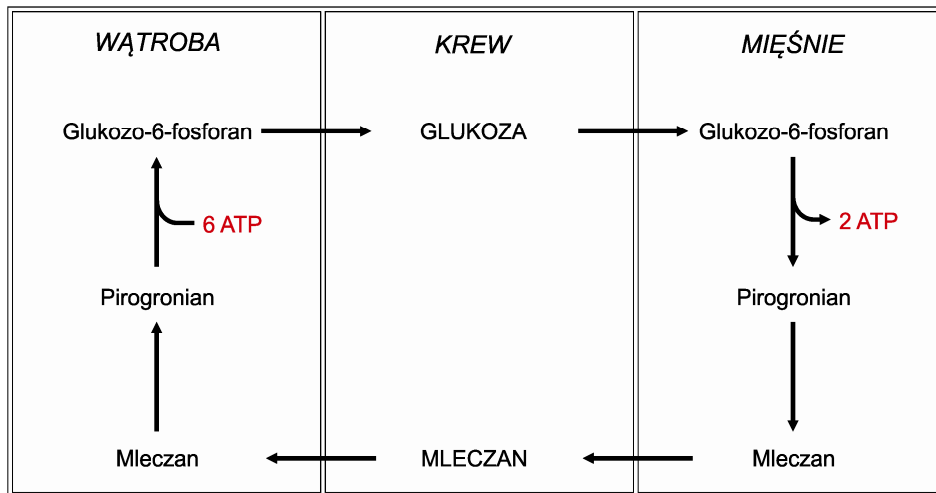
W stanie spoczynku spada zapotrzebowanie organizmu na energię i maleje zużycie glukozy. Aby zapobiec wzrostowi stężenia glukozy we krwi, insulina aktywuje proces syntezy glikogenu. Synteza glikogenu nie jest procesem odwrotnym do jego rozkładu, lecz jest odrębnym szlakiem. Proces ten przebiega w wątrobie i katalizowany jest przez kilka enzymów (Rysunek 10). W pierwszym etapie glukozo-6-fosforan jest przekształcany w glukozo-1-fosforan (G1P), który w obecności UTP i pirofosforylasy urydynodifosfoglukozy przechodzi w UDP-glukozę. Syntaza glikogenowa przenosi reszty glukozy z UDP-glukozy do rosnącego łańcucha glikogenu (kolor szary na Rysunku 10). Enzym ten jest aktywny tylko wtedy, gdy jest związany z glikogeniną, białkiem ograniczającym wielkość tworzonych ziaren glikogenu. Reszty glukozy z UDP-glukozą dołączone są do grupy $-OH$ przy atomie węgla w pozycji 4 przy końcu nieredukującym cząsteczki glukozy, tworząc wiązanie α -1,4-glikozydowe. Rozgałęzienie glikogenu powstaje z udziałem enzymu amylo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglukozydazy (EC 2.4.1.18). Odcina on 5-8 reszt glukozy z końca nieredukującego i przenosi je do środka łańcucha tworząc wiązanie α -1,6-glikozydowe. Rozgałęzienia są dalej rozbudowywane przez syntazę glikogenową (EC 2.4.1.11). Rozgałęziona struktura umożliwia szybkie uwalnianie reszt cukrowych [Buschiazzo et al., 2004; Adeva-Andany et al., 2016].



Rysunek 10. Schemat procesu glikogenogenezy. Sześciokąty oznaczają pojedyncze reszty glukozy.

3.1.5. Glukoneogeneza

Glukoneogeneza przebiega głównie w wątrobie i nerkach oraz w niewielkim stopniu w mózgu. Stanowi ona część szlaku zwanego cyklem Corich opisanego w 1929 (Rysunek 11) [Cori i Cori, 1929]. Główne zadanie tego procesu to utrzymanie prawidłowego poziomu glukozy i umożliwienie wykorzystania jej przez mózg i erytrocyty w okresie między posiłkami. Prekursorami glukozy w tym przypadku są aminokwasy z mięśni, mleczan wytwarzany przez erytrocyty lub mięśnie oraz glicerol powstający na skutek rozpadu lipidów w tkance tłuszczowej [Exton i Park, 1967; Gerich et al., 2001].

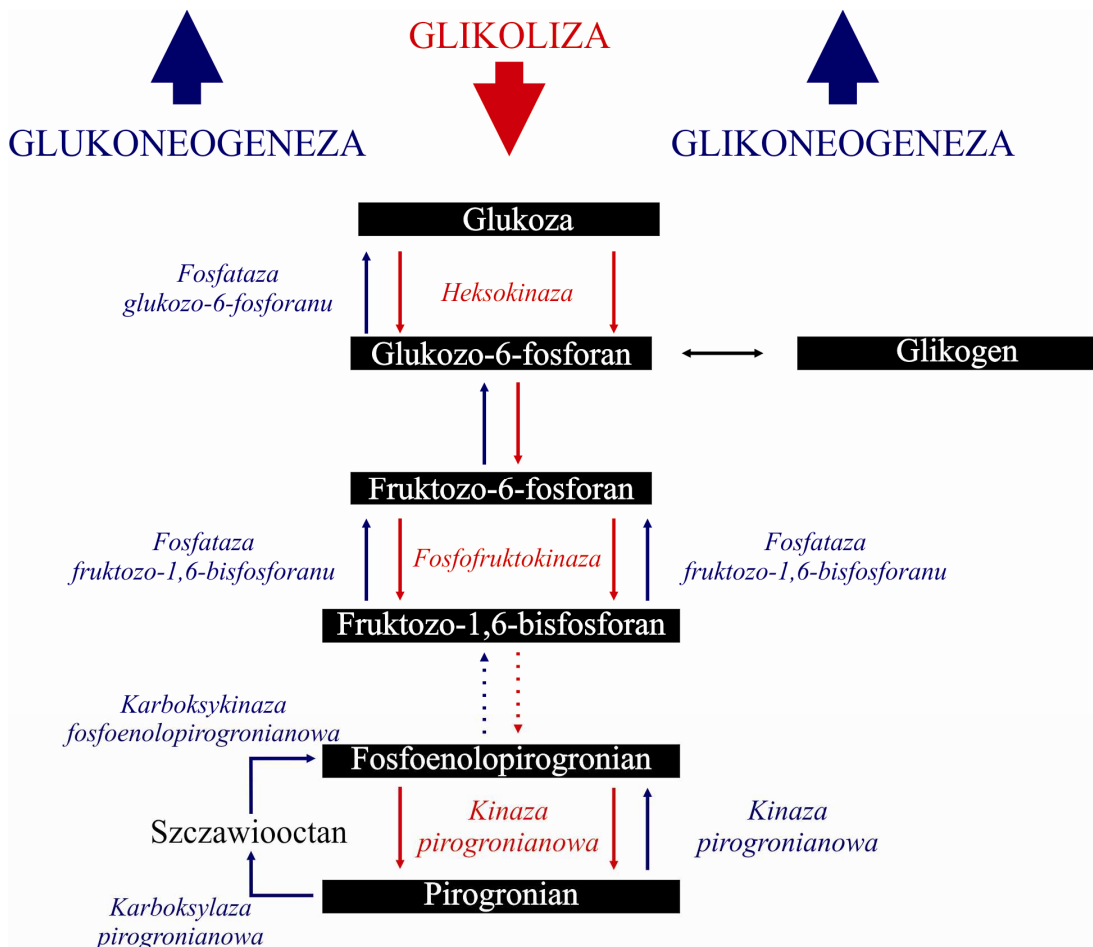


Rysunek 11. Schemat „cyklu Corich” – przemiana mleczanu w glukozę.

Niektóre reakcje glukoneogenezy katalizowane są przez enzymy aktywne również w procesie glikolizy (Rysunek 12). Podczas gdy glikoliza przebiega wyłącznie w cytoplazmie, glukoneogeneza zachodzi również w mitochondriach i retikulum endoplazmatycznym. Mleczan będący substratem w procesie glukoneogenezy, pochodzący z mięśni i z erytrocytów, zostaje utleniony do pirogronianu przez dehydrogenazę mleczanową (LDH, EC 1.1.1.27). Początkowy etap glukoneogenezy zachodzi w mitochondriach. Przyczyną tej „okrężnej” drogi jest stan równowagi reakcji katalizowanej przez kinazę pirogronianową. Nawet rozpad ATP nie wystarcza do bezpośredniego przeprowadzenia pirogronianu w fosfoenolpirogronian (PEP). Wytworzony pirogronian jest transportowany do macierzy mitochondrialnej, gdzie karboksylaza pirogronianowa (PC, EC 6.4.1.1) w obecności ATP przyłącza dwutlenek węgla, tworząc szczawiooctan. Przed opuszczeniem mitochondriów szczawiooctan jest redukowany do jabłczanu przez dehydrogenazę jabłczanową (EC 1.1.1.37). W cytoplazmie zostaje powtórnie utleniony do szczawiooctanu. W drugim etapie karboksykinaza fosfoenolpirogronianowa (EC 4.1.1.32) w obecności GTP przekształca szczawiooctan w fosfoenolpirogronian. Kolejne etapy glukoneogenezy aż do powstania fruktozo-1,6-bisfosforanu stanowią odwrócenie odpowiednich reakcji glikolizy, w trakcie których do wytwarzania 1,3-bisfosfoglicerynianu zużyta zostaje kolejna cząsteczka ATP. Fruktozo-1,6-bisfosfataza hydrolizuje reszty fosforanowe od fruktozo-1,6-bisfosforanu, a izomeraza przekształca fruktozo-6-fosforan do glukozo-6-fosforanu.

Reakcja katalizowana przez fruktozo-1,6-bisfosfatazę (EC 3.1.3.11) jest istotnym punktem regulacyjnym w procesie glukoneogenezy. Ostatnią reakcją tego szlaku katalizuje glukozo-

6-fosfataza (EC 3.1.3.9), która występuje w hepatocytach we wnętrzu gładkiego retikulum endoplazmatycznego. Hydrolizuje ona glukozy-6-fosforan do glukozy.



Rysunek 12. Schemat przebiegu glikolizy, glukoneogenezy w wątrobie oraz glikoneogenezy w mięśniach. Przerwana linia oznacza sześć reakcji wspólnych dla trzech szlaków.

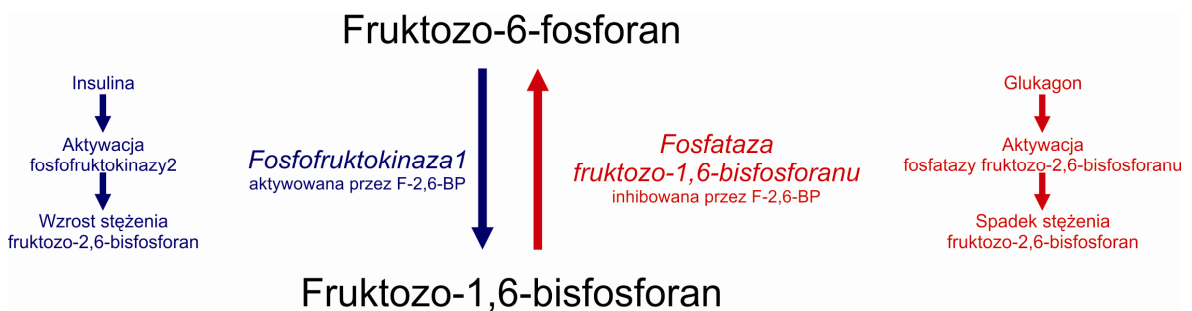
3.1.6. Glikoneogeneza

Przez wiele lat uważano, że cykl Corich jest jedyną drogą przekształcania niecukrowych prekursorów w glukozę [Cori i Cori, 1929]. Wynikało to z faktu, że w miocytach nie występuje glukozy-6-fosfataza odpowiedzialna za uwalnianie glukozy z mięśni do krwi. W latach 90. XX wieku pokazano, że ponad połowa mleczanu powstającego w mięśniach jest przekształcana w glikogen właśnie w miocytach [Ryan i Radziuk, 1995; Gleeson, 1996; Fournier et al., 2002; Dżugaj, 2006], a także, że kinaza pirogronianowa może katalizować odwracalną reakcję [Dobson et al., 2002]. Można na tej podstawie wysnuć wniosek, że glikoneogeneza jest procesem syntezy

glikogenu w mięśniach (Rysunek 12). Bierze w nim udział osiem enzymów glikolitycznych, a kluczowym enzymem regulującym cały proces jest fruktozo-1,6-bisfosfataza katalizująca reakcję odwrotną do reakcji prowadzonej przez fosfofruktokinazę (Rysunek 13).

3.1.7. Regulacja glukostazy

Utrzymanie glukostazy jest możliwe dzięki zachowaniu odpowiedniego stanu równowagi pomiędzy syntezą pirogronianu a glukozy. Punktem krytycznym, istotnym dla zapewnienia równowagi są reakcje przekształcania fruktozo-6-fosforanu w fruktozo-1,6-bisfosforan oraz hydroliza bisfosforanu do monofosforanu. Reakcje te katalizowane są nieodwracalnie przez dwa różne enzymy. Fosfofruktokinaza fosforyluje fruktozo-6-fosforan natomiast FBPaza hydrolizuje fruktozo-1,6-bisfosforan (Rysunek 13). Enzymy te podlegają ścisłej kontroli zarówno w wątrobie, jak i w mięśniach. Ich wspólnymi efektorami są fruktozo-2,6-bisfosforan (F-2,6-BP) i adenosynomonofosforan. F-2,6-BP jest wytwarzany przez dwufunkcyjny enzym fosfofruktokinazę 2 (EC 2.7.1.105)/fruktozo-2,6-bisfosfatazę (EC 3.1.3.46) [Wu et al., 2006; Yalcin et al., 2009], którego aktywność jest pod kontrolą dwóch antagonistycznych hormonów - insuliny i glukagonu.



Rysunek 13. Schemat obrazujący równowagę pomiędzy glikolizą a glukoneogenezą/glikoneogenezą.

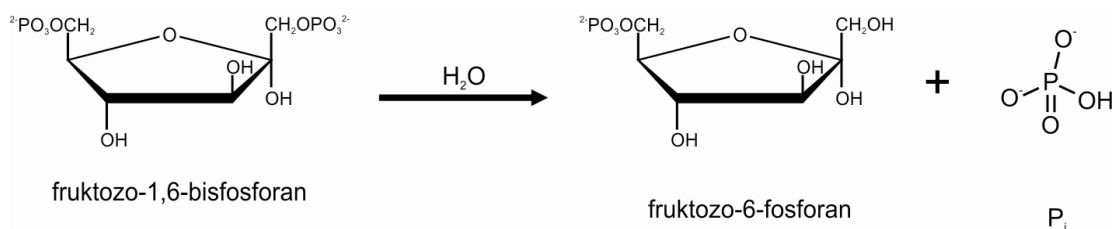
U ssaków zidentyfikowano 4 izoenzymy PFKFB (1-4) kodowane przez odrębne geny. Ich cechą charakterystyczną jest różny stosunek aktywności kinazowej do fosfatazowej [Bando et al., 2005].

Gdy poziom glukozy we krwi spada, komórki α trzustki wytwarzają glukagon, który aktywuje fosfatazę F-2,6-BP. Hydrolizuje ona fruktozo-2,6-bisfosforan, następuje odblokowanie FBPazy i zachodzi synteza glukozy z mleczanu. Gdy poziom glukozy

we krwi wzrasta, komórki β trzustki syntetyzują insulinę, która aktywuje PFK2, co prowadzi do wzrostu stężenia fruktozo-2,6-bisfosforanu i w konsekwencji znosi hamowanie aktywności PFK przez ATP oraz zwiększa powinowactwo enzymu do fruktozo-6-fosforanu [Bando et al., 2005]. Równocześnie z aktywacją PFK następuje inhibicja kompetycyjna FBPazy. Wysokie stężenie F-2,6-BP jest niewystarczające do całkowitego zablokowania aktywności FBPazy, natomiast jego obecność stymuluje inhibicję allosteryczną powodowaną przez AMP [Pilkis et al., 1988]. Oba inhibitory FBPazy, F-2,6-BP i AMP, są jednocześnie aktywatorami fosfofruktokinazy.

3.2. FOSFATAZA FRUKTOZO-1,6-BISFOSFORANU

Fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu (FBPaza; EC 3.1.3.11) katalizuje reakcję hydrolizy fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu (Rysunek 14), dzięki czemu bierze udział w regulacji metabolizmu energetycznego i glukostazy [Tejwani, 1983]. Reakcja odwrotna przebiega w obecności ATP i jest katalizowana przez fosfofruktokinazę [Brown et al., 2009]. Względny stosunek tych dwóch reakcji decyduje czy metabolizm węglowodanowy będzie glikolizą czy glukoneogenezą [Underwood i Newsholm, 1965].



Rysunek 14. Reakcja katalizowana przez fosfatazę fruktozo-1,6-bisfosforanu.

Pierwsze doniesienie o tym enzymie, nazywanym początkowo heksozobisfosfatazą, ukazało się w 1943 roku [Gomori, 1943]. Dopiero później enzym przyjął nazwę fruktozo-1,6-bisfosfataza [Mokrasch i McGlivery, 1956]. Obecnie, po ponad 70 latach badań, zainteresowanie tym enzymem nie dotyczy już tylko struktury i aktywności, ale także jego funkcji i wpływu na rozwój różnych chorób, między innymi cukrzycy czy VHL (choroba von Hippel-Lindau) [Hao et al., 2012; Lamont et al., 2006; Granchi et al., 2014; Wu i Zhao, 2013].

Fruktozo-1,6-bisfosfataza występuje niemal we wszystkich organizmach, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych [Tashima i Mizunuma, 1982; Noda et al., 1984; Kelly et al., 1982; Babul i Guixe, 1983; Dżugaj i Kochman, 1980].

FBPazy do swojej aktywności katalitycznej wymagają jonów metali dwuwartościowych (Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺). Dodatkowo enzymy aktywowane są przez jony K⁺, a inhibowane przez jony Li⁺ [Brown et al., 2009; Donahue et al., 2000]. Aktywność FBPazy jest hamowana kompetycyjnie przez fruktozo-2,6-bisfosforan, allosterycznie przez AMP i dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy oraz przez jony Ca²⁺ [Babu i Guixe, 1983; Marcus et al., 1984; Gizak et al., 2004]. W *Saccharomyces cerevisiae* występuje FBPaza (YK23), której aktywność zależy tylko od jonów Zn²⁺, Cd²⁺ i Cu²⁺ (0,15 mM). Nie jest ona czuła

na jony Li^+ aż do stężenia 100mM [Kuznetsova et al., 2010]. Przypuszcza się, że może to być enzym nowej klasy.

Na podstawie struktury pierwszorzędowej (sekwencji aminokwasowej) fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu organizmów prokariotycznych wyodrębniono pięć klas tego enzymu [Donahue et al., 2000; Nishimasu et al., 2004]. Najbardziej rozpowszechniona klasa I jest jedyną formą w komórkach eukariotycznych i podstawową formą u wielu bakterii. Klasy II i III występują w bakteriach, klasa IV u archeontów, natomiast klasa V jest domeną bakterii termofilnych [Brown et al., 2009; Hines et al., 2006]. FBPazy klas I, II III i monofosfataza inozytolu mają w strukturze drugorzędowej motyw $\alpha\beta\alpha\beta$, co wskazuje na ich ewolucyjną bliskość [Zang et al., 1994; Brown et al., 2009].

3.2.1. Enzymy prokariotyczne

U większości organizmów prokariotycznych występuje więcej niż jedna izoforma FBPazy, głównie są to kombinacje klasy I i II lub II i III [Donahue et al., 2000].

U *Escherichia coli* znaleziono trzy enzymy o aktywności FBPazy. Enzym klasy I kodowany przez gen *fbp* (Ec-fbp) [Donahue et al., 2000] oraz dwa enzymy klasy II kodowane przez gen *glpX* (Ec-glpX) i gen *yggF* (Ec-YggF) [Brown et al., 2009]. Aktywność enzymów GlpX i YggF jest silnie inhibowana przez nieorganiczny fosforan, a struktura trzeciorzędowa kompleksu GlpX z fosforanem potwierdziła, że nieorganiczna cząsteczka fosforanu wiąże się z centrum aktywnym enzymu, co wyjaśnia hamowanie jego aktywności. ADP, AMP i PEP każdy przy stężeniu 1 mM nie mają znaczącego wpływu na aktywność obu enzymów [Brown et al., 2009]. Białka te są homodimerami podjednostek o masie 36 kDa i 34,3 kDa (YggF). Oba wykazują optimum działania przy pH 7,5-8,0 i do swojej aktywności wymagają jonów Mn^{2+} . Enzym GlpX jest bardziej aktywny i ma większe powinowactwo do F-1,6-BP w porównaniu do enzymu YggF. Oba typy FBPazy nie wykazują podobieństwa strukturalnego, a ponadto nie jest znana fizjologiczna rola enzymu YggF [Donahue et al., 2000].

U bakterii *Corynebacterium glutamicum*, która odgrywa istotną rolę w produkcji przemysłowej aminokwasów [Rittmann et al., 2003; Kalinowski et al., 2003], występuje FBPaza klasy II, która jest homotetramerem o podjednostce 35,5 kDa. Wykazuje ona 44% podobieństwa sekwencji aminokwasowej z enzymem GlpX z *E. coli* [Rittmann et al., 2003]. Optymalne działanie enzymu następuje w pH 7,7 w obecność jonów manganu

(Mn²⁺). Aktywność tej FBPazy jest całkowicie inhibowana przez 90 μM AMP, a połowicznie przez 360 μM PEP, 140 μM LiCl, 1,6 mM fosforanu lub 1,2 mM fruktozo-1-fosforanu. Gen został nazwany *fbp*, pomimo że enzym należy do klasy II [Rittmann et al., 2003]. FBPaza klasy II z *Corynebacterium glutamicum* zachowuje się podobnie jak FBPaza zwierzęca w aspekcie hamowania przez AMP [Hines et al., 2006; Rittmann et al., 2003]. Nadekspresja FBPazy w komórkach *Corynebacterium glutamicum* prowadzi do zwiększenia wydajności (ok. 40%) produkcji L-lizyny (dominujący aminokwas w przemyśle paszowym). Niedobór lizyny powoduje zahamowanie wzrostu, zanik mięśni, zakłócenie biosyntezy białka oraz odwapnienie kości. Zatem wykorzystanie nadekspresji fruktozo-1,6-bisfosfatazy do zwiększenia efektywności biosyntezy wydaje się być korzystne [Becker et al., 2005].

U *Mycobacterium tuberculosis* występuje tylko jedna FBPaza klasy II kodowana przez gen *Rv1099c*. Enzym posiada 43% identyczności sekwencji aminokwasowej z GlpX *E. coli* [Gutka et al., 2011]. Optimum pH jest przy 7,3 i do aktywności potrzebny jest Mg²⁺. Nie zaobserwowano inhibicji po dodaniu AMP, cytrynianu, PEP lub ADP do stężenia 1 mM z wyjątkiem Li⁺, który inhibował 50% aktywności przy 0,2 mM i 90% przy 2,5 mM wskazując, że enzym ten należy do grupy fosfataz zależnych od litu [Movahedzadeh et al., 2004; Gutka et al., 2011].

Białko GlpX w *Bacillus subtilis* jest kodowane przez gen *ywjI*. Enzym wykazuje 54% identyczności sekwencji aminokwasowej z GlpX z *C. glutamicum* i do aktywności potrzebne są jony manganu [Jules et al., 2009]. Aktywność GlpX jest całkowicie inhibowana przez dodanie 1 mM PEP. Bakterie *Bacillus subtilis* posiadają drugi enzym klasy III kodowany przez gen *yjdE*. Jego ekspresja zależy od etapu rozwoju organizmu [Fujita et al., 1998].

Fosfatazę fruktozo-1,6-bisfosforanu klasy IV znaleziono u beztlenowej archeobakterii *Methanocaldococcus jannaschii*, która wytwarza metan jako produkt uboczny [Bult et al., 1996]. W organizmie tym nie ma jednak genu strukturalnego odpowiadającego FBPazie. Istnieje natomiast białko MJ0109, które posiada dwie aktywności: może funkcjonować jako monofosfataza inozytolu (IMPaza) oraz jako fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu [Stec et al., 2000].

Organizmy termofilne posiadają FBPazę należącą do klasy V. U termofilnego archeonta *Thermococcus kodakarensis* KOD1 znaleziono gen dla FBPazy (*Tk-fbp*), który nie wykazuje podobieństwa do genów klasy I i II. Produkt ekspresji tego genu składa się

z 375 reszt aminokwasowych o masie 41,7 kDa i katalizuje reakcję hydrolizy fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu. Aktywność jego zależy od jonów Mg^{2+} i DTT, a inhibowana jest przez fruktozo-2,6-bisfosforan. AMP nie inhibuje tego enzymu [Rashid et al., 2002].

3.2.2. Enzymy eukariotyczne

3.2.2.1. FBPazy roślinne

U roślin wyższych znaleziono trzy fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu [Cséke i Buchanan, 1986]. Enzym cytozolowy (cyFBPaza), który w eukariotycznych i prokariotycznych komórkach jest zaangażowany w syntezę sacharozy i w glukoneogenezę [Zimmermann et al., 1978; Cséke i Buchanan, 1986; Daie, 1993] oraz dwie izoformy chloroplastowe cFBPaza1 i cFBPaza2 [Serrato et al., 2009]. Chloroplastowa cFBPaza1 (EC 3.1.3.11) jest kluczowym enzymem w szlaku Calvina-Bensona, zaangażowanym w regenerację 1,5-bisfosforanu rybulozy (RuBP) oraz tworzenie prekursorów do chloroplastowej syntezy skrobi [Baier i Latzko, 1975].

Kinetyczne i allosteryczne właściwości roślinnej cyFBPazy są podobne do FBPazy ssaków i drożdży. Jest ona inhibowana przez nadmiar substratu, allosterycznie przez AMP oraz kompetycyjnie przez fruktozo-2,6-bisfosforan. cyFBPaza i syntaza fosforanowa sacharozy (EC 2.4.1.14) są głównym miejscem kontroli syntezy sacharozy [Rojas-González et al., 2015]. Roślinne cytozolowe FBPazy mają ok. 90% podobieństwa struktury pierwszorzędowej, wśród chloroplastowych homologia ta wynosi 79-83%. Izoenzymy roślinne znacznie różnią się jednak między sobą. Podobieństwo między nimi jest mniejsze niż 48%. Nieco większe jest pomiędzy FBPazą ssaków a cytozoolową i wynosi 56% [Daie, 1993]. cyFBPaza i cFBPaza1 są homotetramerami (160 kDa), masa cząsteczkowa podjednostki składającej się z ok. 340-360 reszt aminokwasowych wynosi ok. 40 kDa [Ke et al., 1989; Chiadmi et al., 1999]. Koniec N każdej podjednostki (ok 150-200 reszt aminokwasowych) zbudowany jest z 5 α -helis i 8 arkuszy β i w enzymie cytozoolowym posiada miejsce wiązania AMP. Koniec C (130-200 reszt aminokwasowych) składa się z 4 α -helis i 5 arkuszy β oraz posiada miejsce aktywne enzymu. Obie części połączone są pojedynczym polipeptydem, który odpowiada za przyłączanie jonów Mg^{2+} [Ke et al., 1989; Chiadmi et al., 1999; Villeret et al., 1995]. Tetramer FBPazy roślinnej nie wykazuje podczas aktywacji bądź hamowania zmian strukturalnych podobnych do tych odnotowanych dla enzymów kręgowców [Chiadmi et al., 1999]. cFBPaza1 różni się od cyFBP dodatkową sekwencją 20-30 reszt aminokwasowych w domenie regulatorowej

(„pętla 170”), która zawiera 3 cysteiny (pozycja 153, 173 i 178 dla grochu). Dwie z nich mogą tworzyć mostek dwusiarczkowy, który jest przyczyną zmian w strukturze trzeciorzędowej enzymu spowodowanej redukcją układu za pomocą tioredoksyny f (TRX f)/ferredoksyny podczas działania światła [Chiadmi et al., 1999; Daie, 1993]. To zjawisko nie zachodzi dla cytozolowej FBPazy. Izoforma cFBP2 nie posiada „pętli 170” w swojej sekwencji. Jej aktywność względem substratu jest 6,6 razy mniejsza niż cFBP1 [Serrato et al., 2009]

FBPaza z *Ginkgo biloba* L. [Yonzone et al., 2015] jest podobna do pozostałych, jednak jej stabilność w przeciwieństwie do cytozolowej FBPazy ze szpinaku (2 miesiące w 50% glicerolu przy -20°C) [Herzog et al., 1984] czy *Anacystis nidulans* (kilka tygodni w -20°C) [Udvardy et al., 1982] wynosi tylko 2-3 dni [Yonzone et al., 2015]. Kationy jednowartościowe K^+ i Na^+ nie mają istotnego wpływu na aktywność, natomiast Li^+ inhibuje, a NH_4^+ silnie stymuluje enzym. Dwuwartościowe kationy Mg^{2+} i Mn^{2+} wyraźnie stymulują, podczas gdy Cu^{2+} i Zn^{2+} hamują funkcję enzymu. Jony cynku inhibują FBPazę z *Mangifera indica*, a jony Li^+ z *Purococcus furiosus* [Verhees et al., 2002]. Silna inhibicja przez metale ciężkie sugeruje, że w miejscu aktywnym znajdują się grupy sulfhydrylowe [Chhetri et al., 2006]. Hamujące działanie EDTA jest charakterystyczne nie tylko dla FBPazy z *Ginkgo biloba*, ale także dla enzymu z *Acer pseudoplatanus* [Scala i Semarsky, 1971]. W przypadku FBPazy z *Ginkgo biloba* L. optimum aktywności przypada przy pH 8,0 podobnie jak dla enzymów bakterii i roślin niższych (pH 8,0-8,5 dla *Bacillus licheniformis*, czy pH 8 dla *Bacillus subtilis* i *Saccharomyces cerevisiae*) [Opheim i Bernlohr, 1975; Fujita i Freese, 1979]. Cytozolowa FBPaza z roślin wyższych wykazuje optimum aktywności w pH obojętnym w przeciwieństwie do zasadowego dla FBPazy z *Ginkgo biloba* L. Różnice te sugerują, że enzym ten może być uważany za ewolucyjne powiązanie między organizmami nagonasiennymi i okrytonasiennymi [Botha i Turpin, 1990].

3.2.2.2. Wątrobowy i mięśniowy izoenzym FBPazy

U ssaków występują dwa różne geny kodujące dwa izoenzymy FBPazy [Tillmann et al., 2000]. Gen *fbp1* ulega ekspresji głównie w hepatocytach, nerkach i monocytach. FBPaza1 będąca produktem ekspresji tego genu, zwana enzymem wątrobowym, działa jako regulator syntezy glukozy z niecukrowych substratów w procesie glukoneogenezy [Solomon et al., 1988; El-Maghrabi et al., 1995]. Gen *fbp2* ulega ekspresji w mięśniach, a jego produktem jest enzym mięśniowy czyli FBPaza2 [Al-Robaiy i Eschrich, 1999]. Oba enzymy różnią się kinetyką i właściwościami immunologicznymi [Skalecki et al., 1995; Mizunuma i Tashima, 1986], jak również składem aminokwasowym [van Tonder et al., 1985; Stein et al., 2001]. Obie FBPazy odznaczają się wysokim powinowactwem do fruktozo-1,6-bisfosforanu, który jest substratem reakcji. Aktywność enzymów jest hamowana allosterycznie przez AMP i NAD^+ oraz kompetycyjnie przez fruktozo-2,6-bisfosforan, którego stężenie jest regulowane hormonalnie [Van Schaftingen i Hers, 1981; Pilkis et al., 1981]. Co ciekawe, hamowanie aktywności FBPazy przez AMP i F-2,6-BP odbywa się synergicznie [Bartrons et al., 1983; Pilkis et al., 1995; Van Schaftinge i Hers, 1981; Liu i Fromm, 1988]. Efekt ten występuje w obu przypadkach. Dla enzymu mięśniowego stała inhibicji (K_i) dla F-2,6-BP bez udziału AMP wynosi 90 nM a przy udziale AMP 40 nM [Skalecki et al., 1999].

Najistotniejsza różnica w aktywności obu enzymów polega na ich wrażliwości na hamowanie allosteryczne przez AMP. $I_{0,5}$ dla enzymu mięśniowego przyjmuje wartości pomiędzy 0,05-1 μM , podczas gdy dla enzymu wątrobowego wartości te są w przedziale 10-15 μM [Tejwani, 1983; Skalecki et al., 1995, 1999; Gizak et al., 2004, 2008; Rakus et al., 2003; Dzugaj, 2006]. Biorąc pod uwagę, że normalne stężenie AMP w krwi jest w przedziale 10-20 μM [Dzeja i Terzic, 2009], to w warunkach fizjologicznych FBPaza mięśniowa powinna być całkowicie nieaktywna. Ostatnie badania pokazały jednak, że ponad 50% mleczanu pozostaje w mięśniach i jest tam przekształcane w glikogen [Gleeson, 1996]. Dodatkowo udowodniono, że w mięśniach reakcja katalizowana przez kinazę pirogronianową może przebiegać w obu kierunkach [Dobson, 2002]. Na podstawie tych badań można stwierdzić, że pomimo wysokiej wrażliwości na hamowanie przez AMP, FBPaza w mięśniach może funkcjonować w warunkach fizjologicznych.

Również jony wapnia wykazują zdolność do blokowania aktywności fbpazowej ssaków, ale dokładny mechanizm tej inhibicji nie jest do końca poznany. Wiadomo jedynie, że enzym mięśniowy jest prawie 1000 razy bardziej wrażliwy na hamowanie przez jony Ca^{2+} niż enzym wątrobowy [Gizak et al., 2004]. Inhibicja enzymu mięśniowego przez jony wapnia jest ściśle związana z ruchem pętli katalitycznej, a szczególnie z resztą kwasu glutaminowego (E69 u człowieka) zlokalizowanego przy końcu C pętli [Zarzycki et al., 2007]

Wykazano, że fizjologiczna rola mięśniowej FBPazy wykracza poza jej funkcje enzymatyczne. Enzym ten znaleziono w jądrze komórkowym [Gizak et al., 2009] oraz w mitochondriach [Gizak et al., 2012; Mamczur et al., 2012; Piróg et al., 2014]. W sekwencji genów wszystkich znanych zwierzęcych FBPaz znajduje się sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. Nuclear Localization Signal). Prawdopodobnie posiadają one również sygnał eksportu z jądra NES (ang. Nuclear Export Signal), ale nie zostało to jeszcze potwierdzone. Wszystko wskazuje na to, że FBPaza mięśniowa należy do grupy enzymów wielofunkcyjnych (moonlighting proteins) [Jeffery et al., 1999], których funkcja nie zależy jedynie od aktywności katalitycznej lecz także od zdolności do interakcji z różnymi białkami jądrowymi i mitochondrialnymi [Mamczur et al., 2012; Gizak et al., 2012]

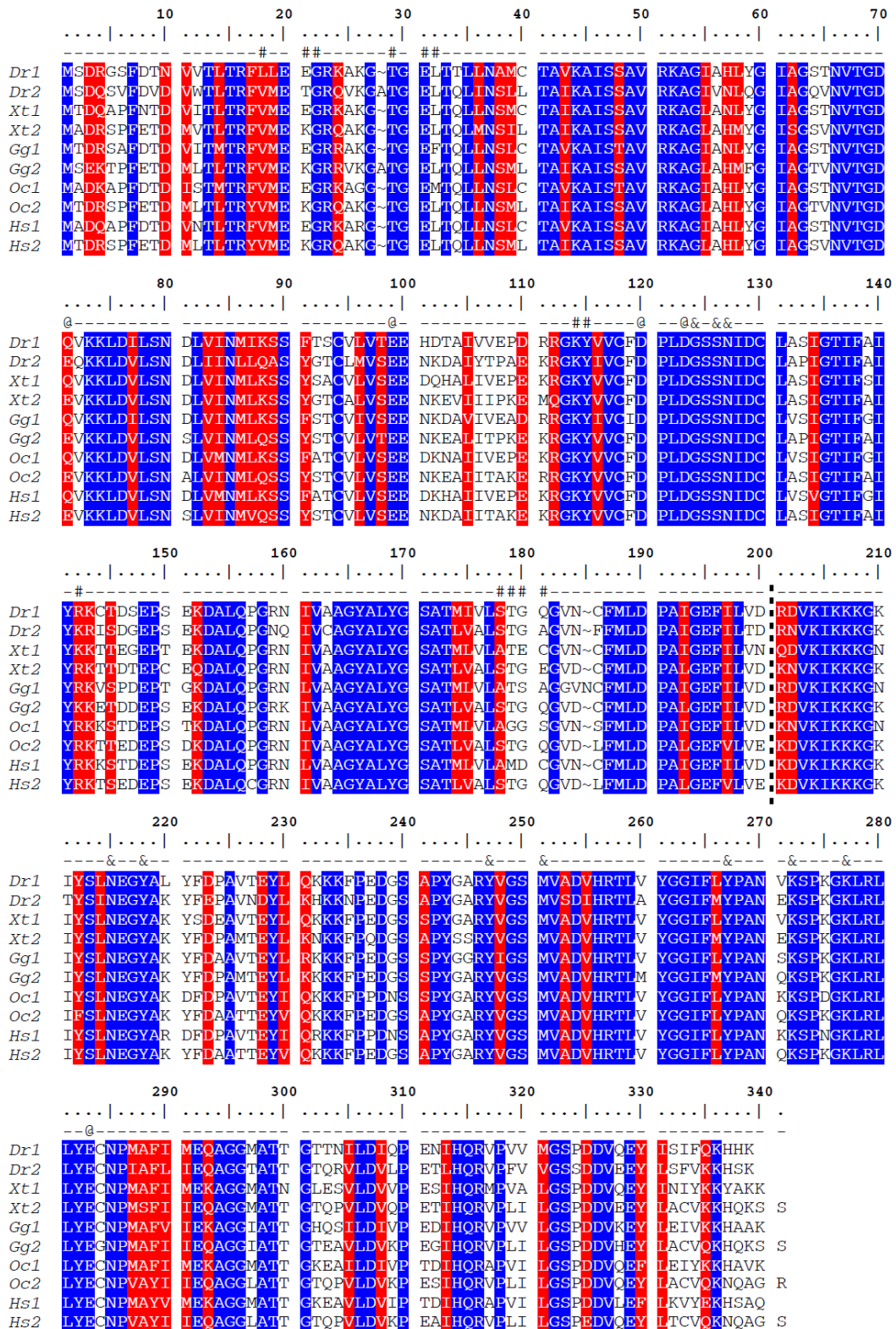
Mięśniowa FBPaza występuje w komórce w dwóch stanach. Enzym w stanie wolnym zlokalizowany w cytoplazmie jest nieaktywny przy fizjologicznym stężeniu AMP [Skąłeczki et al., 1995]. Enzym w stanie związanym z aldolazą oddziałuje silnie z α -aktyną - głównym białkiem strukturalnym linii Z. Badania immunohistochemiczne wykazały, że ludzka mięśniowa FBPaza jest zlokalizowana po obu stronach linii Z miocytów [Gizak et al., 2003]. Przypuszcza się, że FBPaza w stanie związanym oddziałuje dodatkowo z aldolazą tworząc kompleksy na linii Z [Rakus et al., 2013]. Utworzenie kompleksu FBPaza-aldolaza znosi inhibicję przez AMP, co umożliwia syntezę glikogenu w mięśniach [Rakus et al., 2004]. W kolejnych badaniach wykazano, że w oddziaływaniach z aldolazą uczestniczą aminokwasy przy N końcu [Gizak et al., 2008]. Odkryto również, że jony wapnia destabilizują kompleks FBPazy z aldolazą na linii Z w miocytach, hamując syntezę glikogenu podczas intensywnego wysiłku [Gizak et al., 2013; Rakus et al., 2013]. Takiego efektu nie zaobserwowano dla enzymów wątrobowych [Rakus i Dzugaj, 2000].

Porównując sekwencje FBPaz kręgowców w obrębie jednego gatunku widzimy, że identyczność sekwencji izoenzymów wątrobowego i mięśniowego wynosi 71-76%, natomiast identyczność danego enzymu z różnych gatunków wynosi 77-96% (Rysunek 15, Tabela 1).

Tabela 1. Identyczności oraz podobieństwa sekwencji (wg. BLOSUM62) FBPazy wątrobowej (1) oraz mięśniowej (2) wybranych kręgowców: *Danio rerio* (Dr) [Konzer et al., 2013], *Xenopus tropicalis* (Xt) [Klein et al., 2002], *Gallus Gallus* (Gg) [Tillmann et al., 2002], *Oryctolagus cuniculus* (Oc) [Tillmann et al., 2002] i *Homo sapiens* (Hs) [Solomon et al., 1988].

		IDENTYCZNOŚĆ [%]									
		Dr1	Dr2	Xt1	Xt2	Gg1	Gg2	Oc1	Oc2	Hs1	Hs2
PODOBIENSTWO [%]	Dr1		71	82	77	78	77	79	77	79	77
	Dr2	86		71	76	70	77	67	74	69	74
	Xt1	94	86		77	81	78	83	79	82	78
	Xt2	92	88	90		73	86	74	85	75	84
	Gg1	90	84	91	87		73	82	75	78	75
	Gg2	91	89	89	94	88		74	87	74	86
	Oc1	90	84	91	88	91	88		75	90	75
	Oc2	92	88	90	95	89	95	88		76	96
	Hs1	90	83	92	88	91	89	97	89		76
	Hs2	91	87	90	94	89	95	88	99	89	

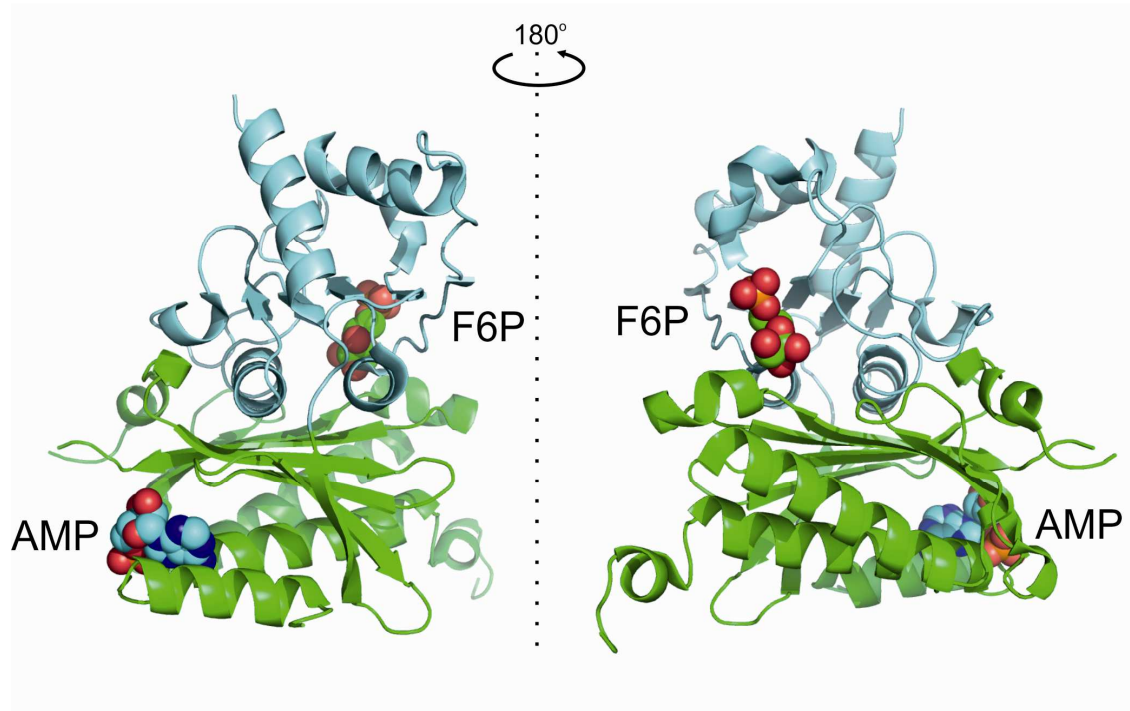
Mechanizm regulacji poziomu glukozy w organizmie



Rysunek 15. Zestawienie sekwencji aminokasowych izoenzymów FBPazy wybranych kręgowców (wątrobowy – 1, mięśniowy – 2). *Danio rerio* (*Dr*) [Konzer et al., 2013], *Xenopus tropicalis* (*Xt*) [Klein et al., 2002], *Gallus Gallus* (*Gg*) [Tillmann et al., 2002], *Oryctolagus cuniculus* (*Oc*) [Tillmann et al., 2002], *Homo sapiens* (*Hs*) [Solomon et al., 1988]. Reszty biorące udział w wiązaniu AMP (#), jonów Mg^{2+} (@) oraz substratu (&). Kolor niebieski oznacza tożsamość a czerwony podobieństwa według macierzy BLOSUM62. Granice między domeną allosteryczną a katalityczną zaznaczyłem czarną przerywaną linią.

Do tej pory rozwiązano 83 struktury krystaliczne izoenzymu wątrobowego z trzech eukariotycznych organizmów (*Homo sapiens* – 15 struktur, *Sus scrofa* – 67 struktur, *Oryctolagus cuniculus* – 1 struktura) oraz pięć struktur FBPazy mięśniowej (*Homo sapiens* – 5 struktur) [Zarzycki et al., 2011; Shi et al., 2013]. Na ich podstawie można przedstawić ogólną charakterystykę strukturalną enzymu ssaczego.

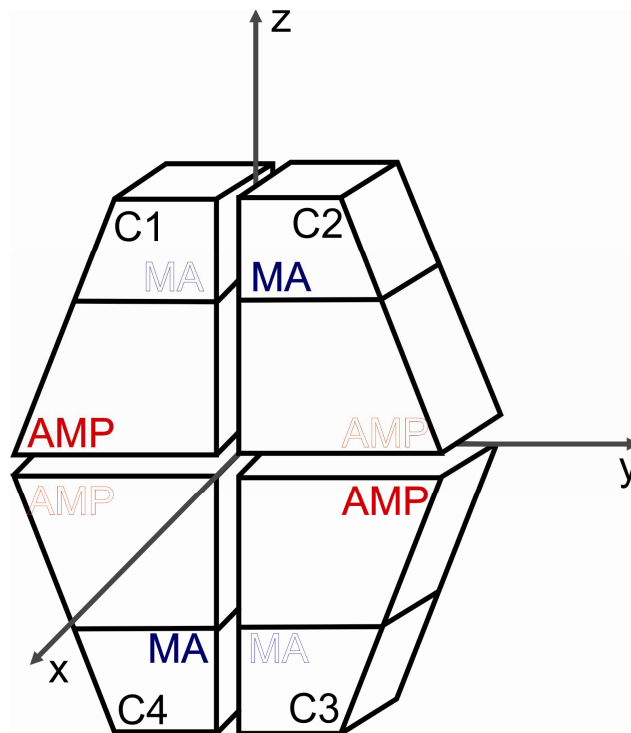
Eukariotyczna FBPaza typu I występuje jako homotetramer [Marcus et al., 1982; El-Maghrabi et al., 1993] zbudowany z podjednostek o masie ok. 37 kDa. W każdej podjednostce znajduje się 9 α -helis i 13 arkuszy β [Zhang et al., 1994]. Każda podjednostka składa się z domeny allosterycznej (regulatorowej, reszty 1-200) zlokalizowanej przy N końcu oraz katalitycznej przy C końcu. Pomiedzy domenami znajduje się miejsce wiązania jonów metali [Ke et al., 1990; Villeret et al., 1995; Choe et al., 2000]. W skład domeny allosterycznej wchodzi 5 α -helis i 8 arkuszy β , natomiast domena katalityczna zbudowana jest z 4 α -helis i 5 arkuszy β . W części allosterycznej znajduje się miejsce wiązania nukleotydu (miejsce inhibitorowe), natomiast po przeciwnej stronie podjednostki znajduje się centrum katalityczne (Rysunek 16).



Rysunek 16. Schemat budowy podjednostki FBPazy wątrobowej u kręgowców (PDB: 1EYJ). Na zielono zaznaczono domenę allosteryczną, natomiast na niebiesko domenę katalityczną. Cząsteczki F6P oraz AMP, przedstawione jako modele cząsteczkowe, wskazują lokalizację miejsca inhibitorowego (AMP) oraz miejsca aktywnego (F6P).

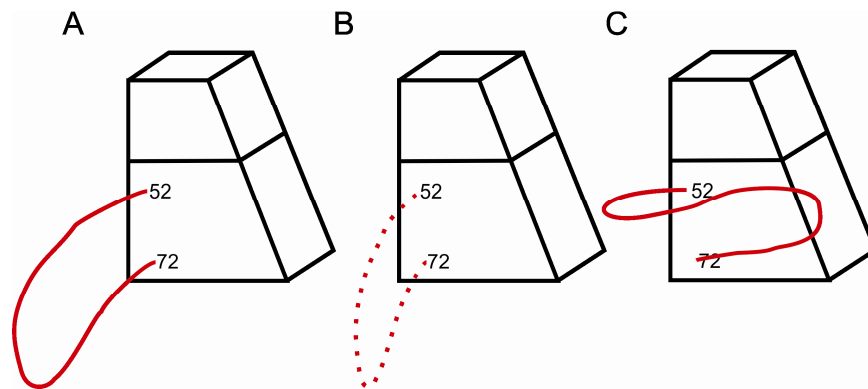
Tetramer FBPazy można opisać jako dimer dimerów utworzony przez dimer “górnny” (podjednostki C1 i C2) oraz dimer “dolny” (podjednostki C3 i C4). Symetria D2

tetrameru opiera się na trzech wzajemnie prostopadłych osiach dwukrotnych (Rysunek 17). Nazewnictwo podjednostek zostało określone na podstawie enzymu wątrobowego. Rozpoczynając od górnej lewej podjednostki, patrząc na tetramer wzdłuż osi x (Rysunek 16), nazywamy podjednostki zgodnie z ruchem wskazówek zegara C1-C2-C3-C4. Specyficzne dla FBPazy jest skrócenie dimerów dolnego i górnego względem siebie. Obrót dimerów następuje wokół osi z i jest on związany ze stanem enzymu. Skręt dimerów opisywany jest przez kąt κ , którego sposób wyznaczania opisałem w dalszej części pracy.



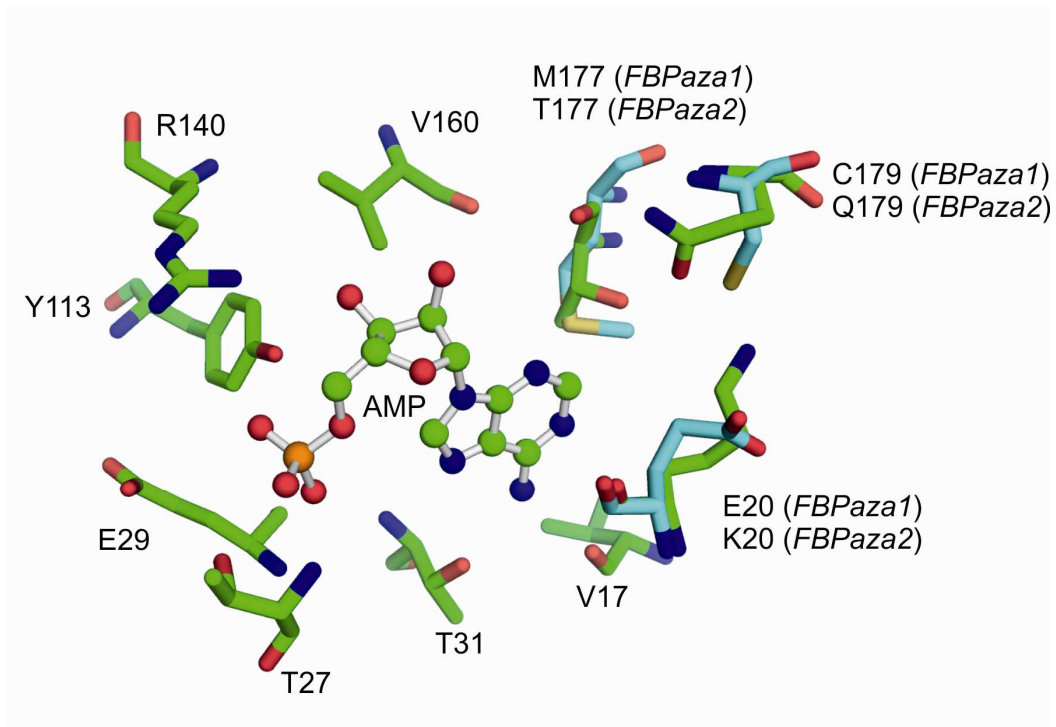
Rysunek 17. Schemat budowy tetrameru FBPazy u kręgowców. Podjednostki C1, C2, C3 i C4 numerowane są zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Położenie miejsca aktywnego (MA) i miejsca wiązania nukleotydu (AMP) zaznaczono grubą czcionką (przed płaszczyzną) oraz cienką (za płaszczyzną).

Każda podjednostka posiada pętlę katalityczną (reszty 52-72) znajdującą się na zewnątrz podjednostki, która może przyjmować trzy różne położenia w zależności od stanu enzymu [Choe et al., 1998]. Pętla w położeniu „engaged” (Rysunek 18A) znajduje się blisko miejsca aktywnego, a w położeniu „disengaged” (Rysunek 18C) daleko od miejsca aktywnego. Stan „disordered” (Rysunek 18B) jest stanem przejściowym pomiędzy położeniami „engaged” i „disengaged” [Nelson et al., 2001]. W strukturach krystalicznych pętla w położeniu „disordered” jest istotnie nieuporządkowana i charakteryzuje się brakiem gęstości elektronowej.



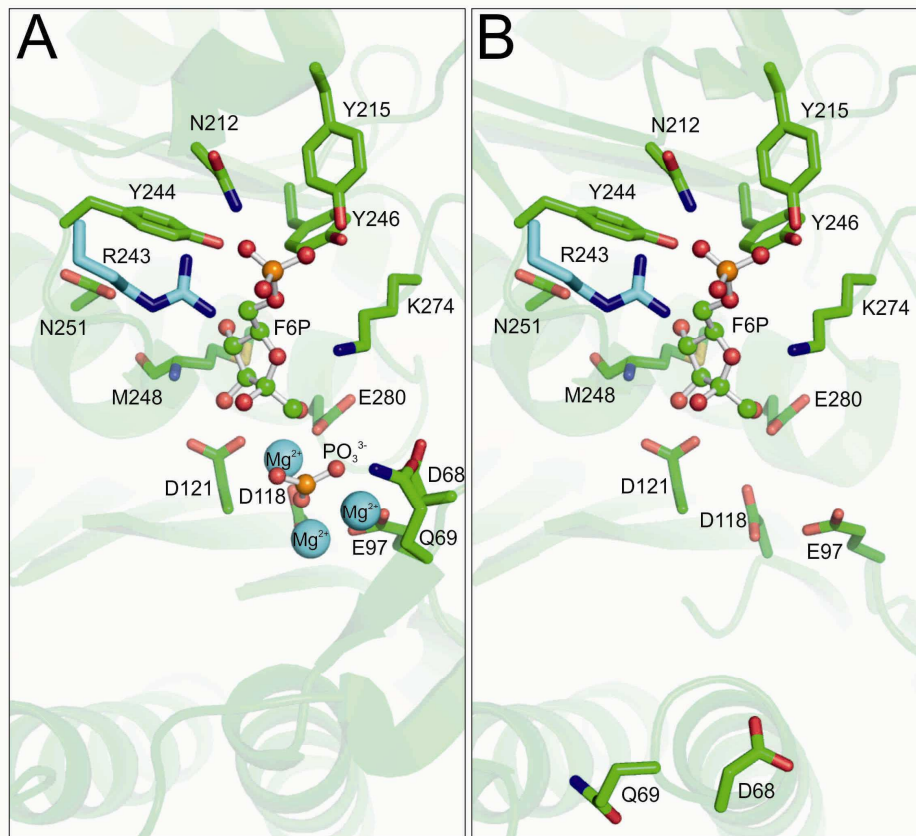
Rysunek 18. Możliwe położenia pętli katalitycznej. A-engaged, B-disordered, C-disengaged

Badania strukturalne FBPazy pozwoliły na przeprowadzenie dokładnej charakterystyki miejsca wiązania nukleotydu. [Liang et al., 1993; Gidh-Jain et al., 1994; Zhang et al., 1994; Stec et al., 1996; Iversen et al., 1997]. Aminokwasy biorące udział w tworzeniu miejsca wiązania AMP znajdują się w kilku punktach domeny allosterycznej (Rysunek 19). Grupa fosforanowa AMP oddziałuje z następującymi resztami: Thr27, Glu29, Tyr113. Atomy tlenu z pierścienia rybozy oddziałują z resztami Tyr 113, Arg140 i Val160. Zasada purynowa AMP oddziałuje z resztami Val17, Thr31 oraz, w izoenzymie mięśniowym, z dwoma resztami w pozycjach 177 i 179. FBPaza wątrobowa w pozycjach 177 i 179 posiada reszty Met i Cys, natomiast w enzymie mięśniowym występują reszty Thr i Gln. Nie do końca znane są podstawy zróżnicowanej podatności obu enzymów na hamowanie przez AMP. Możliwe, że w izoenzymie mięśniowym glutamina 179 tworzy wiązanie wodorowe z lizyną 20, dzięki czemu stabilizuje helisę $\alpha 1$ odpowiedzialną za wiązanie AMP. W pozycji 20 w enzymie wątrobowym zamiast lizyny występuje kwas glutaminowy. Obecność tak skrajnie różnych reszt aminokwasowych w pozycji 20 mogłaby wyjaśniać zróżnicowaną podatności obu enzymów na hamowanie przez AMP [Rakus et al., 2005].



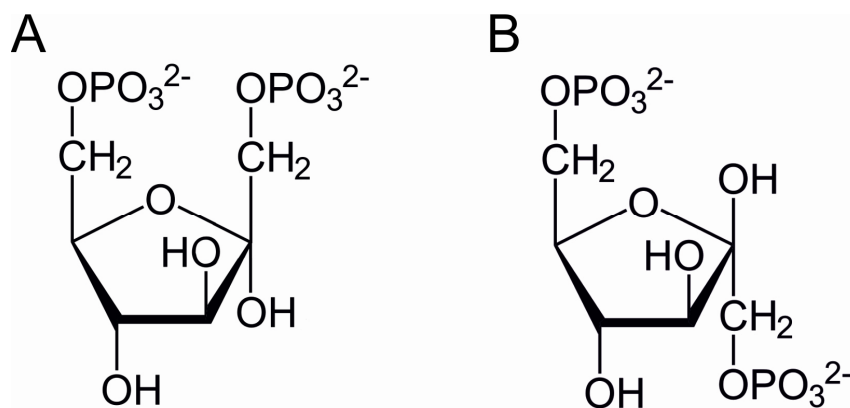
Rysunek 19. Reszty aminokwasów biorące udział w wiązaniu AMP w enzymach wątrobowym (FBPaza1, PDB: 1FBP) i mięśniowym (FBPaza2, PDB: 3IFA).

Miejsce aktywne enzymu zlokalizowane jest w centrum domeny katalitycznej, ale w jego skład wchodzi reszty aminokwasowe z obu domen (Rysunek 15). Ponieważ substrat musi być rozpoznany w miejscu aktywnym w specyficzny sposób, jest on podzielony na dwie części. Reszty aminokwasowe wiążące fosforan przy węglu 6 zlokalizowane są w domenie katalitycznej. Interesujący jest fakt uczestniczenia w stabilizacji substratu aminokwasów z obu podjednostek w obrębie dimeru. W tworzeniu miejsca aktywnego w podjednostce C1 bierze udział reszta Arg243 z podjednostki C2 i odwrotnie. Druga część miejsca aktywnego odpowiada za przeprowadzenie reakcji hydrolizy. Jest ona zbudowana z reszt pochodzących z obu domen (Rysunek 15). W jej skład wchodzi reszty kwasów asparaginowego i glutaminowego, które wspólnie z grupą fosforanową przy węglu 1 tworzą silnie nukleofilowy rejon, do którego mogą zostać przyciągnięte jony magnezu niezbędne do przeprowadzenia reakcji. Jedna z reszt (Asp68) zlokalizowana jest na pętli katalitycznej, dzięki czemu enzym może sterować przebiegiem reakcji. Sąsiadująca z nią reszta Glu69 jest odpowiedzialna za oddziaływanie z jonami wapnia jednak natura tego oddziaływania nie została jeszcze dokładnie zbadana [Zarzycki et al., 2007].



Rysunek 20. Reszty aminokwasowe tworzące miejsce aktywne w enzymie wątrobowym (A) aktywnym (PDB: 1NUX) oraz (B) nieaktywnym (PDB: 1FBP). W centrum aktywnym znajduje się produkt reakcji β-fruktozo-6-fosforan i grupa fosforanowa (A) oraz β-fruktozo-6-fosforan (B).

Dodatkowym kryterium rozpoznawania substratu jest jego stereoizomeria. Fruktozo-1,6-bisfosforan występuje w roztworze w równowadze pomiędzy α-anomerem (zawartość w roztworze 15%; Rysunek 21A), β-anomerem (zawartość w roztworze 81%; Rysunek 21B) oraz innymi formami [Frey et al., 1977].



Rysunek 21. Fruktozo-1,6-bisfosforan w formie furanozy: α-anomer (A), β-anomer (B).

Badania FBPazy prowadzone z użyciem analogów fruktozo-1,6-bisfosforanu pokazały, że anomer β lepiej wiąże się do enzymu niż anomer α [Marcus, 1976]. Warto zauważyć, że anomer β jest produktem reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę [Benkovic i Schray, 1976]. Jak pokazały kolejne badania, w wysokich stężeniach anomer β może nawet hamować aktywność FBPazy. Wynika z tego, że anomer β może ulec defosforylacji dopiero po mutarotacji do anomeru α [Benkovic i deMaine, 1982; Villeret et al., 1995]. Badania biochemiczne oraz pomiary NMR nie pozwoliły na jednoznaczne wyjaśnienie problemu stereospecyficzności. Wydawało się, że dopiero badania strukturalne FBPazy pozwolą jednoznacznie odpowiedzieć na to pytanie.

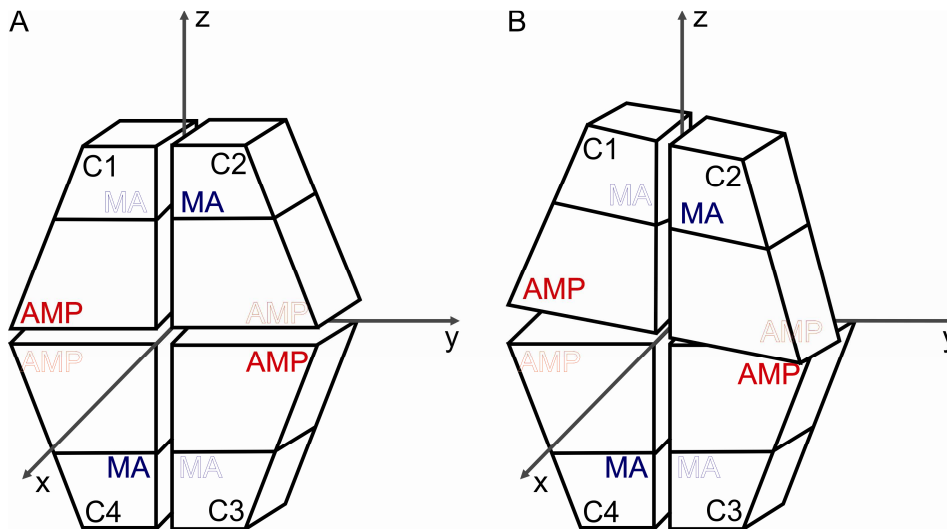
Na początku 2016 roku w banku danych PDB zdeponowanych było 88 struktur eukariotycznych obu izoenzymów FBPazy. Nie wszystkie posiadają ligand w miejscu aktywnym (Tabela 2). Analizując dostępne struktury można wyciągnąć wniosek, że anomer β lepiej stabilizuje strukturę enzymu w kryształach niż analog α , dlatego tak łatwo jest otrzymać stabilną termodynamicznie strukturę białka z anomerem β .

Tabela 2. Liczbowe zestawienie ligandów obecnych w miejscu aktywnym w strukturach FBPazy zdeponowanych w banku danych PDB (stan na dzień 25.01.2016). Enzym wątrobowy (W), enzym mięśniowy M.

Rola biologiczna	Ligand	Liczba	
		W	M
substrat	α -fruktozo-1,6-bisfosforan	1	0
	β -fruktozo-1,6-bisfosforan	1	0
produkt	α -fruktozo-6-fosforan	0	1
	β -fruktozo-6-fosforan	44	1
analog substratu	1,6-bisfosforan 2,5-dehydroglucitolu- (analog α)	10	10
	1,6-bisfosforan 2,5-dehydromannitolu (analog β)	2	2
inhibitor	fruktozo-2,6-bisfosforan (analog β)	6	6

W zależności od stężenia kofaktorów, tj. AMP, F-2,6-BP i Mg^{2+} , oba izoenzymy FBPazy mogą przyjmować dwie konformacje: „rozluźnioną”-R (ang. relaxed) i „napiętą”-T (ang. tense). Konformacja R w enzymie wątrobowym występuje wtedy, gdy w miejscu aktywnym znajduje się substrat i jony metalu. Kąt κ wynosi wtedy ok. 0° (Rysunek 22A), a pętla katalityczna znajduje się w położeniach „engaged” lub „disordered”. Przyjmuje się,

że enzym jest wtedy aktywny. Konformacja T w obu enzymach występuje wtedy, gdy w miejscu wiązania nukleotydu znajduje się cząsteczka AMP. Kąt κ wynosi wówczas ok. 20° (Rysunek 22B), a pętla katalityczna znajduje się w położeniu „disengaged” [Choe et al., 2000]. Zakłada się, że w stanie T enzym jest nieaktywny. W enzymie wątrobowym, w zależności od względnych stężeń efektorów, kąt κ może oscylować pomiędzy skrajnymi wartościami 0° - 20° [Hines et al., 2007].



Rysunek 22. Ogólny schemat tetrameru FBPaży wątrobowej w aktywnym stanie R (A) oraz nieaktywnym stanie T (B).

Przejście ze stanu R do T jest wywołane przyłączeniem cząsteczki AMP, co powoduje przesunięcie helisy $\alpha 1$ w stronę centrum tetrameru. Helisa $\alpha 2$ przesuwa się wzdłuż swojej osi od centrum tetrameru. Efektem ruchów helis jest zerwanie wiązań wodorowych pomiędzy podjednostkami C1 i C4 oraz przejście pętli katalitycznej do pozycji „disengaged” [Iancu et al., 2005].

Duża liczba struktur FBPaży wątrobowej oraz kilka struktur enzymu mięśniowego jest źródłem całej naszej wiedzy o budowie i funkcjonowaniu tego organospecyficznego enzymu. Niestety jest ona również przyczyną powstania licznych problemów związanych z omawianiem jego budowy. Podstawowym problemem jest precyzyjne wyznaczenie kąta κ . Istnieje kilka sposobów jego określania. Wartości kątów dla tej samej struktury wyznaczone różnymi metodami różnią się o $\pm 3^\circ$. Najprostszy sposób jego wyznaczania polega na sprowadzeniu go do kąta między wektorami łączącymi dwa stałe punkty w dimerach po ich zrzutowaniu na płaszczyznę prostopadłą do osi z. Dodatkowo należy ustalić, względem którego dimeru będziemy określać wartość kąta κ . W moich badaniach

kąt κ zdefiniowałem jako kąt pomiędzy wektorami łączącymi atomy C α reszt Leu30 po ich rzutowaniu na płaszczyznę xy prostopadłą do osi z. Dimer C3-C4 ustawiony równolegle z płaszczyzną yz tj. prostopadle do osi x ustaliłem jako linię odniesienia, względem której określiłem kąt κ . Ustalając kierunek obserwacji od strony dodatniego zwrotu osi z, przyjmuje się, że obrót wektora C2→C1 względem nieruchomego wektora C3→C4 zgodnie z ruchem wskazówek zegara powoduje, że kąt κ ma znak dodatni natomiast obrót przeciwny do ruchu wskazówek zegara kreśli ujemny kąt κ .

Kolejny problem dotyczy nazewnictwa niektórych struktur drugorzędowych, a w szczególności pętli katalitycznej. W większości publikacji można spotkać się z nazwami „Loop 50-72” lub „Loop 52-72”. Nazwa ta przyjęła się do określania pętli katalitycznej, ale nie stanowi ona odzwierciedlenia sytuacji faktycznej w strukturze. Po zastosowaniu programu DSSP do określenia struktury drugorzędowej znanych FBPaz można stwierdzić, że pętla katalityczna zawiera się np. pomiędzy resztami 49-72 dla wieprzowej wątrobowej FBPazy, resztami 49-68 dla mutantu ludzkiej FBPazy mięśniowej lub resztami 49-73 dla struktury ludzkiej FBPazy z wątroby. Określenie „pętla katalityczna” wiąże się z faktem, że jeden z aminokwasów wchodzących w jej skład, E68, bierze udział w reakcji katalizowanej przez enzym. Również spotykane w niektórych publikacjach określenie „pętla dynamiczna” odzwierciedla zdolność pętli do zmiany położenia od pozycji „engaged” do „disengaged”.

Najbardziej problematyczne okazuje się jednak nazwanie pętli za pomocą nomenklatury struktur drugorzędowych. Okazuje się bowiem, że w obrębie pętli w pozycji „disengaged” znajduje się krótka helisa 3_{10} , która zanika gdy pętla znajduje się w pozycji „engaged”, a w której obecne są dwie krótkie struktury β . Aby zachować niezmienną kolejność numeracji struktur drugorzędowych ułatwiającą porównywanie różnych struktur FBPazy, zdecydowałem się na specyficzne nazywanie krótkich struktur drugorzędowych. Dla przykładu struktura 3_{10} w obrębie pętli L2 nosi nazwę α L2. Ten sam system zastosowałem również w przypadku podobnych sytuacji w innych pętlach.

3.3 PATOLOGIE ZWIĄZANE Z ZABURZENIAMI METABOLIZMU GLUKOZY

Glukoza jest magazynowana w wątrobie i mięśniach w postaci glikogenu. Zarówno synteza (glikogenogeneza) jak i rozpad (glikogenoliza) glikogenu są katalizowane przez kaskadę enzymów (Rozdział 3.1.3 i 3.1.4). Uwarunkowane genetycznie zaburzenia metabolizmu glikogenu, będące skutkiem niedoboru niektórych enzymów, określane są

glikogenozami lub chorobami spichrzowymi (ang. glycogen storage disease). Są to choroby dziedziczne głównie wątroby i mięśni. Ograniczenie aktywności enzymu biorącego udział w syntezie prowadzi do obniżenia ilości glikogenu, a nadmiar cukru odkłada się w wątrobie, nerkach i mięśniach, powodując nieodwracalne zmiany. W przypadku mutacji enzymu rozkładającego glikogen występuje hipoglikemia oraz akumulacja glikogenu w wątrobie i mięśniach. Wyróżnia się 12 typów glikogenoz w zależności, który enzym ulega uszkodzeniu. Niedobór określonego enzymu może dotyczyć jednego narządu lub może być tkankowo-specyficzny i obejmować wątrobę, mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, nerki i jelita. Jedne z najczęściej występujących mutacji w genie fosfatazy glukozy-6-fosforanu lub translokazy glukozy-6-fosforanu prowadzą do przerostu wątroby i nerek (choroba von Gierke'go) [Chou et al., 2010]. Syndrom Franconi-Bickel jest związany z uszkodzeniem białka transportującego GLUT-2 [Christian et al., 2010]. Spichrzanie glikogenu może być ograniczone do kilku tkanek lub organów, ale może dotyczyć również całego organizmu. Leczenia tych patologii ogranicza się zwykle do stosowania odpowiedniej diety [Bejtko i Malińska, 2011]. Trwają również prace nad opracowaniem skuteczniejszych metod opartych na terapii genowej czy stymulacji szlaków metabolicznych [Yiu et al., 2010].

Glukoneogeneza jest szlakiem resyntezy glukozy *de novo* z aminokwasów, mleczanu oraz glicerolu. Reakcja katalizowana przez fosfatazę fruktozo-1,6-bisfosforanu jest kluczowym punktem w tym procesie. Niedobór FBPazy jest rzadkim zaburzeniem genetycznym (po raz pierwszy rozpoznany w 1970 przez Bakera i Winegarda [1970]), które dziedziczy się autosomalnie. Jest ono spowodowane mutacjami w genie *fbp1* (znaleziono 12 mutacji), które zmniejszają aktywność FBPazy, ograniczając szybkość glukoneogenezy i powodując hipoglikemię i kwasicę mleczanową. Częstotliwość występowania tej patologii wynosi 1-9/100000 [Douillard et al., 2012]. Pojawienie się glicerolu lub glicerolo-3-fosforanu w moczu jest charakterystyczne dla choroby. Jest ona rozpoznawana na podstawie oznaczenia enzymatycznej aktywności FBPazy lub metodą spektrometrii gazowej (GC/MS).

Jedną z powszechnych chorób metabolicznych jest cukrzyca, będąca wynikiem spadku efektywności działania lub brakiem insuliny. Wyróżnia się dwa typy tej choroby, 1 oraz 2, przy czym typ 2 stanowi ok. 90% wszystkich przypadków. Wątroba jest głównym miejscem syntezy endogennej glukozy z kwasu mlekowego na drodze glukoneogenezy lub w mniejszym stopniu z glikogenu (glikogenoliza). Sugeruje się, że glukoneogeneza jest

kluczowa dla nadprodukcji glukozy w cukrzycy typu 2, a inhibicja fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu może ograniczyć rozwój choroby. Inhibitor ołowiu MB06322 (CS-917) zastosowany u gryzoni z cukrzycą typu 2 ograniczył produkcję glukozy o 70% i glukoneogenezę o 46%. Zatem glukoneogeneza, a szczególnie fruktozo-1,6-bisfosfataza stanowi potencjalny cel dla interwencji farmakologicznej. Atrakcyjność FBPazy jako celu terapeutycznego związana jest z jej centralną rolą w glukoneogenezie, która umożliwia inhibicję tego enzymu bez wpływu na inne szlaki (glikogenoliza, glikoliza, cykl Krebsa). [Bie et al., 2015; Kubota et al., 2015].

Rak jasnokomórkowy nerki (ccRCC *ang. clear cell renal cell carcinoma*) charakteryzuje się podwyższonym poziomem stężenia glikogenu i akumulacją tłuszczów. Te zmiany metaboliczne związane są z mutacją w genie von Hippel-Lindau (VHL), która promuje nowotworzenie. Zauważono, że ekspresja FBPazy w komórkach ccRCC zapobiega wzrostowi komórek nowotworowych, co wskazuje na jej funkcję w hamowaniu rozrostu guza [Li et al., 2014].

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. ODCZYNNIKI I BUFORY

Tabela 3. Zestawienie odczynników i materiałów wykorzystanych w pracy.

Odczynniki / Materiały	Producent
Coomassie Brilliant Blue G-250, TEMED	Serva
SDS, DTT, Tris, HEPES, błękit bromofenolowy, Akrylamid, N,N'-metylenobisakryloamid, odczynnik Bradford, glicyna, glicerol, siarczan amonu, wodorotlenek sodu, chlorek potasu, chlorek wapnia, chlorek magnezu	Merck
Broad Range Protein Molecular Weight Markers V8491	Promega
kwas octowy, metanol, kwas solny	Polskie Odczynniki Chemiczne
BugBuster	Novagen
Superdex 200	Pharmacia
Fosfoceluloza P11	Whatman
IPTG	Thermo Scientific
Zestawy odczynników do krystalizacji: Index, Crystal Screen I/II, PEG/Ion Screen I/II, MembFac Płytki do krystalizacji, MPD, chlorek potasu, chlorek wapnia, chlorek magnezu, trójzasadowy cytrynian amonu pH 7.0, glicerol, PEG6000	Hampton Research
Zestawy odczynników do krystalizacji: JCSG-plus, PACT premier, Structure Screen, Morpheus	Molecular Dimensions Ltd
Komórki BL21 pLysS	Lucigen
Fruktozo-1,6-fosforan, fruktozo-6-fosforan, NADP, G6PDH, G6PI	Sigma Aldrich
Konstrukty do nadekspresji FBPazy w bakteriach <i>E. coli</i> BL21 pLysS	Zakład Fizjologii Molekularnej Zwierząt, Uniwersytet Wrocławski

Tabela 4. Skład 15% żelu poliakrylamidowego z SDS.

Składniki	Żel zagęszczający [10 ml]	Żel rozwijający [20 ml]
30% akrylamid/BAA (30/0,8)	1,7 ml	10 ml
1 M Tris-HCl pH 8,7	-	7,5 ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	1,2 ml	-
20% SDS	50 µl	100 µl
H ₂ O	7 ml	2.3 ml
APS	70 µl	140 µl
TEMED	6,5 µl	7 µl

Tabela 5. Skład roztworów do barwienia żeli [Ausubel et al., 1994].

Roztwór	Skład	Skład procentowy
Roztwór barwiący [250 ml]	125 ml 100% metanol	50%
	25 ml 100% kwas octowy	10%
	100 ml H ₂ O	40%
	0,125 g Coomassie Brilliant Blue R-250	0,05%
Roztwór odbarwiający [500 ml]	25 ml 100% metanol	5%
	62,5 ml 100% kwas octowy	12,5%
	412,5 ml H ₂ O	82,5%

Tabela 6. Skład 10x buforu elektrodowego w przeliczeniu na 1000 ml [Laemmli, 1970].

Składniki	Ilość
Tris	30 g
Glicyna	144 g
SDS	10 g

Tabela 7. Skład buforu obciążającego SBL 2x na 20 ml.

Składniki	Ilość
1 M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml
20% SDS	4 ml
100% glicerol	4 ml
DTT	616 mg
10 mg/ml błękit bromofenolowy	0,2 ml
H ₂ O	9,3 ml

Tabela 8. Skład pożywki LB.

Składniki	Ilość
Bakto-Trypton	1%
Ekstrakt drożdżowy	0,5%
Chlorek sodu	0,5%

4.2. OTRZYMANIE I OCZYSZCZANIE BIAŁKA

4.2.1. Nadekspresja białka w bakteriach *Escherichia coli*

Białko do krystalizacji można wyizolować z natywnego organizmu lub otrzymać na drodze nadekspresji. Białka naturalne posiadają różnorodne modyfikacje potranslacyjne, a ich ilość w materiale źródłowym jest najczęściej niewielka. Zastosowanie bakteryjnych systemów ekspresyjnych pozwala na stosunkowo szybką, tanią i wydajną produkcję niemodyfikowanych białek rekombinowanych. Zestaw taki składa się z plazmidowych wektorów ekspresyjnych zawierających sekwencję kodującą dane białko oraz bakteryjnego gospodarza, zwykle *Escherichia coli*, w którym następuje ekspresja białka. Stosując nadekspresję, można otrzymać białko o zmienionej sekwencji aminokwasowej (tzw. mutant). Pozwala to np. na weryfikację hipotez związanych z mechanizmami reakcji enzymatycznych.

Prace nad klonowaniem i ekspresją natywnej ludzkiej mięśniowej FBPazy oraz jej mutantem E69Q wcześniej prowadzone były przez dr Marka Zarzyckiego oraz mgr Janusza Wiśniewskiego [Zarzycki, 2011].

Opierając się na ich doświadczeniu, do otrzymania rekombinowanego białka zastosowałem komórki BL21 pLysS zawierające plazmid pETite (Lucigen) z natywną sekwencją kodującą ludzką mięśniową FBPazę. Pożywka LB (12 ml) do hodowli zawierała kanamycynę (30 µg/ml). Hodowla komórkowa przebiegała z wytrząsaniem (200 rpm) przez noc w temperaturze 37°C. Inkubację zakończyłem, gdy absorbancja przy długości fali $\lambda=600$ nm (OD_{600nm}) osiągnęła wartość około 0,6. Zawiesina komórek służyła do zaszczepienia 3 litrów pożywki LB, zawierającej kanamycynę (30 µg/ml). Hodowlę prowadziłem z wytrząsaniem 4 godziny (37°C, 200 rpm), do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} = 1,5$. Ekspresję białka indukowałem przez dodanie IPTG do stężenia końcowego 100 µg/ml. Komórki bakteryjne inkubowałem 8 godzin (37°C, 200 rpm), a następnie wirowałem 10 min w temperaturze 4°C (Eppendorf 5804R, 4000g). Otrzymany osad przechowywałem w -80°C do momentu użycia.

4.2.2. Liza komórek

W celu izolacji białka otrzymanego w wyniku nadekspresji, komórki bakteryjne poddaje się lizie. W tym procesie zostaje zniszczona błona komórkowa i białko uwalniane

jest do roztworu przy jednoczesnym zachowaniu jego własności np. aktywności enzymatycznej, struktury itp. Lizę bakterii można przeprowadzić za pomocą ultradźwięków (sonikacja), nadciśnienia (prasa Frencha), odpowiednich czynników chemicznych (detergenty, rozpuszczalniki organiczne) lub biochemicznych (trawienie enzymatyczne).

W trakcie moich badań do rozbicia struktury komórek bakteryjnych stosowałem detergenty. Osad bakteryjny po rozmrożeniu zawieszałem w 15 ml buforu lizującego BugBuster i inkubowałem 20 min na kołyszce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej. Następnie zawiesinę wirowałem (14000g) w temperaturze 4°C przez 25 min. Otrzymany supernatant filtrowałem przez watę szklaną.

4.2.3. Oczyszczanie wstępne

Otrzymany lizat bakteryjny jest mieszaniną pozostałości błony komórkowej oraz rozpuszczalnych składników komórki, takich jak kwasy nukleinowe, węglowodany, białka bakteryjne. Istnieje wiele metod pozwalających uzyskać homogenny preparat białkowy. Opierają się one na wykorzystaniu właściwości fizykochemicznych białek. Pierwszym etapem oczyszczania lizatu bakteryjnego powinno być jak najszybsze oddzielenie białek od pozostałych składników roztworu.

Precypitacja (wysalanie) jest jedną z najstarszych i najprostszych metod oczyszczania białek. Polega na selektywnym wytrącaniu białka z roztworu przy odpowiednim dobraniu warunków i czynnika strącającego. Kluczowe dla procesu wytrącania są temperatura, pH oraz stężenie białka, jak również szybkość dodawania czynnika wytrącającego. Zbyt szybkie dodawanie może spowodować lokalną nieodwracalną denaturację białka. Metoda opiera się na zmianie rozpuszczalności białka, która jest ściśle związana z rozkładem reszt hydrofilowych na jego powierzchni. Reszty te uczestniczą w tworzeniu oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy cząsteczkami posiadającymi ładunek oraz polarnych pomiędzy białkiem a wodnym rozpuszczalnikiem. Efektem działania czynników wytrącających jest zwiększona ekspozycja reszt hydrofobowych poprzez usuwanie z ich otoczenia cząsteczek wody, skutkiem czego zmniejsza się rozpuszczalność białka. Precypitacja jest najbardziej wydajna, jeżeli prowadzi się ją w pobliżu punktu izoelektrycznego białka. Otrzymane białko należy dializować przed podjęciem dalszych

kroków, ponieważ wysokie stężenie czynnika strącającego może przeszkadzać w dalszych etapach preparacji białka [Dubin, 2003].

Tabela 10. Najczęściej stosowane czynniki strącające.

Czynnik strącający	Zakres działania (% nasycenia)
sole o własnościach antychaotropowych np. siarczan amonu, siarczan sodu	40-80
rozpuszczalniki organiczne np. etanol, aceton	25-60
polimery organiczne np. glikol polietylenowy (PEG)	<15

Oczyszczanie białka za pomocą wytrącania siarczanem amonu prowadziłem w temperaturze 4°C. Ilość siarczanu amonu potrzebną do uzyskania konkretnego stopnia wysycenia określałem na podstawie Tabeli 11 [Dawson et al., 1986; Wood, 1976]. W pierwszym etapie do przesącza bakteriynego zawierającego FBPazę dodałem drobno utarty siarczan amonu do 50% wysycenia, a następnie po odrzuceniu osadu do pozostałego supernatantu siarczanu amonu do 75% wysycenia. Otrzymałą zawiesinę wirowałem (7000g) przez 25 min w temperaturze 4°C. Uzyskany osad rozpuściłem w 20 mM buforze Tris-HCl pH 7,4, zawierającym 0,1 mM EDTA. Otrzymany roztwór dwukrotnie dializowałem w buforze (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1 mM EDTA) przez 6 godzin w celu pozbycia się siarczanu amonu oraz nadmiaru jonów dwuwartościowych.

Tabela 11. Tabela frakcjonowania roztworu białka siarczanem amonu w temperaturze 0-4°C.

		KOŃCOWE WYSYCENIE ROZTWORU SIARCZANEM AMONU [%] W TEMPERATURZE 0°C																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0		10,6	13,4	16,4	19,4	22,6	25,8	29,1	32,6	36,1	39,8	43,6	47,6	51,6	55,9	60,3	65,0	69,7
5		7,9	10,8	13,7	16,6	19,7	22,9	26,2	29,6	33,1	36,8	40,5	44,4	48,4	52,6	57,0	61,5	66,2
10		5,3	8,1	10,9	13,9	16,9	20,0	23,3	26,6	30,1	33,7	37,4	41,2	45,2	49,3	53,6	58,1	62,7
15		2,6	5,4	8,2	11,1	14,1	17,2	20,4	23,7	27,1	30,6	34,3	38,1	42,0	46,0	50,3	54,7	59,2
20		0	2,7	5,5	8,3	11,3	14,3	17,5	20,7	24,1	27,6	31,2	34,9	38,7	42,7	46,9	51,2	55,7
25		0	0	2,7	5,6	8,4	11,5	14,6	17,9	21,1	24,5	28,0	31,7	35,5	39,5	43,6	47,8	52,2
30		0	0	2,8	5,6	8,6	11,7	14,8	18,1	21,4	24,9	28,5	32,3	36,2	40,2	44,5	48,8	53,2
35		0	0	2,8	5,7	8,7	11,8	15,1	18,4	21,8	25,4	29,1	32,9	36,9	41,0	45,3	49,6	53,9
40		0	0	2,9	5,8	8,9	12,0	15,3	18,7	22,2	25,8	29,6	33,5	37,6	41,8	46,1	50,3	54,5
45		0	0	2,9	5,9	9,0	12,3	15,6	19,0	22,6	26,3	30,2	34,2	38,3	42,4	46,5	50,6	54,7
50		0	0	3,0	6,0	9,2	12,5	15,9	19,4	23,0	26,8	30,8	34,8	38,9	42,9	47,0	51,0	55,0
55		0	0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,5	27,3	31,3	35,3	39,3	43,3	47,3	51,3	55,3
60		0	0	3,1	6,2	9,5	12,9	16,4	20,1	23,9	27,9	31,9	35,9	39,9	43,9	47,9	51,9	55,9
65		0	0	3,1	6,3	9,7	13,2	16,8	20,5	24,4	28,4	32,4	36,4	40,4	44,4	48,4	52,4	56,4
70		0	0	3,2	6,5	9,9	13,4	17,1	20,9	24,9	28,9	32,9	36,9	40,9	44,9	48,9	52,9	56,9
75		0	0	3,2	6,6	10,1	13,7	17,4	21,3	25,3	29,3	33,3	37,3	41,3	45,3	49,3	53,3	57,3
80		0	0	3,3	6,7	10,3	13,9	17,8	21,7	25,7	29,7	33,7	37,7	41,7	45,7	49,7	53,7	57,7
85		0	0	3,4	6,8	10,5	14,1	18,1	22,1	26,1	30,1	34,1	38,1	42,1	46,1	50,1	54,1	58,1
90		0	0	3,4	7,0	10,7	14,5	18,5	22,5	26,5	30,5	34,5	38,5	42,5	46,5	50,5	54,5	58,5
95		0	0	3,5	7,1	10,9	14,7	18,7	22,7	26,7	30,7	34,7	38,7	42,7	46,7	50,7	54,7	58,7
	POCZĄTKOWE WYSYCENIE ROZTWORU SIARCZANEM AMONU [%]																	

4.2.4. Chromatografia powinowactwa

Rozdział opiera się na oddziaływaniu białka z specyficznym ligandem unieruchomionym na złożu, które stanowi wypełnienie kolumny. Chromatografia powinowactwa zapewnia wysoką rozdzielczość i odznacza się dużą wydajnością. Ważne jest, by wiązanie białko-ligand było odwracalne, w przeciwnym razie zaadsorbowane białko pozostanie na kolumnie. Skład buforu, w którym białko nanoszone jest na kolumnę powinien faworyzować tworzenie specyficznego wiązania. Po wymyciu z kolumny niezwiązanych substancji następuje odzyskiwanie białka poprzez zmianę warunków na sprzyjające desorpcji. Pożądaný efekt można uzyskać wprowadzając konkurencyjny ligand posiadający większe powinowactwo do białka lub przez zmianę pH lub siły jonowej buforu.

Do oczyszczania FBPazy użyłem aktywowanej fosfocelulozy. Wykorzystałem tym samym wysokie powinowactwo FBPazy do anionów fosforanowych. Fosfocelulozę P-11 przygotowałem według procedury Smiley [1967] z niewielkimi modyfikacjami. Do fosfocelulozy dodałem 0,5 M KOH, po 10 min. zawiesinę odsączyłem i przemywałem wodą destylowaną tak długo aż pH wynosiło 8. W celu uwolnienia obecnego w złożu amoniaku, do fosfocelulozy dodałem 0,5 M HCl i po 10 min. ponownie przemywałem wodą do osiągnięcia pH 6. Następnie kilkakrotnie przemywałem fosfocelulozę buforem 20 mM Tris-HCl pH 7,4 z dodatkiem EDTA.

Do roztworu FBPazy po dializie (Rozdział 4.2.3) dodałem wcześniej przygotowaną fosfocelulozę P-11 (1 g fosfocelulozy/5 ml roztworu). Otrzymaną zawiesinę łagodnie mieszałem przez godzinę w 4°C. Kolumnę chromatograficzną (Pharmacia) o wymiarach 0,65x40 cm wypełniłem fosfocelulozą z zaadsorbowanym białkiem ($V=80\text{ cm}^3$). Wypełnienie przemyłem trzykrotnie (3x80 ml) 20 mM buforem Tris-HCl pH 7,0 zawierającym 0,1 mM EDTA. Zasadniczą frakcję enzymu (FBPaza) wymywałem 20 mM buforem Tris-HCl pH 7,0, który zawierał 0,1 mM EDTA, 5 mM AMP oraz 5 mM fruktozo-1,6-bisfosforan. Szybkość wypływu z kolumny wynosiła 2 ml/min. Frakcje o objętości 1 ml zbierałem na kolektorze Gilson FC203B.

4.2.5. Przygotowanie białka do krystalizacji

Połączone frakcje (Rozdział 4.2.4) zawierające FBPazę wysoliłem przez wysycenie 75% siarczanem amonu. Otrzymany osad rozpuściłem w 20 mM buforze HEPES pH 7,0 i dializowałem dwukrotnie w tym samym buforze przez 6 godzin w celu pozbycia się siarczanu amonu. Roztwór białka zateżyłem do końcowego stężenia 15 mg/ml. Tak przygotowany preparat poddałem krystalizacji.

4.2.6. Usuwanie AMP z białka

Po rozdiale chromatograficznym białko zawierało AMP, który jest inhibitorem FBPazy. W celu pozbycia się nukleotydu, do roztworu białka dodałem 100 mM $MgCl_2$ w 40 mM buforze HEPES pH 7,0 do końcowego stężenia $MgCl_2$ równego 50 mM. Roztwór białka nałożyłem na kolumnę do sączenia molekularnego HiLoad 16/60 wypełnioną złożem Superdex 200 (dextran związany kowalencyjnie z agarozą), podłączoną do systemu FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare). Kolumna była zrównoważona 20 mM buforem HEPES pH 7,0, który zawierał 50 mM $MgCl_2$. Podczas prowadzenia rozdziału monitorowałem absorbancje przy dwóch długościach fali 260 nm i 280 nm. Połączone frakcje zawierające czyste białko (wolne od AMP) poddałem dializie w 20 mM buforze HEPES pH 7,0, zawierającym 1 mM EDTA i ponownie przeprowadziłem sączenie molekularne w opisany powyżej sposób. Połączone frakcje po drugim sączeniu dializowałem w 20 mM buforze HEPES pH 7,0 z dodatkiem 1 mM EDTA i zateżyłem do 12 mg/ml. Tak przygotowany preparat poddałem krystalizacji.

4.3. OCENA JAKOŚCI PREPARATÓW

4.3.1. Oznaczenie stężenia białka

Do określania stężenia białka stosowałem metodę Bradford [Bradford et al., 1976]. Do roztworu zawierającego 750 μ l wody i 250 μ l odczynnika Bradford dodałem 1 μ l roztworu białka. Pomiar absorbancji wykonałem po upływie 10 min. (spektrofotometr UV-VIS, Hewlett Packard 8452A) przy długości fali 595 nm wobec próby kontrolnej zawierającej tylko odczynnik Bradford i wodę destylowaną. Stężenie białka odczytałem z krzywej wzorcowej, którą przygotowałem wykorzystując szereg rozcieńczeń roztworu albuminy wołowej (BSA) w zakresie stężeń 0-2mg/ml. Każdorazowo przeprowadzałem

trzy pomiary absorbancji, a średnią arytmetyczną wykorzystałem do obliczania stężenia badanego białka w roztworze.

W przypadku analizy zawartości białka przy dużej ilości prób stosowałem metodę pomiaru absorbancji w świetle ultrafioletowym ($\lambda=280$ nm). Teoretyczny współczynnik ekstynkcji molowej wyznaczony przez serwer ProtParam [Gasteiger, 2005] wynosi $27195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.3.2. Oznaczanie czystości białka

Do monitorowania przebiegu rozdziału białek na kolumnach chromatograficznych stosowałem metodę opartą na pomiarze absorbancji przy dwóch długościach fal 260 nm i 280 nm. Stosunek wartości absorpcji A_{260}/A_{280} pozwalał wskazać frakcje białkowe wolne od nukleotydów (AMP) [Warburg i Christian, 1942; Glasel, 1995].

4.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Do analizy czystości białek wykorzystywałem elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) prowadzoną w systemie buforów Laemmli [Laemmli, 1970]. Przed rozdziałem do każdej próbki dodałem 10 μl buforu SBL i inkubowałem ją 10 min. w temperaturze 80°C . Elektroforezę prowadziłem w żelu o wymiarach 8,6/6,8/0,1cm w aparacie o układzie pionowym (Bio-Rad). Na żel zagęszczający nałożyłem odpowiednio przygotowane próbki oraz marker masy molekularnej. Pierwszą fazę rozdziału prowadziłem pod napięciem 80 V. Po przemieszaniu próbki do części rozdzielającej zwiększałem napięcie do 160 V. Rozdział zakończyłem, gdy barwnik (błękit bromofenolowy) dotarł do końca żelu. Żel barwiłem przez 30 min. w roztworze barwiącym, a następnie odbarwiłem wytrząsając w roztworze odbarwiającym do czasu pokazania się prążków, po czym przepłukałem wodą destylowaną.

4.3.4. Oznaczanie aktywności enzymatycznej

Do monitorowania przebiegu izolacji FBPazy wykorzystywałem pomiar jej aktywności enzymatycznej. Pomiary wykonywałem na spektrofotometrze 8452A (Hewlett-

Packard) przy długości fali 340 nm [Traniello et al., 1972]. Polega ona na pomiarze szybkości redukcji NADP do NADPH. Redukcja katalizowana jest przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu (G6PDH). Reakcja redukcji jest sprzężona z reakcją katalizowaną przez FBPażę poprzez dodatek izomerazy glukozy-6-fosforanu, która przekształca produkt reakcji katalizowanej przez FBPażę, fruktozo-6-fosforan w glukozy-6-fosforan, który następnie jest przekształcany przez G6PDH w rybozylo-5-fosforan z jednoczesną redukcją NADP do NADPH.

Aktywność FBPaży oznaczyłem w objętości 1 ml w temperaturze 37°C. Białko dodałem do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 50 mM bufor BTP o pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM NADP, 5 U/ml G6PDH, 5 U/ml G6PI i inkubowałem 5 min. Reakcja rozpoczyna się przez dodanie 0,1 µl 10 mM F-1,6-BP. W pomiarach wykorzystałem wartość współczynnika ekstynkcji dla NADP/NADPH $A_{340}=6220 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ [Segel, 1976].

4.4. KRYSTALIZACJA

Proces wyodrębniania białka z roztworu w postaci monokryształów przebiega podobnie jak krystalizacja małych związków organicznych lub nieorganicznych. Każdy układ rozpuszczalnik (bufor) - związek chemiczny (białko) ma pewne graniczne stężenie, zwane stężeniem nasycenia, od którego rozpoczyna się krystalizacja. Pierwszym etapem krystalizacji jest tworzenie mikroskopijnych zarodków przyszłych monokryształów (nukleacja). W kolejnej fazie następuje wzrost pojedynczych kryształów (propagacja krystalizacji). Niepożądanym zjawiskiem każdej krystalizacji jest zlepianie się pojedynczych kryształów w większe struktury, tzw. zrosty. Przy odpowiednim doborze metody oraz warunków krystalizacji możliwe jest zatrzymanie jej na etapie wzrostu kilku dobrze utworzonych kryształów, dzięki czemu uzyskuje się monokryształy nadające się do badań dyfrakcyjnych.

Do otrzymania kryształów wykorzystywałem metodę dyfuzji par, której podstawą jest dążenie układu zamkniętego do osiągnięcia stanu równowagi. W metodzie tej nad zbiornik wypełniony roztworem czynnika strącającego umieszcza się kroplę roztworu białka. Kropla utworzona jest z roztworu białka o określonym stężeniu zmieszanego z roztworem strącającym w określonym stosunku. W wyniku mieszania kropli, stężenia roztworu krystalizacyjnego oraz białka maleją. Dyfuzja składników lotnych w obrębie układu prowadzi do wyrównania stężeń czynników strącających w obu roztworach, a przez

to do zateżenia białka do stanu przesylenia i w efekcie do jego krystalizacji lub wytrącenia w postaci osadu.

Poszukiwanie wstępnych warunków krystalizacji prowadziłem w układzie kropli siedzącej z wykorzystaniem robota krystalizacyjnego Gryphon (ARI) z płytkami 96 dołkowymi (ARI) uszczelnionymi taśmą Crystal Clear (HR). Roztwory krystalizacyjne pochodziły z komercyjnych zestawów odczynników krystalizacyjnych (Hampton Research, Molecular Dimensions Ltd). Do krystalizacji używałem białko w dwóch różnych stężeniach, 6 mg/ml i 12mg/ml. Do każdego rezerwuaru dodawałem 60 μ l odpowiedniego roztworu. Całkowita objętość kropli wynosiła 0,9 μ l. Roztwór białka mieszałem z roztworem krystalizacyjnym w trzech stosunkach: 2:1, 1:1 i 1:2. Krystalizację prowadziłem w temperaturze 19°C.

Optymalizację wstępnych warunków krystalizacji prowadziłem w temperaturze 19°C w układzie kropli wiszącej stosując płytki 24 dołkowe (HR), których brzegi pokryłem smarem silikonowym w celu uszczelnienia układu po nałożeniu szkiełka nakrywkowego. Do każdego rezerwuaru dodawałem 1 ml odpowiedniego roztworu krystalizacyjnego, a na szkiełko nakrywkowe nakładałem roztwór białka zmieszany z roztworem krystalizacyjnym w trzech stosunkach: 2:1, 1:1 i 1:2. Objętość każdej kropli wynosiła 3 μ l. Optymalizacja krystalizacji miała na celu otrzymanie większej liczby kryształów o wymiarach wystarczających do pomiarów dyfrakcji rentgenowskiej.

4.5. POMIARY DYFRAKCYJNE I OBRÓBKA DANYCH

Do określenia struktury przestrzennej białka wykorzystuje się zjawisko dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach. W porównaniu z kryształami małych cząsteczek, kryształy białka charakteryzują się mniejszym stopniem upakowania, dużą zawartością cząsteczek wody (ok. 50% objętości kryształu), a ich rozmiary nie przekraczają 0,5 mm. Z tego względu do ich badania stosuje się zwykle promieniowanie o wysokiej intensywności, które uzyskuje się w synchrotronach. W przeciwieństwie do dwóch długości fali dostępnych w laboratoryjnych generatorach rentgenowskich, w synchrotronie uzyskuje się promieniowanie o szerokim zakresie długości fal, co ma ogromne znaczenie przy pomiarach metodą dostrajanej dyfrakcji anomalnej (MAD).

Rejestracja refleksów powstałych w wyniku rozproszenia promieniowania rentgenowskiego na elektronach atomów białka w kryształach odbywa się na półprzewodnikowych detektorach CCD lub na krzemowych detektorach pikselowych.

Pomiary dyfrakcyjne prowadzi się zwykle w temperaturze 100 K (-173°C), wykorzystując do jej utrzymania strumień par azotu. Dzięki temu przedłużamy żywotność kryształów białkowych oraz poprawiamy ich jakość. Efektem niepożądanym, towarzyszącym witrifikacji kryształów białka może być powstawanie kryształów wody lub składników buforu obecnych w kryształach. Aby zapobiec takiej sytuacji, stosuje się krioprotektanty. Substancje te oddziałują z cząsteczkami wody i zapobiegają jej zamarzaniu. Do najpopularniejszych krioprotektantów należą glicerol, glikol etylenowy, PEG400 i MPD [Garman i Owen, 2006].

Przed pomiarem dyfrakcji kryształ zawieszany jest w nylonowej pęteli, którą umieszcza się na główce goniometrycznej. Goniometr umożliwia obrót kryształu o 360° dookoła osi prostopadłej do wiązki promieniowania i zapewnia stabilną pozycję kryształu podczas pomiaru.

Pomiar wykonujemy, naświetlając kryształ wiązką promieni rentgenowskich przez określoną ilość czasu. Podczas naświetlania kryształ wykonuje obrót o określony kąt. Podczas obrotu wiązka pierwotna zostaje częściowo ugięta na sieci przestrzennej kryształu, w efekcie czego uzyskujemy zwykle wiele tysięcy promieni dyfrakcyjnych zwanych refleksami. Celem pomiaru jest zarejestrowanie wszystkich niezależnych refleksów przynajmniej raz, a w szczególnych przypadkach z jak największą liczbą powtórzeń. W celu określenia strategii pomiarów najpierw rejestruje się serię kilku obrazów dyfrakcyjnych, zmieniając kąt obrotu kryształu. Najczęściej rejestruje się dwa obrazy przy kącie obrotu 0° i 90°. Pozwala to określić jakość kryształu, jak również poszczególnych refleksów. Na podstawie uzyskanych w ten sposób informacji można określić niektóre parametry pomiaru takie jak: optymalny czas naświetlania pojedynczego obrazu, kąt obrotu przypadający na pojedynczy obraz oraz odległość detektora od kryształu. Przy użyciu programów do analizy obrazów dyfrakcyjnych takich jak Mosflm [Leslie i Powell, 2007], na podstawie dwóch obrazów dyfrakcyjnych można określić parametry komórki elementarnej oraz optymalny kąt obrotu kryształu dla zarejestrowania najlepszego i kompletnego zestawu refleksów niezależnych. Pomiar dyfrakcji kryształu stanowi ostatni etap doświadczalny w krystalografii, dlatego ważne jest, by został przeprowadzony poprawnie i dokładnie.

Obrazy dyfrakcyjne są następnie przetwarzane na zbiór czynników struktury. Do tego celu wykorzystuje się programy: HKL [Otwinowski i Minor, 1997] lub XDS [Kabsch, 2010]. Podczas przetwarzania danych dyfrakcyjnych ustalana jest grupa

przestrzenna i parametry komórki elementarnej oraz zostają wyszukane refleksy o największej intensywności (I). Następnie program wykonuje wskaźnikowanie polegające na przypisaniu do każdego refleksu wskaźnika h, k, l . Kolejny etap polega na udokładnieniu parametrów układu pomiarowego, m.in. odległości kryształ-detektor czy pozycji wiązki. Równocześnie przeprowadza się integrację refleksów oraz koryguje intensywność tła w otoczeniu każdego refleksu. Integracja przeprowadzana jest dla każdego obrazu dyfrakcyjnego oddzielnie. Końcowym etapem integracji jest przypisanie do każdego obrazu czynnika skali opisującego zmiany rozpraszania w trakcie pomiaru. Ostatnim etapem przetwarzania danych jest skalowanie. W poprzednim etapie każdy obraz dyfrakcyjny został zamieniony w plik zawierający listę refleksów wraz z ich intensywnościami. Podczas skalowania wszystkie pliki łączy się w jeden zbiór i ponownie udokładnia parametry sieci i orientację kryształu. Za pomocą programu *XDSCONV* wchodzącego w skład pakietu *XDS* [Kabsch, 2010] zbiór intensywności refleksów (I) zostaje zamieniony na zbiór czynników struktury ($|F|$). Z całkowitego zbioru refleksów na tym etapie wyłączona zostaje grupa ok. 1000 refleksów, która służy w kolejnych etapach do obliczania wskaźnika R_{free} [Kleywegt i Jones, 1997].

Na zakończenie wykonuje się analizę statystyczną dla oceny jakości uzyskanego zbioru refleksów. Sprawdzamy m.in. kompletność danych, czyli ilość refleksów zarejestrowanych w stosunku do ilości teoretycznej dla danej rozdzielczości. Kolejny istotny parametr to wskaźnik rozbieżności R_{merge} oraz stosunek intensywności refleksu do intensywności tła $\langle I/\sigma(I) \rangle$. Wskaźnik rozbieżności określa różnicę między symetrycznymi refleksami. Niekiedy istotna okazuje się również liczba obserwacji refleksów niezależnych. Parametr ten otrzymujemy ze stosunku całkowitej liczby refleksów do ilości refleksów niezależnych i określamy go jako krotność lub redundancję. Należy pamiętać, że wszystkie parametry analizujemy w odniesieniu do całego zbioru danych, jak również do zakresu o najwyższej rozdzielczości.

Wszystkie pomiary dyfrakcyjne przeprowadziłem z wykorzystaniem trzech linii pomiarowych synchrotronu BESSY II w Berlinie, należącego do Helmholtz-Zentrum Berlin (Tabela 12).

Tabela 12. Biokrystalograficzne linie pomiarowe synchrotronu BESSY II

Numer linii	Zakres długości fali [Å]	Detektor
14.1	2,25 - 0,8	Rayonix MX-225
14.2	2,25 - 0,8	Rayonix MX-225
14.3	0,89	Rayonix SX-165

Przed rozpoczęciem pomiarów kryształy były witrifikowane. W tym celu przenosiłem je do kropli roztworu rezerwuarowego (różny dla każdego kryształu) zawierającej odpowiednią ilość krioprotektanta. Po kilku sekundach nasączenia kryształów umieszczałem w strumieniu par azotu. Dane dyfrakcyjne rejestrowałem na detektorach CCD. Strategię zbierania danych ustalałem za pomocą programu Mosflm [Leslie i Powell, 2007]. Do obróbki danych stosowałem program XDSAPP [Krug et al., 2012], stanowiący nakładkę graficzną na program XDS [Kabsch, 2010].

4.6. ROZWIĄZYWANIE STRUKTURY

Rozwiązanie struktury polega na wyznaczeniu pozycji każdego atomu w przestrzeni. Na podstawie analizy obrazów dyfrakcyjnych otrzymujemy informacje o intensywności refleksów, czyli fal promieniowania ugiętych na atomach kryształu. Otrzymany na etapie wstępnej obróbki zbiór danych zawiera listę refleksów wraz z ich intensywnościami, nie zawiera natomiast wartości amplitudy $|F|$ ani fazy ρ poszczególnych refleksów. Wielkości te są niezbędne do rozwiązania struktury, gdyż pozwalają obliczyć mapę gęstości elektronowej na podstawie transformaty Fouriera (1).

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

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

$\phi(hkl)$ - kąt fazowy czynnika struktury

V - objętość komórki elementarnej

Wartości kąta fazowego nie można zmierzyć za pomocą detektora, natomiast amplitudę można obliczyć na podstawie intensywności refleksu $I(hkl)$ w oparciu o zależność (2).

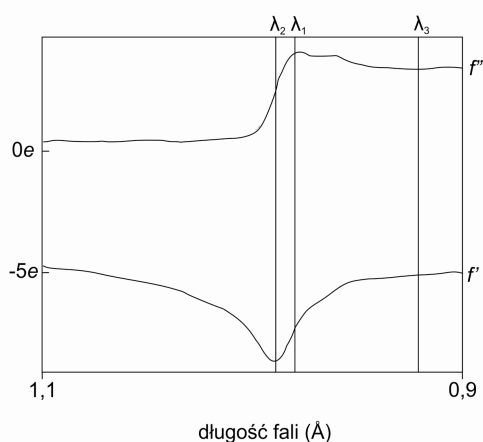
$$I(hkl) = |F(hkl)|^2 \quad (2)$$

Brak możliwości zmierzenia fazy, zwany problemem fazowym, stanowi główną przeszkodę w rozwiązaniu struktury, ponieważ najważniejsza informacja potrzebna do

sumowania szeregu Fouriera zawarta jest właśnie w fazach. Do rozwiązania problemu fazowego służą trzy metody.

Pierwsza z nich to podstawienie izomorficzne (SIR lub MIR) polegające na nasączeniu kryształów jonami metali ciężkich (np. rtęć lub platyna) lub halogenkami (np. bromki lub jodki). Efektem nasączenia jest pojawienie się w kryształach rejonów o dużej liczbie elektronów, które stanowią punkty kontrolne do wyznaczenia faz. Zastosowanie jednej pochodnej izomorficznej (SIR) pozwala uzyskać dwa rozwiązania problemu fazowego z jednakowym prawdopodobieństwem. Jednoznaczne rozwiązanie pozwala uzyskać zastosowanie kilku różnych pochodnych (MIR). Słabym punktem tej metody może być brak izomorfizmu pomiędzy pochodnymi, tzn. obecność różnic w parametrach komórki elementarnej lub zmian w składzie rozpuszczalnika.

Drugą metodę stanowi dostrajana dyfrakcja anomalna (MAD), która polega na wzbudzeniu rezonansu w chmurach elektronowych atomów konkretnych pierwiastków za pomocą promieniowania o odpowiednio dobranej długości fali. Metoda oparta jest na wykorzystaniu promieniowania synchrotronowego posiadającego szeroki zakres długości fali. Przewagą tej metody nad podstawieniem izomorficznym jest możliwość wykorzystania do pomiarów jednego kryształu, którego dyfrakcję mierzy się przy kilku długościach fali. λ_1 odpowiada maksymalnej absorpcji (f''), λ_2 odpowiada punktowi przegięcia krzywej absorpcji i maksymalnej dyspersji (f') oraz przy długości fali λ_3 znajdującej się powyżej progu absorpcji, która zapewnia najwyższą możliwą rozdzielczość (Rysunek 23). Najczęściej jako atomy anomalne wykorzystuje się selen (rekombinowane białka z selenometioniną), atomy ciężkie lub naturalnie występującą w białkach siarkę.



Rysunek 23. Przykładowa krzywa absorpcji (f'') i dyspersji (f') dla atomów selenu

Ostatnią metodą jest podstawienie cząsteczkowe (MR). Stosuje się je w przypadku, gdy badane białko jest podobne pod względem strukturalnym do już istniejącego modelu. Wyznaczenie faz oparte jest na superpozycji funkcji Pattersona, w której poszukiwana jest największa korelacja pomiędzy wektorami doświadczalnymi oraz tymi, pochodzącymi ze znanej struktury. Model do podstawienia cząsteczkowego powinien spełniać dwa kryteria. Jego identyczność z badanym białkiem na poziomie sekwencji powinna być większa niż ~25% oraz średnia kwadratowa odchylenia położenia atomów C α modelu i nowej struktury nie powinna przekroczyć ok. 1,6 Å. Źródłem modeli jest bank danych PDB (ponad 124 tys. zdeponowanych struktur).

Rozwiązanie problemu fazowego jakkolwiek z tych metod pozwala wyliczyć mapę gęstości elektronowej. Kolejnym etapem pracy jest właściwe zbudowanie modelu w oparciu o gęstość elektronową.

Wszystkie struktury opisane w niniejszej pracy zostały rozwiązane metodą podstawienia cząsteczkowego przy użyciu programu PHASER [McCoy et al., 2007] wchodzącego w skład pakietu CCP4.

4.7. UDOKŁADNIANIE STRUKTUR

Rozwiązana w poprzednim kroku struktura, tj. zdefiniowane współrzędne poszczególnych atomów, jest tylko przybliżonym modelem. Poza tym w przypadku metody MR, w strukturze widoczne są tylko atomy wstępnego modelu. Dlatego współrzędne wszystkich atomów muszą zostać udokładnione, a w niektórych przypadkach konieczna jest także przebudowa fragmentów modelu. Udokładnianie odbywa się w następujących po sobie cyklach. W skład każdego kroku wchodzi ręczna korekta modelu oraz seria obliczeń mających na celu minimalizację różnic pomiędzy doświadczalnymi a obliczonymi wartościami czynników struktury. Przebudowę modelu wykonuje się w specjalnych programach graficznych takich jak Coot [Emsley et al., 2010] w oparciu o mapy gęstości elektronowej ($2F_o-F_c$ oraz F_o-F_c). Można w nich korygować geometrię molekuł, dodawać i usuwać reszty aminokwasowe, ligandy czy też cząsteczki wody. Przebudowany model udokładnia się przy użyciu programów opartych zwykle na metodzie największej wiarygodności takich jak REFMAC5 [Murshudov et al., 1997] czy phenix.refine [Afonine et al., 2012]. Dla udokładnionej struktury ponownie obliczana jest mapa gęstości elektronowej dla kolejnego cyklu przebudowy modelu.

By jak najlepiej udokładnić parametry modelu, konieczne jest włączenie do procesu dodatkowych parametrów takich jak więzy miękkie (ang. *restraints*). Zawierają one informacje o geometrii białek opracowane na podstawie geometrii małych cząstek zdeponowanych w bazie danych Cambridge (CSD) [Allen, 2002; Engh i Huber, 2001]. O tym, jak silne więzy należy zastosować decyduje rozdzielczość i jakość zbioru danych. Oprócz więzów stereochemicznych przy udokładnianiu modelu stosujemy również parametr TLS (ang. translation, libration, skew). Daje on możliwość opisu anizotropowych drgań cząsteczek już przy niewielkiej liczbie obserwacji. Parametr TLS oparty jest na założeniu, że grupy atomów mogą poruszać się jak bryła sześcienne.

Do wizualizacji i przebudowy struktur opisanych w tej pracy używałem programu Coot [Emsley et al., 2010]. Struktury udokładniałem przy pomocy programu phenix.refine [Afonine et al., 2012] wchodzącego w skład pakietu Phenix.

4.8. OCENA JAKOŚCI STRUKTUR

Każdy etap udokładniania jest monitorowany poprzez kontrolę wskaźników rozbieżności R i R_{free} . Są to wartości rozbieżności pomiędzy wielkościami doświadczalnymi a obliczonymi na podstawie modelu. Wskaźnik R liczony dla całego zbioru refleksów obarczony jest wadą polegającą na tym, że ulega poprawie (zmniejszeniu wartości) przy każdej rozbudowie modelu o dodatkowe parametry, nawet gdy nie mają one potwierdzenia w danych eksperymentalnych. Aby zapobiec tej sytuacji wprowadzono testowy wskaźnik R_{free} [Kleywegt i Jones, 1997] oparty na losowo wybranych ~ 1000 refleksach, które od samego początku zostają wyłączone z procesu udokładniania [Brünger, 1992]. Dla dobrze udokładnionych struktur wskaźnik R nie powinien być z reguły większy niż 20%, natomiast różnica pomiędzy R_{free} a R nie powinna być większa niż ok. 3-7% [Wlodawer et al., 2008; 2013].

Oceniając jakość modelu należy wziąć pod uwagę rozbieżność wartości parametrów doświadczalnych od wartości idealnych. Przyjmuje się, że średnia kwadratowa odchylenia parametrów struktury od wartości standardowych np. dla długości wiązań powinna wynosić ok. 0,02 Å, a dla kątów 1,7° [Wlodawer et al., 2008; 2013].

Ważnym kryterium oceny jakości struktury są wartości kątów torsyjnych ϕ i ψ łańcucha głównego, które nie są ograniczane więzami podczas udokładniania. Zastosowanie wykresu Ramachandrana [Ramakrishnan i Ramachandran, 1965] pozwala zidentyfikować reszty aminokwasowe o nietypowej lub błędnej konformacji, która może

wynikać ze szczególnych oddziaływań tej reszty lub niepoprawnej budowy modelu. W celu weryfikacji konformacji reszt w modelu należy przeanalizować mapę OMIT gęstości elektronowej.

Poprawność udokładnionych struktur sprawdzałem za pomocą programu MolProbity [Chen et al., 2010]. Wartości wskaźników rozbieżności R i R_{free} oraz średnich kwadratowych odstępstw od idealnych parametrów obliczane były podczas udokładniania struktur w programie phenix.refine [Afonine et al., 2012].

4.9. ANALIZA I PREZENTACJA WYNIKÓW

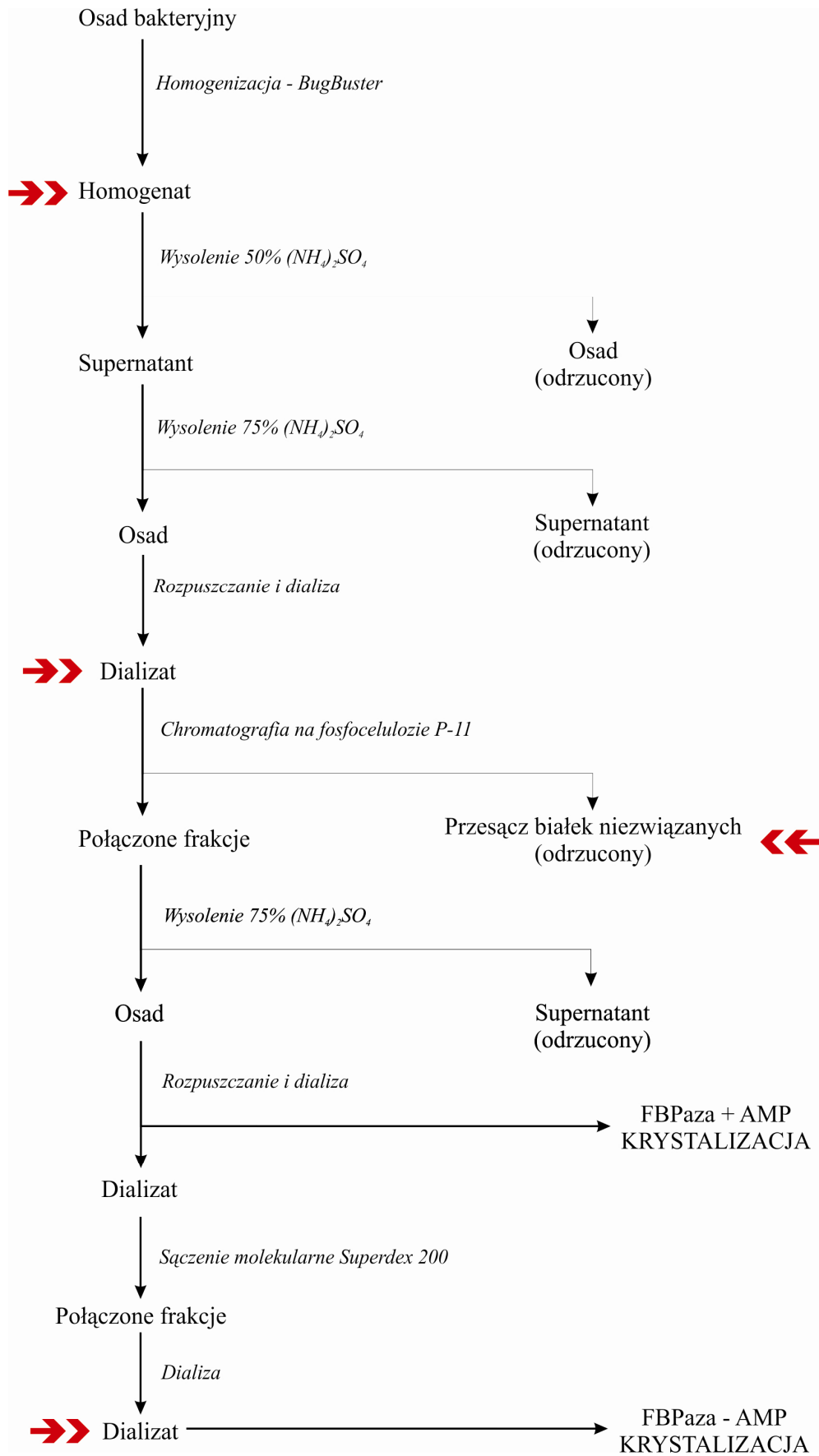
Rozwiązane i udokładnione struktury FBPazy analizowałem za pomocą powszechnie dostępnych programów. Porównywanie sekwencji aminokwasowych wykonywałem za pomocą pakietu programów BioEdit [Hall, 1999]. Analizę struktury drugo- i czwarto- rzędowej prowadziłem odpowiednio za pomocą programu DSSP [Kabsh i Sander, 1983] oraz serwera PISA [Krissinel i Henrick, 2007]. Rysunki przedstawiające rozwiązane struktury wykonałem w programie PyMOL [DeLano, 2002].

5. WYNIKI BADAŃ

5.1. OTRZYMANIE I OCZYSZCZENIE FBPAZY

Badania prowadziłem w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Zwierząt we Wrocławiu oraz w Centrum Badań Biokrytalograficznych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Prace prowadzone we Wrocławiu miały na celu otrzymanie i oczyszczenie rekombinowanej natywnej ludzkiej mięśniowej FBPaży w kompleksie z AMP. Enzym o natywnej sekwencji izolowałem z bakterii *E.coli* wyhodowanych przez mgr Janusza Wiśniewskiego. Izolację i oczyszczanie mutantu E69Q FBPaży prowadził dr Marek Zarzycki.

FBPaża natywna oraz mutant E69Q nie posiadały dodatkowych znaczników histydynowych. Dlatego do ich oczyszczania używano metody opartej na frakcjonowaniu roztworu białka za pomocą siarczanu amonu oraz chromatografii powinowactwa na złożu fosfocelulozowym. Oczyszczanie natywnej FBPaży prowadziłem według schematu przedstawionego na rysunku 24. Według tej samej procedury postępowano z mutantem E69Q.

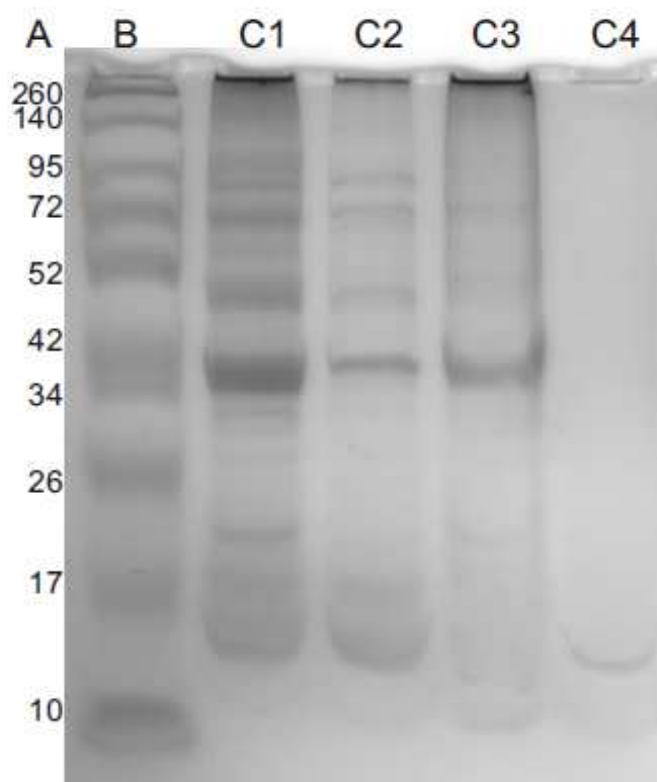


Rysunek 24. Schemat oczyszczania FBPazy. Czerwone strzałki wskazują etapy, w których określano aktywność FBPazy.

Każdy z etapów oczyszczania natywnej FBPazy (Rysunek 24) analizowałem pod kątem ilości otrzymywanego białka, jak również jego jakości (Tabela 14, Rysunek 25).

Tabela 14. Charakterystyka poszczególnych etapów oczyszczania FBPazy.

Etap		Absorbancja $\lambda=280$ nm	Stężenie [mg/ml]	Objętość [ml]	Białko [mg]
Osad bakteryjny		-	-	-	9000
Homogenat	C1	0,373	7,46	60	447,83
Supernatant 50%	C2	0,274	5,49	63	345,73
Osad 50%		0,097	2,13	40	85,28
Osad 75%	C3	0,432	8,63	39	336,75
Supernatant 75%	C4	0,027	-	65	0
Przesącz niezwiązany		0,531	2,12	39	82,86
Połączone frakcje		0,179	3,59	47	168,91



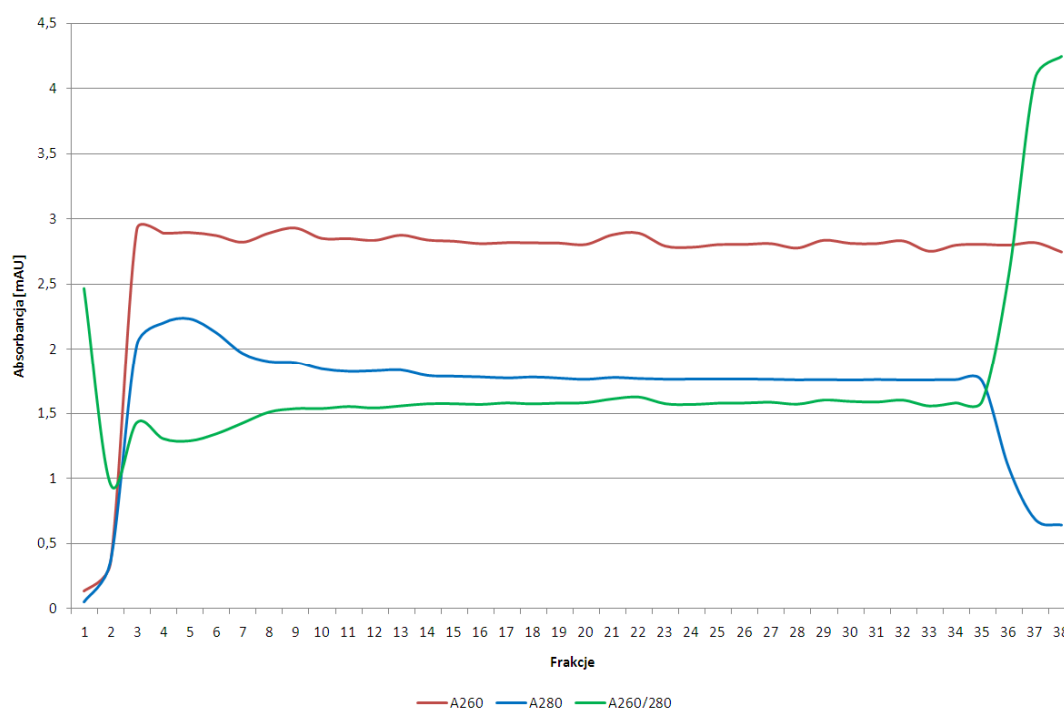
Rysunek 25. Analiza poszczególnych etapów oczyszczania FBPazy (C1-C4, Tabela 14), w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym wybarwionym błękitem Coomassie brilliant blue. Wzorce masy (A, B) [kDa].

Aktywność enzymu sprawdzałem na kilku etapach oczyszczania (Rysunek 24).

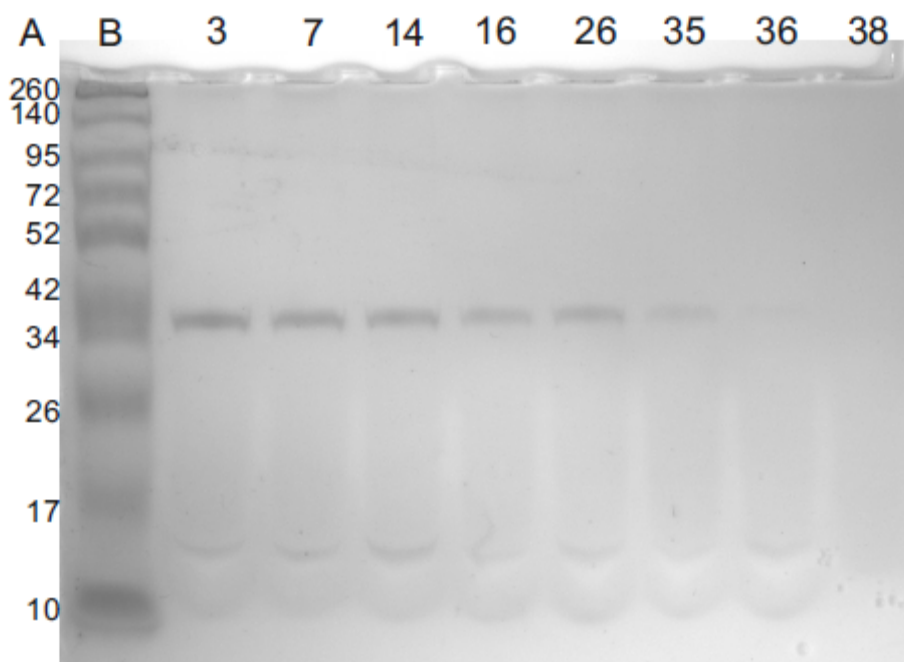
Tabela 15. Ocena aktywności FBPazy w punktach kontrolnych izolacji (Rysunek 24).

	Specyficzna aktywność [U/ml]	Aktywność całkowita [U]
Homogenat	41,5	2490
Osad 75%	33,8	1318
Przesącz niezwiązany	1,9	74,1
Dializat	26,6	1251

W wyniku rozdziału chromatograficznego na fosfocelulozie P-11 (Rozdział 4.2.4) uzyskałem 38 frakcji (Rysunek 26). Frakcje o numerach 3-35 (Rysunek 26, 27), zawierające FBPazę związaną z AMP, połączyłem i zatężyłem na membranach filtrujących (Amicon) do stężenia 15 mg/ml. Połączone frakcje stanowiły materiał wyjściowy do eksperymentów krystalizacyjnych oraz do otrzymania białka niezwiązanego z AMP.

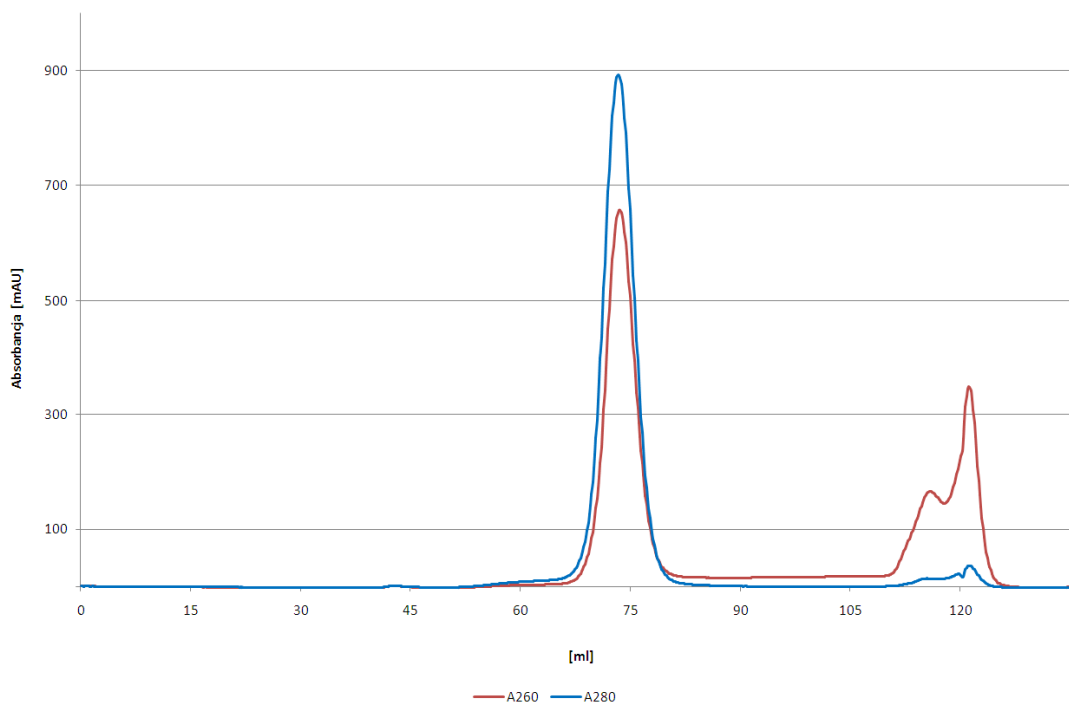


Rysunek 26. Chromatogram oczyszczania FBPazy na fosfocelulozie P-11.



Rysunek 27. Analiza FBPazy po chromatografii na fosfocelulozie, w 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Żel wybarwiono błękitem coomassie brilliant blue. Wzorce masy (A, B) [kDa]. 3, 7, 14, 16, 26, 35, 36, 38 – frakcje chromatograficzne zawierające FBPazę.

W celu oddzielenia FBPazy od AMP przeprowadziłem sączenie molekularne na kolumnie HiLoad 200 (Rozdział 4.2.6). Kolumna była zrównoważona 20 mM buforem HEPES pH 7,0 z dodatkiem 50 mM $MgCl_2$. Frakcje 107-124 z I sączenia (Rysunek 28) zawierały AMP. Aktywna FBPaza znajdowała się we frakcjach 65-80, które połączyłem i po zateżeniu naniósłem kolejny raz na kolumnę HiLoad200.

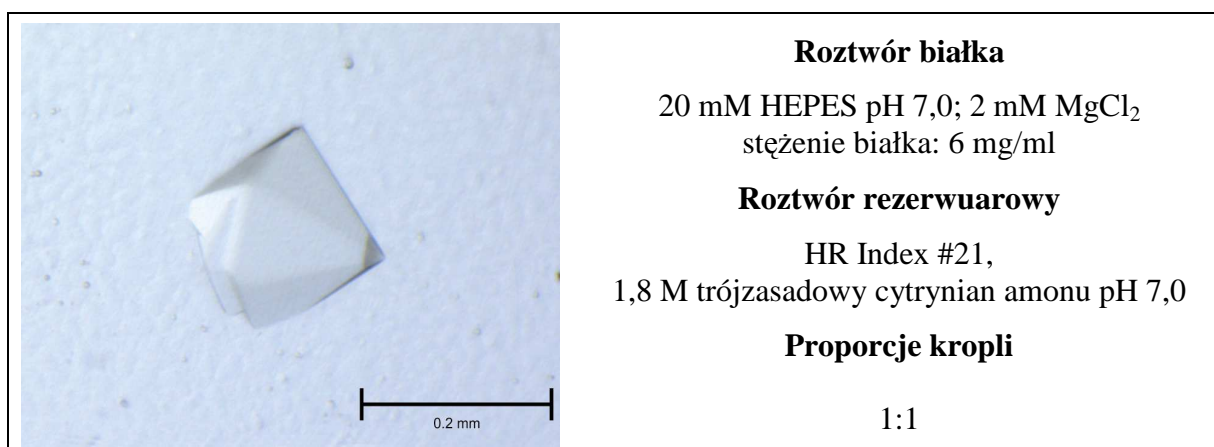


Rysunek 28. Sączenie molekularne FBPazy.

5.2. KRYSTALIZACJA FBPAZY

5.2.1. Krystalizacja białka natywnego w kompleksie z AMP

Warunki krystalizacji ustaliłem używając robota krystalizacyjnego Gryphon (ARI) i komercyjnych zestawów do krystalizacji firmy Hampton Research. Używałem do tego celu płytek z 96 dołkami, krople miały objętość 0,2 μ l. Wstępne warunki krystalizacji FBPazy z AMP uzyskałem po 10 dniach (Rysunek 29).



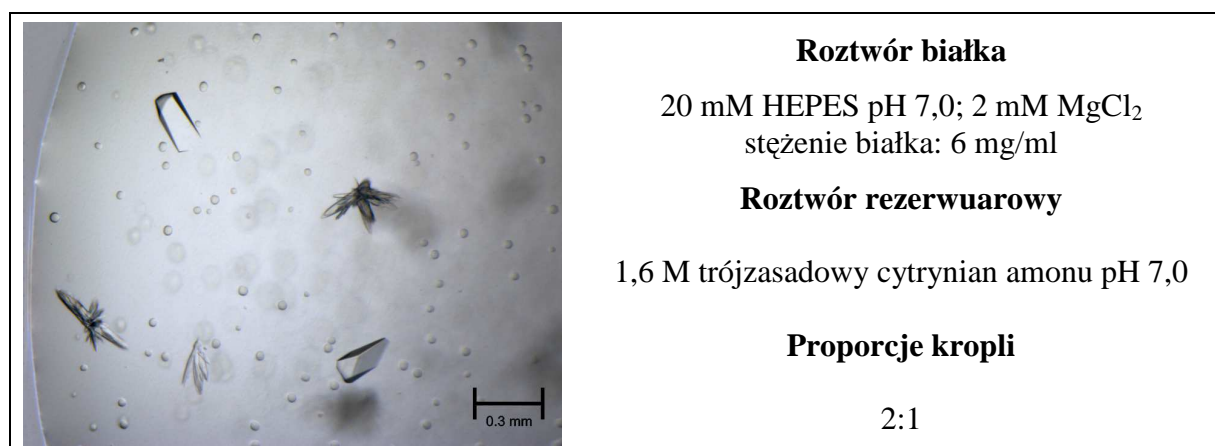
Rysunek 29. Warunki i wyniki wstępnej krystalizacji FBPazy z AMP

Optymalizację przeprowadziłem w dwóch temperaturach 4°C i 19°C w układzie wiszącej kropli. W każdym rezerwuarze umieściłem 1 ml odpowiedniego buforu (Tabela 16). Krople miały objętość 3 µl. Nastawiałem krople w trzech stosunkach objętościowych: 2:1, 1:1 i 1:2.

Tabela 16. Rozwinięcie warunków krystalizacji HR Index #21

Numer rezerwuaru	1	2	3	4	5	6
Stężenie cytrynianu amonu [M]	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8
Numer rezerwuaru	7	8	9	10	11	12
Stężenie cytrynianu amonu [M]	1,9	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4

Po pięciu dniach w czterech kroplach (1,4-1,7 M cytrynian amonu) otrzymałem kryształy (Rysunek 30) odpowiednie do pomiarów dyfrakcyjnych. Najlepsze kryształy wyrosły przy stężeniu cytrynianu amonu 1,6 M.

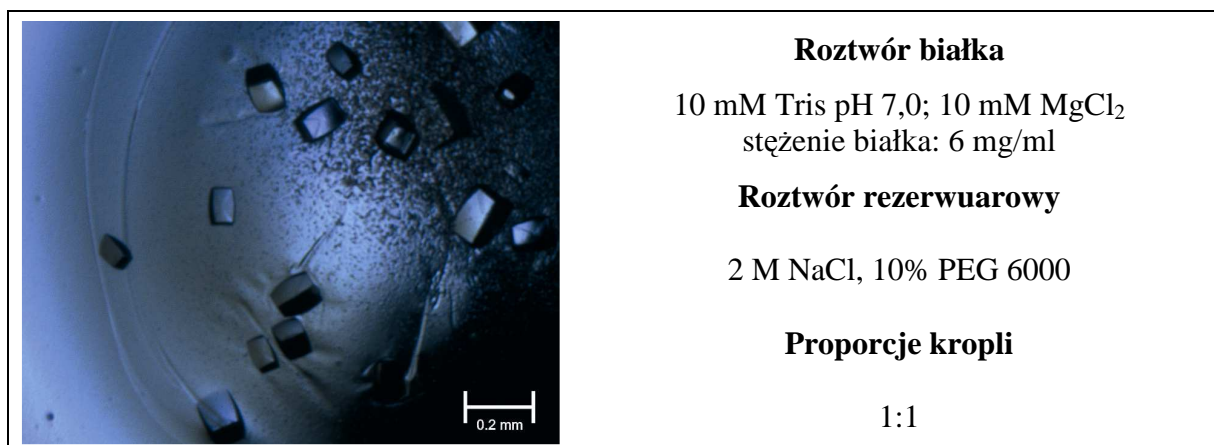


Rysunek 30. Warunki i wyniki optymalizacji krystalizacji FBPazy z AMP

5.2.2. Krystalizacja białka natywnego wolnego od AMP

Poszukiwanie warunków krystalizacji białka natywnego bez AMP prowadziłem wspólnie z dr Robertem Kołodziejczykiem. FBPaza po wymyciu AMP została zatężona do stężenia 6 i 12 mg/ml a następnie poddana krystalizacji w ośrodku EMBL w Hamburgu przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników firmy Qiagen. Uzyskaliśmy informacje, że białko krystalizuje w obecności chlorku sodu oraz PEGu 6000.

Optymalizacja uzyskanych warunków pozwoliła nam otrzymać kryształy nadające się do pomiarów dyfrakcyjnych oraz prób nasączenia kryształów ligandami (Rysunek 31).



Rysunek 31. Warunki i wyniki optymalizacji krystalizacji FBPazy bez AMP

5.2.3. Krystalizacja mutantu E69Q FBPazy wolnego od AMP

Poszukiwanie warunków krystalizacji mutantu E69Q bez AMP prowadził dr Robert Kołodziejczyk. Białko zostało również poddane wysoko przepustowej krystalizacji w ośrodku EMBL w Hamburgu przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników firmy Qiagen. Uzyskane wyniki były identyczne z wynikami dla białka natywnego. W wyniku optymalizacji uzyskanych warunków otrzymano kryształy o morfologii zbliżonej do kryształów białka natywnego.

5.3. POMIARY DYFRAKCYJNE, ROZWIĄZYWANIE I UDOKŁADNIANIE STRUKTUR

5.3.1. Białko natywne w kompleksie z AMP

Pierwsze dane dyfrakcyjne zarejestrowałem dla kryształu otrzymanego z optymalizacji wstępnych warunków krystalizacji natywnej FBPazy z AMP (WT_T_AMP). Przed pomiarem dyfrakcyjnym kryształ przenieśliem do roztworu rezerwuarowego zawierającego dodatkowo 30% (v/v) glicerolu jako krioprotektanta. Po kilku sekundach nasączenia kryształ zamroziłem w strumieniu gazowego azotu. Pomiar prowadziłem na linii pomiarowej 14.2 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,827 \text{ \AA}$ i kwadratowego detektora CCD Rayonix MX-225. Zbiór danych składał się z 480 obrazów zarejestrowanych z oscylacją $0,25^\circ$.

Odległość kryształu od detektora wynosiła 220 mm. Dane wywskaźnikowałem i zintegrowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug, 2012]. W trakcie procesowania danych ustalałem granice rozdzielczości tak, by parametry takie jak kompletność danych, stosunek sygnału do szumu $\langle I/\sigma(I) \rangle$ oraz wskaźnik rozbieżności R_{merge} były możliwie najlepsze. Otrzymany zbiór intensywności refleksów przekształciłem za pomocą programu XDSCONV. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 17. Ze zbioru wszystkich refleksów wyodrębniłem podzbiór refleksów testowych, który wykorzystywałem później podczas udokładniania do obliczania wskaźnika rozbieżności R_{free} .

Analiza komórki elementarnej kryształu na podstawie współczynnika Matthews'a (V_M) [Matthews, 1968] wykazała obecność czterech podjednostek w części asymetrycznej. Kryształy WT_T_AMP zachowały parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej kryształu FBPazy ze zmutowaną resztą 69 [Zarzycki et al., 2011]. Strukturę FBPazy z AMP rozwiązałem metodą podstawienia cząsteczkowego za pomocą programu PHASER z pakietu CCP4. Jako model posłużył łańcuch A ze struktury mutantu E69Q FBPazy (PDB:3IFA).

Tabela 17. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla natywnego kryształu FBPazy w kompleksie z AMP. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	WT_T_AMP
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	C222
parametry komórki elementarnej [Å]	a=218,61; b=234,73; c=71.61
zakres rozdzielczości [Å]	45,39-1,84 (1,96-1,84)
liczba zarejestrowanych refleksów	789342 (122588)
liczba niezależnych refleksów	156646 (24638)
krotność obserwacji	5,04 (4,98)
kompletność zbioru refleksów [%]	99,2 (97,4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19,43 (2,99)
R_{merge} [%]	5,5 (69,3)

Udokładnianie struktury WT_T_AMP rozpocząłem od usunięcia kilku nieprawidłowo wbudowanych reszt i wbudowania czterech cząsteczek AMP wyraźnie widocznych w dodatniej gęstości na mapie różnicowej F_o-F_c . Udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS [Winn et al., 2001] wyznaczonych przez serwer TLSMD (Painter i Merrit, 2006). Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru.

Po kilkunastu cyklach udokładniania jakość map wyraźnie się poprawiła. Rejony budzące wątpliwości przebudowałem, a reszty nieposiadające gęstości usunąłem z modelu. Postęp udokładniania oceniałem na podstawie wskaźników R i R_{free} oraz wartości średnich kwadratowych odchyień od wartości standardowych dla długości wiązań i kątów walencyjnych. Dodatkowo kontrolowałem wartości czynników temperaturowych oraz rozkład kątów torsyjnych łańcucha głównego na wykresie Ramachandrana. Dane z udokładniania struktury przedstawia Tabela 18. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 32.

Tabela 18. Charakterystyka udokładniania struktury WT_T_AMP.

	WT_T_AMP
liczba refleksów w zbiorze roboczym	155565
liczba refleksów w zbiorze testowym	1081
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	3,06
procent rozpuszczalnika (%)	59,9
liczba grup TLS [łańcuch A/B/C/D]	16 [4/4/4/4]
liczba atomów (bez H)	
białko	9709
ligand	92
woda	664
R/R_{free} (%)	16,84 / 19,21
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,020
kąty walencyjne (°)	1,72
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	97,9
konformacja dozwolona	2,1
Kod PDB	5ET6

	10	20	30	40	50	60	70	
FBP2	TDRSPFETDM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSVNVVTGDEV	
5ET6_A	-----TDM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSV-----V	
5ET6_B	-----DM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSV-----	
5ET6_C	-----DM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSV-----	
5ET6_D	-----DM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSV-----	
	80	90	100	110	120	130	140	
FBP2	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR	
5ET6_A	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR	
5ET6_B	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR	
5ET6_C	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR	
5ET6_D	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR	
	150	160	170	180	190	200	210	
FBP2	KTSED	EPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET6_A	KT---	EPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET6_B	KT---	EPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET6_C	K---	EPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET6_D	K---	EPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
	220	230	240	250	260	270	280	
FBP2	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE	
5ET6_A	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE	
5ET6_B	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE	
5ET6_C	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE	
5ET6_D	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE	
	290	300	310	320	330			
FBP2	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDPKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKNQAGS		
5ET6_A	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDPKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKNQA--		
5ET6_B	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDPKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKNQ---		
5ET6_C	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDPKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKN----		
5ET6_D	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDPKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKN-----		

Rysunek 32. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostek (A,B,C,D) struktury WT_T_AMP (PDB: 5ET6). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.2. Białko natywne po nasączeniu jonami magnezu

Kryształy FBPazy w kompleksie z AMP (WT_T_AMP) wykorzystałem do uzyskania struktury enzymu bez nukleotydu. Wybrałem metodę wymywania ligandu z kryształu za pomocą przepłukiwania. Zastosowanie roztworów pozbawionych AMP nie dawało zamierzonego rezultatu. Do usunięcia AMP z kryształu wykorzystałem roztwór chlorku magnezu. W tym celu roztwór krioprotektanta wzbogaciłem o 0,02 mM MgCl₂. Okazało się, że nasączenie takim roztworem trwające powyżej 10 sekund powodowało zniszczenie kryształu. Z drugiej strony próby prowadzone bez użycia jonów magnezu pokazywały, że kryształ może być moczony bardzo długo w roztworze krioprotektanta bez utraty jakości dyfrakcji. Dlatego w kolejnych próbach kryształ umieściłem w roztworze krioprotektanta wzbogaconego jonami Mg²⁺ tylko na ok. 2 sekundy; tyle czasu zajmowało mi włożenie pętli z kryształem do kropli, wyjęcie jej i umieszczenie w strumieniu par

ciekłego azotu. Pomiary dyfrakcyjne prowadziłem na linii 14.2 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali 0,918 Å i kwadratowego detektora CCD Rayonix MX-225. Zbiór danych składał się z 295 obrazów zarejestrowanych z oscylacją 1°. Odległość kryształu od detektora wynosiła 280 mm. Dane wywskaźnikowałem i zintegrowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012]. W trakcie procesowania danych ustalałem granice rozdzielczości tak, by kompletność danych oraz stosunek sygnału do szumu $\langle I/\sigma(I) \rangle$ były możliwie najlepsze. Otrzymany zbiór intensywności refleksów przekształciłem za pomocą programu XDSCONV. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 19. Ze zbioru wszystkich refleksów wyodrębniłem podzbiór refleksów testowych, który wykorzystywałem później podczas udokładniania do obliczania wskaźnika rozbieżności R_{free} .

Kryształ zachował parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej WT_T_AMP. Skład komórki również pozostał bez zmian tj. zawierała ona cztery podjednostki w części asymetrycznej. Strukturę WT_T_0 rozwiązałem metodą podstawienia cząsteczkowego za pomocą programu PHASER z pakietu CCP4. Jako model posłużył łańcuch A ze struktury WT_T_AMP.

Tabela 19. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla natywnego kryształu FBPazy nasączonego jonami magnezu. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	WT_T_0
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	C222
parametry komórki elementarnej [Å]	a=218,48; b=234,77; c=71,85
zakres rozdzielczości [Å]	45,46-2,99 (3,17-2,99)
liczba zarejestrowanych refleksów	461483 (70249)
liczba niezależnych refleksów	37760 (5852)
krotność obserwacji	12,22 (12,01)
kompletność zbioru refleksów [%]	99,40 (97,40)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	24,20 (4,03)
R_{merge} [%]	12,0 (82,3)

Udokładnianie struktury WT_T_0 rozpocząłem od usunięcia reszt aminokwasowych, których gęstość elektronowa zniknęła w wyniku zmian, jakie nastąpiły w kryształach w efekcie nasączenia. Analizując mapy gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ i F_o-F_c , nie znalazłem dodatkowej gęstości dla cząsteczek AMP. Udokładnianie prowadziłem z

zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez serwer TLSMD (Painter i Merrit, 2006). Do modelu WT_T_0 nie dodałem cząsteczek wody z powodu niskiej rozdzielczości. Natomiast do obliczania Fc włączyłem atomy wodoru. Postęp udokładniania oceniałem na podstawie oceny wskaźników R i R_{free} oraz wartości średnich kwadratowych odchyłeń od wartości standardowych dla długości wiązań i kątów walencyjnych. Kilka cykli udokładniania nieznacznie poprawiło wygląd map gęstości elektronowej, jednak niska rozdzielczość danych nie pozwoliła na lepsze udokładnienie struktury. Statystykę udokładniania przedstawia Tabela 20. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 33.

Tabela 20. Charakterystyka udokładniania struktury WT_T_0.

	WT_T_0
liczba refleksów w zbiorze roboczym	36769
liczba refleksów w zbiorze testowym	1000
współczynnik Matthews'a ($\text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$)	3,62
procent rozpuszczalnika (%)	66,00
liczba grup TLS [łańcuch A/B/C/D]	16 [4/4/4/4]
liczba atomów (bez H)	
białko	8589
ligand	-
woda	-
R/R_{free} (%)	17,70 / 24,43
RMSD	
długości wiązań (\AA)	0,015
kąty walencyjne ($^\circ$)	1,77
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	92,3
konformacja dozwolona	6,6
Kod PDB	5ET7

	10	20	30	40	50	60	70
FBP2
5ET7_A	TDRSPFETDM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLHYGIA	GSVNVVTGDEV
5ET7_B	-----	LTLTRYV---	-----EL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	-----	-----
5ET7_C	-----	LTLTRYV---	-----EL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	-----	-----
5ET7_D	-----	LTLTRYV---	-----EL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	-----	-----
	80	90	100	110	120	130	140
FBP2
5ET7_A	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	DCSSNIDCI	A SIGTIFAIYR
5ET7_B	-KLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	DC-----A	SIGTIFAIYR
5ET7_C	-KLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAK---	GKYVVCFDPL	DC-----A	SIGTIFAIYR
5ET7_D	-KLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	DC-----A	SIGTIFAIYR
	150	160	170	180	190	200	210
FBP2
5ET7_A	KTSEDEPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET7_B	K-----PSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET7_C	K-----PSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET7_D	K-----EK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
	220	230	240	250	260	270	280
FBP2
5ET7_A	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVIYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
5ET7_B	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVIYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
5ET7_C	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVIYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
5ET7_D	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVIYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
	290	300	310	320	330		
FBP2
5ET7_A	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKNQAGS	
5ET7_B	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKNQA--	
5ET7_C	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKNQ---	
5ET7_D	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLVDKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEY LTC	VQKN----	

Rysunek 33. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostek (A,B,C,D) struktury WT_T_0 (PDB: 5ET7). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.3. Białko natywne wolne od AMP

Kryształy FBPazy wolnej od AMP (WT_R_0) zostały zamrożone przy użyciu 20% (v/v) roztworu glicerolu dla krioprotekcji. Dane dyfrakcyjne zostały zmierzone na linii pomiarowej 14.1 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,918 \text{ \AA}$ i kwadratowego detektora CCD Rayonix MX-225. Zbiór danych składał się z 811 obrazów zarejestrowanych z oscylacją $0,2^\circ$. Odległość kryształu od detektora wynosiła 170 mm. Dane wywskaźnikowałem i zintegrowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012]. Ponieważ kryształ rozpraszał promieniowanie rentgenowskie z wysoką rozdzielczością, w trakcie procesowania danych ustalałem granice rozdzielczości tak, by stosunek sygnału do szumu $\langle I/\sigma(I) \rangle$ były bliskie 2 przy zachowaniu wysokiej kompletności całego zbioru. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 21.

Tabela 21. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształów FBPazy bez AMP nienasączanych. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	WT_R_0
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	$I4_122$
parametry komórki elementarnej [Å]	a=72,57; c=235,35
zakres rozdzielczości [Å]	36,28-1,67 (1,77-1,67)
liczba zarejestrowanych refleksów	482798 (77295)
liczba niezależnych refleksów	37062 (5864)
krotność obserwacji	13,03 (13,18)
kompletność zbioru refleksów [%]	99,80 (99,40)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	29,89 (3,08)
$R_{\text{merge}}[\%]$	5,2 (89,8)

Analiza zawartości komórki elementarnej kryształu na podstawie współczynnika Matthews'a (V_M) [Matthews, 1968] wykazała obecność jednej podjednostki w części asymetrycznej. Strukturę WT_R_0 rozwiązałem metodą podstawienia cząsteczkowego za pomocą programu PHASER [McCoy et al., 2007] z pakietu CCP4. Jako model posłużył łańcuch A ze struktury WT_T_AMP.

Udokładnianie struktury rozpocząłem od przebudowy końca N podjednostki, opierając się na mapach gęstości elektronowej $2F_o-F_c$ i F_o-F_c . W tym celu usunąłem niepoprawny fragment na końcu N pomiędzy Glu8 a Leu30. Po przeliczeniu map OMIT pojawiła się dodatnia gęstość na mapie różnicowej F_o-F_c , która umożliwiła wbudowanie fragmentu łańcucha od Glu8 do Glu19. Ponadto, w trzech miejscach mapy gęstości elektronowej wskazywały na nieporządek lub całkowicie brakowało w nich gęstości. Udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez serwer TLSMD (Painter i Merrit, 2006). Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru. Po kilkunastu cyklach udokładniania jakość map wyraźnie się poprawiła. Postęp udokładniania oceniałem na podstawie wskaźników R i R_{free} oraz wartości rmsd dla długości wiązań i kątów walencyjnych. Kontrolowałem również wartości czynników temperaturowych oraz rozkład kątów torsyjnych łańcucha głównego na wykresie Ramachandrana. Statystyki udokładniania przedstawia Tabela 22. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 34.

Tabela 22. Charakterystyka udokładniania struktury WT_R_0.

	WT_R_0
liczba refleksów w zbiorze roboczym	36061
liczba refleksów w zbiorze testowym	1001
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,07
procent rozpuszczalnika (%)	40,5
liczba grup TLS	6
liczba atomów (bez H)	
białko	2180
ligand	-
woda	133
R/R_{free} (%)	19,33 / 21,96
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,019
kąty walencyjne (°)	1,79
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	97,8
konformacja dozwolona	2,2
Kod PDB	5ET5

	10	20	30	40	50	60	70
FBP2	TDRSPFETDM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSVNVVTGDEV
5ET5	-----TDM	LTLTRYVME	-----EL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	A-----	-----V
	80	90	100	110	120	130	140
FBP2	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR
5ET5	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	DG-----	SIGTIFAIYR
	150	160	170	180	190	200	210
FBP2	KTSEDEPSEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5ET5	-----SEK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
	220	230	240	250	260	270	280
FBP2	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYV GSMVA	DVHRTL VYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
5ET5	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYV GSMVA	DVHRTL VYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
	290	300	310	320	330		
FBP2	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVL DVKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEYLTC	VQKNQAGS	
5ET5	CNPVAYIIIEQ	AGGLATTGTQ	PVL DVKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEYLTC	V-----	

Rysunek 34. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostki A struktury WT_R_0 (PDB: 5ET5). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.4. Białko natywne wolne od AMP nasączone produktem F6P

Kryształy FBPazy wolnej od AMP jeszcze w kropli krystalizacyjnej zostały nasączone 5 mM roztworem produktu reakcji katalizowanej przez FBPazy, fruktozo-6-fosforanem. By zapobiec ewentualnej zmianie konformacji pętli katalitycznej, roztwór do nasączania wzbogacono o jony wapnia (100 mM CaCl₂). Uzyskane kryształy (WT_R_F6P) zostały zamrożone, dla krioprotekcji użyto 20% (v/v) roztworu glicerolu. Dane dyfrakcyjne zostały zmierzone na linii pomiarowej 14.1 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,918 \text{ \AA}$ i kwadratowego detektora CCD Rayonix MX-225. Zbiór danych składał się z 480 obrazów zarejestrowanych z oscylacją $0,25^\circ$. Odległość kryształu od detektora wynosiła 200 mm. Dane wyśkaźnikowałem i zintegrowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012] a otrzymany w efekcie skalowania zbiór intensywności refleksów przekształciłem za pomocą programu XDSCONV. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 23. Na koniec wyodrębniłem podzbiór refleksów testowych, który wykorzystywałem podczas udokładniania do obliczania wskaźnika rozbieżności R_{free} .

Kryształ zachował parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej kryształu WT_R_0. Skład komórki również pozostał bez zmian, tj. zawierała ona jedną podjednostkę w części asymetrycznej. Punktem startowym udokładniania uzyskanych danych był model WT_R_0.

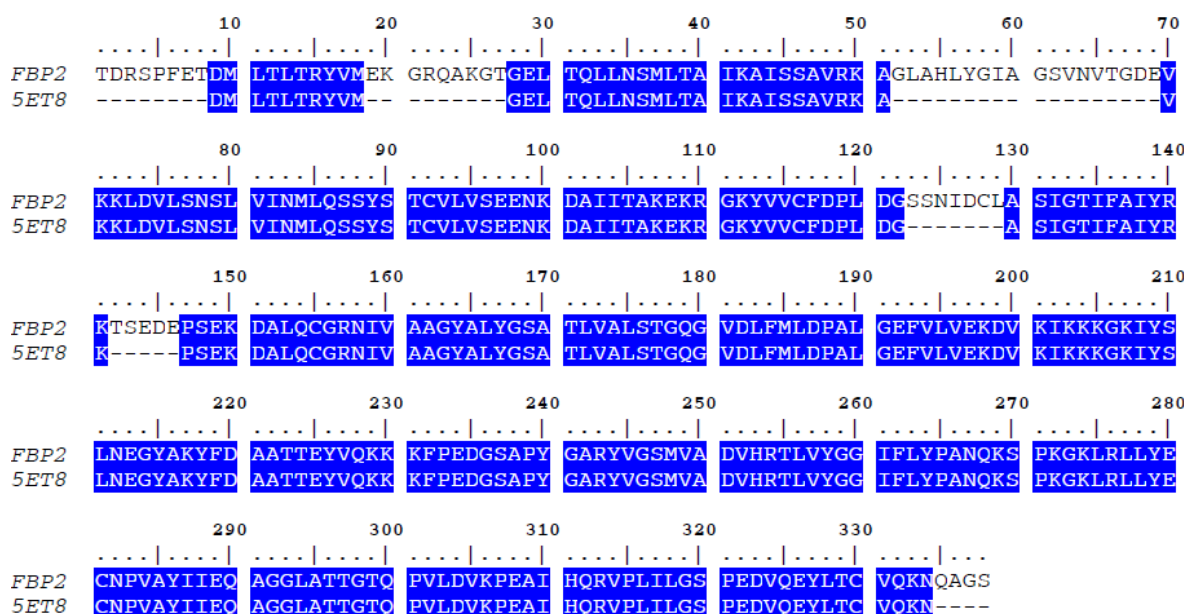
Tabela 23. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształu FBPazy bez AMP nasączonego produktem. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	WT_R_F6P
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	$I4_122$
parametry komórki elementarnej [\AA]	$a=72,11$; $c=232,00$
zakres rozdzielczości [\AA]	46,68-1,92 (2,04-1,92)
liczba zarejestrowanych refleksów	229018 (36781)
liczba niezależnych refleksów	23929 (3769)
krotność obserwacji	9,57 (9,76)
kompletność zbioru refleksów [%]	99,8 (99,4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19,05 (2,57)
R_{merge} [%]	7,6 (89,6)

Na podstawie mapy różnicowej gęstości elektronowej F_o-F_c zidentyfikowałem w miejscu aktywnym enzymu fruktozo-6-fosforan. Poza tym nie wykryłem w nowej strukturze innych większych zmian w porównaniu z „pustą” strukturą FBPazy (WT_R_0). Dalsze udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez serwer TLSMD (Painter i Merrit, 2006). Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru. Po kilkunastu cyklach udokładniania jakość map była zadowalająca. Statystykę udokładniania przedstawia Tabela 24. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 35.

Tabela 24. Charakterystyka udokładniania struktury WT_R_F6P.

	WT_R_F6P
liczba refleksów w zbiorze roboczym	22900
liczba refleksów w zbiorze testowym	1028
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,06
procent rozpuszczalnika (%)	40,28
liczba grup TLS	4
liczba atomów (bez H)	
białko	2225
ligand	16
woda	94
R/R_{free} (%)	17,96 / 22,33
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,018
kąty walencyjne (°)	1,71
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	98,2
konformacja dozwolona	1,8
Kod PDB	5ET8



Rysunek 35. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostki A struktury WT_R_F6P (PDB: 5ET8). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.5. Białko natywne wolne od AMP nasączone substratem F-1,6-BP

Aby ustalić strukturę FBPazy z substratem reakcji, kryształy WT_R_0, jeszcze w kropli krystalizacyjnej, nasączone były 10 mM roztworem substratu, fruktozo-1,6-bisfosforanu. Z uwagi na obecność w roztworze krystalizacyjnym jonów magnezu, aby zapobiec defosforylacji substratu, roztwór do nasączenia wzbogacono dodatkowo o jony wapnia (100 mM CaCl₂). Uzyskane kryształy (WT_R_F16BP) zostały zamrożone, dla krioprotekcji użyto 20% (v/v) roztworu glicerolu. Dane dyfrakcyjne zostały zmierzone na linii pomiarowej 14.3 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,894 \text{ \AA}$ i okrągłego detektora CCD Rayonix SX-165. Dane dyfrakcyjne zarejestrowałem z rozdzielczością 2,20 \AA . Zbiór danych składał się z 400 obrazów zarejestrowanych z oscylacją 0,3°. Odległość kryształu od detektora wynosiła 180 mm. Dane analizowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012]. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 25.

Kryształ zachował parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej kryształów WT_R_0 oraz WT_R_F6P. Skład komórki również pozostał bez zmian tj. zawierała ona jedną podjednostkę w części asymetrycznej. Punktem startowym udokładniania uzyskanych danych był model WT_R_0.

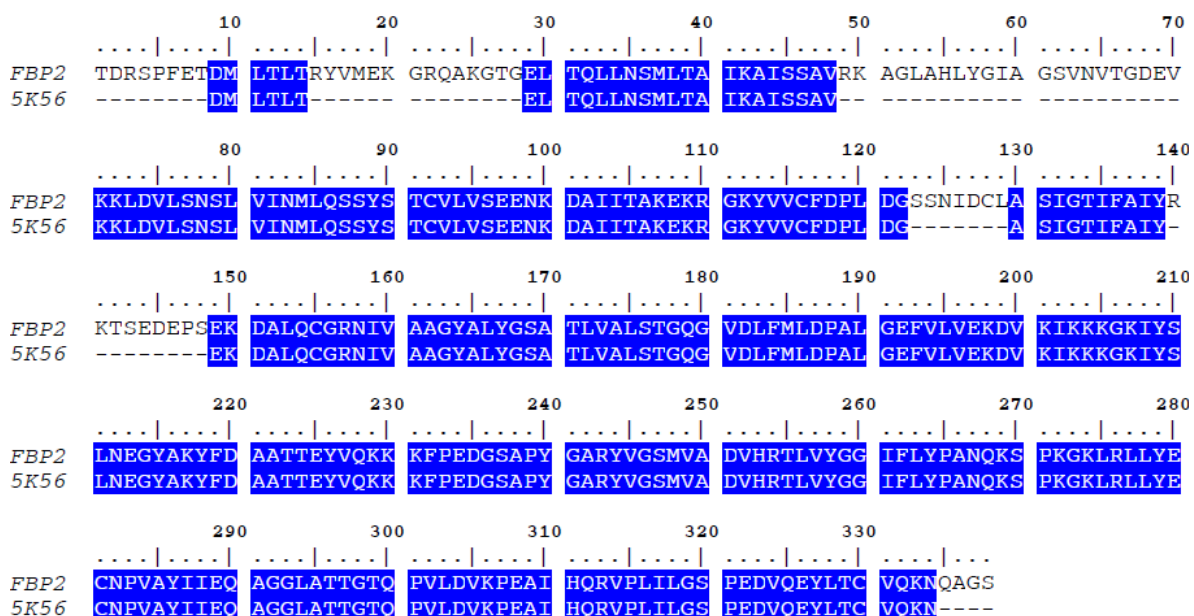
Tabela 25. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształu FBPazy bez AMP nasączonej substratem. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	WT_R_F16BP
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	$I4_122$
parametry komórki elementarnej [Å]	a=72,58; c=232,44
zakres rozdzielczości [Å]	34,64-2,19 (2,33-2,19)
liczba zarejestrowanych refleksów	155047 (23369)
liczba niezależnych refleksów	16183 (2466)
krotność obserwacji	9,58 (9,48)
kompletność zbioru refleksów [%]	98,8 (95,4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	28,03 (3,55)
R_{merge} [%]	6,6 (74, 8)

Na podstawie różnicowej mapy gęstości elektronowej F_o-F_c zidentyfikowałem w miejscu aktywnym enzymu fruktozo-1,6-bisfosforan w konfiguracji β . Poza tym nie wykryłem w tej strukturze innych większych zmian w porównaniu z poprzednimi strukturami FBPazy (WT_R_0; WT_R_F6P). Dalsze udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez serwer TLSMD (Painter i Merrit, 2006). Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru jako tzw. riding model. Zgodnie z zaleceniami autorów programu Phenix dodałem atomy wodoru również do modelu za pomocą automatycznej funkcji programu phenix.refine. Wszystkie pozycje atomów wodoru w wiązaniu X-H zostały przypisane na podstawie idealnej geometrii i podczas udokładniania były przeliczane na podstawie aktualnej pozycji atomu X. Dodatkowo obsadzenie oraz czynniki temperaturowe atomów wodoru pozostawały ściśle związane z atomem X. Dodatek atomów wodoru spowodował nieznaczne polepszenie parametrów R i R_{free} oraz w istotny sposób pomógł zredukować liczbę bliskich kontaktów H...H i obniżyć wartość parametru kolizji (ang. clashscore). Po kilkunastu cyklach udokładniania jakość map gęstości elektronowej była zadowalająca. Statystykę udokładniania struktury przedstawia Tabela 26. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 36.

Tabela 26. Charakterystyka udokładniania struktury WT_R_F16BP.

	WT_R_F16BP
liczba refleksów w zbiorze roboczym	15140
liczba refleksów w zbiorze testowym	1043
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,4
procent rozpuszczalnika (%)	48,86
liczba grup TLS	7
liczba atomów (bez H)	
białko	2108
ligand	20
woda	25
R/R _{free} (%)	20,50 / 27,98
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,009
kąty walencyjne (°)	1,14
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	97,7
konformacja dozwolona	2,3
Kod PDB	5K56



Rysunek 36. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostki A struktury WT_R_F16BP (PDB: 5K56). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.6. Mutant E69Q wolny od AMP

Kryształy mutantu E69Q FBPazy wolnego od AMP (EQ_R_0) zostały zamrożone, dla krioprotekcji użyto 20% (v/v) roztworu glicerolu. Dane dyfrakcyjne zostały zmierzone na linii pomiarowej 14.1 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,91841 \text{ \AA}$ i kwadratowego detektora CCD Rayonix MX-225. Dane dyfrakcyjne zarejestrowano z rozdzielczością $1,72 \text{ \AA}$. Zbiór danych składał się z 600 obrazów zarejestrowanych z oscylacją $0,2^\circ$. Odległość kryształu od detektora wynosiła 198 mm. Dane analizowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012]. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 27.

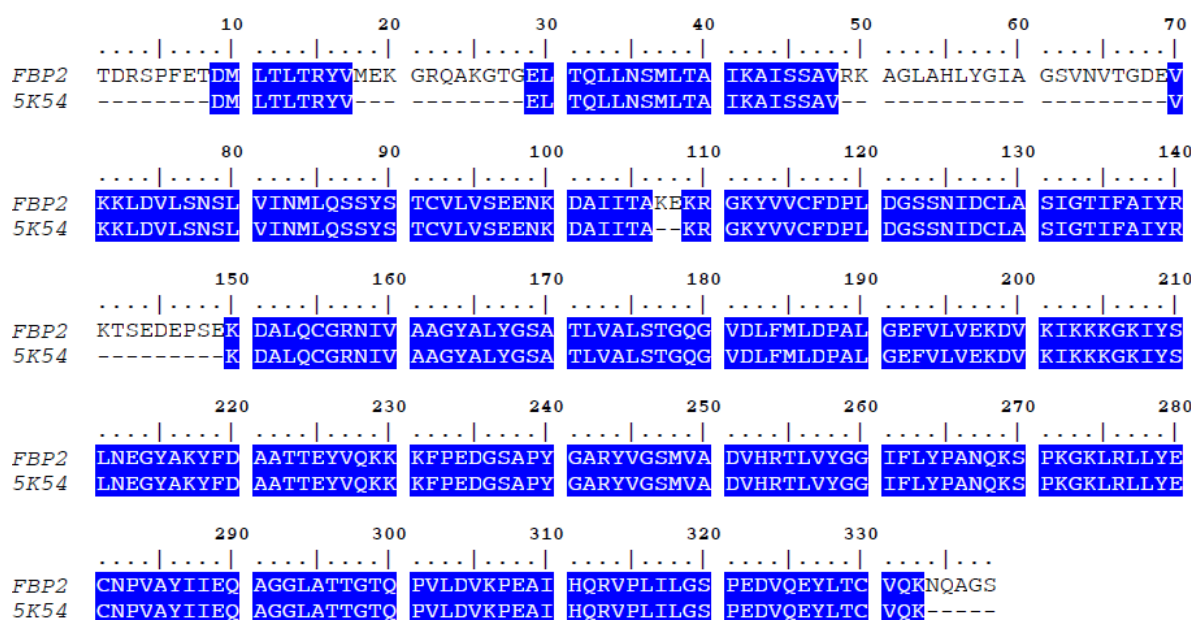
Tabela 27. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształów mutantu E69Q FBPazy bez AMP nienasączanych. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	EQ_R_0
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	$I4_122$
parametry komórki elementarnej [\AA]	$a=72,15$; $c=235,06$
zakres rozdzielczości [\AA]	34,48-1,72 (1,82-1,72)
liczba zarejestrowanych refleksów	308771 (36394)
liczba niezależnych refleksów	33575 (5197)
krotność obserwacji	9,20 (7,00)
kompletność zbioru refleksów [%]	99,5 (97,1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	23,67 (2,25)
R_{merge} [%]	5,5 (79,3)

Kryształ zachował parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej kryształu natywnej FBPazy WT_R_0. W części asymetrycznej znajduje się pojedyncza podjednostka. Punktem startowym udokładniania uzyskanych danych był model WT_R_0. Poza nieznacznymi różnicami w jakości map gęstości elektronowej struktura mutantu nie różniła się od struktury natywnej WT_R_0. Pozycja 69 nie posiadała gęstości elektronowej, dlatego reszta ta nie została uwzględniona w modelu. Udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez program TLSMD [Painter i Merrit, 2006]. Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru jako tzw. riding model. Dodatkowo do modelu białka dodałem atomy wodoru. Po kilkunastu cyklach zakończyłem udokładnianie. Statystykę udokładniania struktury przedstawia Tabela 28. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej obrazuje Rysunek 37.

Tabela 28. Charakterystyka udokładniania struktury EQ_R_0.

	EQ_R_0
liczba refleksów w zbiorze roboczym	32575
liczba refleksów w zbiorze testowym	1000
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,09
procent rozpuszczalnika (%)	41,1
liczba grup TLS	3
liczba atomów (bez H)	
białko	2165
ligand	-
woda	59
R/R _{free} (%)	21,38 / 24,90
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,019
kąty walencyjne (°)	1,68
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	97,1
konformacja dozwolona	2,9
Kod PDB	5K54



Rysunek 37. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostki A struktury EQ_R_0 (PDB: 5K54). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.7. Mutant E69Q wolny od AMP nasączany produktem F6P

Kryształy mutantu E69Q FBPazy (EQ_R_0), podobnie jak kryształy natywnego białka, jeszcze w kropli krystalizacyjnej zostały nasączone 5 mM roztworem produktu reakcji katalizowanej przez FBPaze, fruktozo-6-fosforanu. Aby zapobiec ewentualnej zmianie konformacji pętli katalitycznej, roztwór do nasączania wzbogacono o jony wapnia (100 mM CaCl₂). Uzyskane kryształy (EQ_R_F6P) zostały zamrożone, dla krioprotekcji użyto 20% (v/v) roztworu glicerolu. Dane dyfrakcyjne zostały zmierzone na linii pomiarowej 14.1 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,91841\text{\AA}$ i kwadratowego detektora CCD Rayonix MX-225. Dane dyfrakcyjne zarejestrowano z rozdzielczością 1,98 Å. Zbiór danych składał się z 240 obrazów zarejestrowanych z oscylacją 0,5°. Odległość kryształu od detektora wynosiła 198 mm. Dane analizowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012]. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 29.

Tabela 29. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształów mutantu E69Q FBPazy bez AMP, nasączanego produktem. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

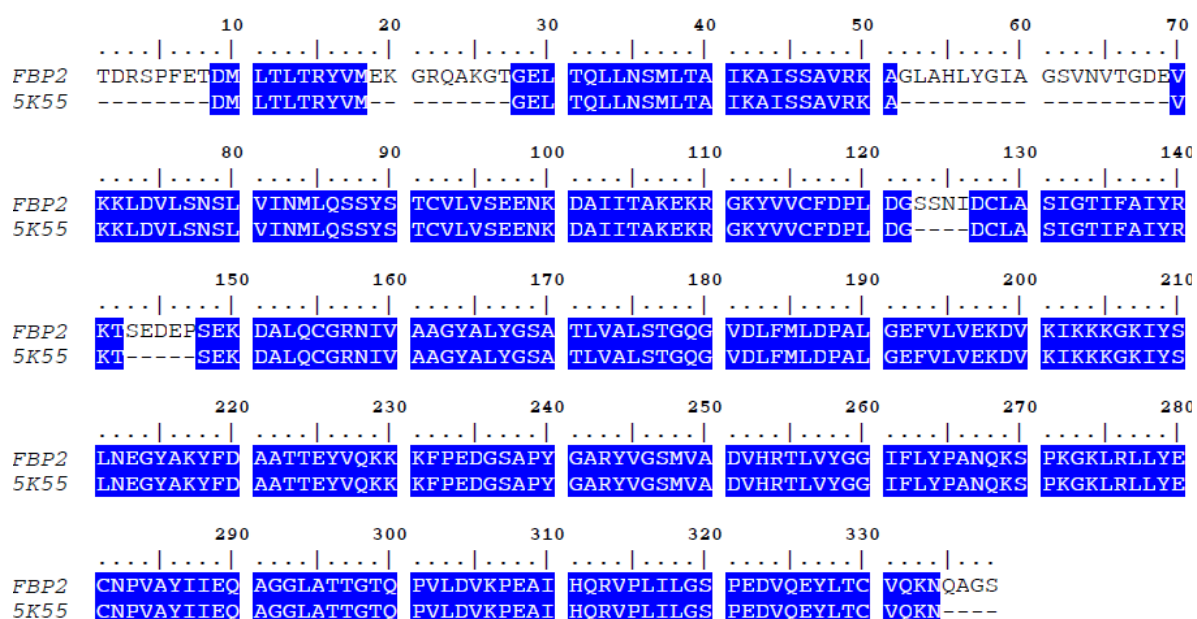
	EQ_R_F6P
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	I4 ₁ 22
parametry komórki elementarnej [Å]	a=72,15; c=235,06
zakres rozdzielczości [Å]	32,03-1,98 (2,10-1,98)
liczba zarejestrowanych refleksów	210365 (33127)
liczba niezależnych refleksów	22004 (3449)
krotność obserwacji	9,56 (9,61)
kompletność zbioru refleksów [%]	99,9 (99,5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	22,79 (3,15)
R _{merge} [%]	7,6 (76,1)

Kryształ zachował parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej kryształu natywnej FBPazy EQ_R_0. W części asymetrycznej znajduje się pojedyncza podjednostka. Punktem startowym udokładniania uzyskanych danych był model EQ_R_0. Poza nieznacznymi różnicami w jakości map gęstości elektronowej struktura mutantu nie różniła się od struktury natywnej EQ_R_0. Pozycja 69 nie posiadała gęstości elektronowej, dlatego reszta ta nie została uwzględniona w modelu. Udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez program TLSMD

(Painter i Merrit, 2006). Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru jako tzw. riding model. Dodatkowo do modelu białka dodałem atomy wodoru. Po kilkunastu cyklach zakończyłem udokładnianie. Statystykę udokładniania struktury przedstawia Tabela 30. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 38.

Tabela 30. Charakterystyka udokładniania struktury EQ_R_F6P.

	EQ_R_F6P
liczba refleksów w zbiorze roboczym	21004
liczba refleksów w zbiorze testowym	1000
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,06
procent rozpuszczalnika (%)	40,39
liczba grup TLS	2
liczba atomów (bez H)	
białko	2223
ligand	16
woda	61
R/R_{free} (%)	18,53 / 23,49
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,017
kąty walencyjne (°)	1,62
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	97,5
konformacja dozwolona	2,5
Kod PDB	5K55



Rysunek 38. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostki A struktury EQ_R_F6P (PDB: 5K55). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

5.3.8. Mutant E69Q wolny od AMP nasączany substratem F-1,6-BP

Aby ustalić strukturę mutantu E69Q FBPazy z substratem reakcji, kryształy EQ_R_0, jeszcze w kropli krystalizacyjnej, nasączone były 10 mM roztworem substratu, fruktozo-1,6-bisfosforanu. Z uwagi na obecność w roztworze krystalizacyjnym jonów magnezu, by zapobiec defosforylacji substratu, roztwór do nasączania wzbogacono dodatkowo o jony wapnia (100 mM CaCl₂). Uzyskane kryształy (EQ_R_F16BP) zostały zamrożone, dla krioprotekcji użyto 20% (v/v) roztworu glicerolu. Dane dyfrakcyjne zostały zmierzone na linii pomiarowej 14.3 z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego o długości fali $\lambda=0,894 \text{ \AA}$ i okrągłego detektora CCD Rayonix SX-165. Dane dyfrakcyjne zarejestrowałem z rozdzielczością 2,30 \AA . Zbiór danych składał się z 240 obrazów zarejestrowanych z oscylacją 0,5°. Odległość kryształu od detektora wynosiła 186 mm. Dane analizowałem za pomocą programu XDSAPP [Krug et al., 2012]. Charakterystykę zbioru danych przedstawia Tabela 31.

Tabela 31. Charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształów mutantu FBPazy bez AMP nasączonego produktem. Wartości w nawiasach odnoszą się do najwyższego zakresu rozdzielczości.

	EQ_R_F16BP
temperatura pomiaru [K]	100
grupa przestrzenna	$I4_122$
parametry komórki elementarnej [Å]	a=72,45; c=233,95
zakres rozdzielczości [Å]	31,03-2,30 (2,38-2,30)
liczba zarejestrowanych refleksów	210365 (33127)
liczba niezależnych refleksów	13945 (972)
krotność obserwacji	8,7 (5,7)
kompletność zbioru refleksów [%]	93,9 (69,5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	22,79 (3,15)
R_{merge} [%]	7,6 (62,2)

Kryształ zachował parametry identyczne z wymiarami komórki elementarnej kryształów EQ_R_0 oraz EQ_R_F6P. Skład komórki również pozostał bez zmian tj. zawierała ona jedną podjednostkę w części asymetrycznej. Punktem startowym udokładniania uzyskanych danych był model EQ_R_0.

Poza nieznacznymi różnicami w jakości map gęstości elektronowych struktura mutantu nie różniła się od struktury natywnej WT_R_0. Pozycja 69 w strukturze nie posiadała gęstości elektronowej, dlatego nie zachodziła konieczność mutacji tego miejsca w modelu. Udokładnianie prowadziłem z zastosowaniem parametrów TLS wyznaczonych przez program TLSMD (Painter i Merrit, 2006). Do obliczania F_c włączyłem atomy wodoru jako tzw. riding model. Dodatkowo do modelu białka dodałem atomy wodoru. Zakończyłem udokładnianie po kilkunastu cyklach. Statystykę udokładniania struktury przedstawia Tabela 32. Luki w modelu spowodowane brakiem gęstości elektronowej przedstawiłem na Rysunku 39.

Tabela 32. Charakterystyka udokładniania struktury EQ_R_F16BP.

	EQ_R_F16BP
liczba refleksów w zbiorze roboczym	13014
liczba refleksów w zbiorze testowym	931
współczynnik Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,31
procent rozpuszczalnika (%)	46,87
liczba grup TLS	3
liczba atomów (bez H)	
białko	2142
ligand	20
woda	12
R/R_{free} (%)	21,50 / 28,80
RMSD	
długości wiązań (Å)	0,009
kąty walencyjne (°)	1,22
statystyka wykresu Ramachandrana (%)	
konformacja uprzywilejowana	96,65
konformacja dozwolona	2,97
Kod PDB	5L0A

	10	20	30	40	50	60	70
FBP2	TDRSPFETDM	LTLTRYVMEK	GRQAKGTGEL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	AGLAHLYGIA	GSVNVVTGDEV
5L0A	-----DM	LTLTRY----	-----EL	TQLLNSMLTA	IKAISSAVRK	-----	-----
	80	90	100	110	120	130	140
FBP2	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	DGSSNIDCLA	SIGTIFAIYR
5L0A	KKLDVLSNSL	VINMLQSSYS	TCVLVSEENK	DAIITAKEKR	GKYVVCFDPL	D-----A	SIGTIFAIY-
	150	160	170	180	190	200	210
FBP2	KTSEDEPS EK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
5L0A	-----EK	DALQCGRNIV	AAGYALYGSA	TLVALSTGQG	VDLFMLDPAL	GEFVLVEKDV	KIKKKGKIYS
	220	230	240	250	260	270	280
FBP2	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
5L0A	LNEGYAKYFD	AATTEYVQKK	KFPEDGSAPY	GARYVGSMA	DVHRTLVEYGG	IFLYPANQKS	PKGKLRLLYE
	290	300	310	320	330		
FBP2	CNPVAYIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLDVKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEYLTC	VQKNQAGS	
5L0A	CNPVAYIIEQ	AGGLATTGTQ	PVLDVKPEAI	HQRVPLILGS	PEDVQEYLTC	VQKN----	

Rysunek 39. Porównanie sekwencji referencyjnej ludzkiej mięśniowej FBPazy (FBP2) z sekwencją aminokwasową podjednostki A struktury EQ_R_F16BP (PDB: 5L0A). Luki w sekwencji (-) oznaczają obszary o braku gęstości elektronowej.

6. DYSKUSJA WYNIKÓW

6.1. STRUKTURY KRystaliczne LUDZKIEJ MIĘŚNIOWEJ FBPAZY

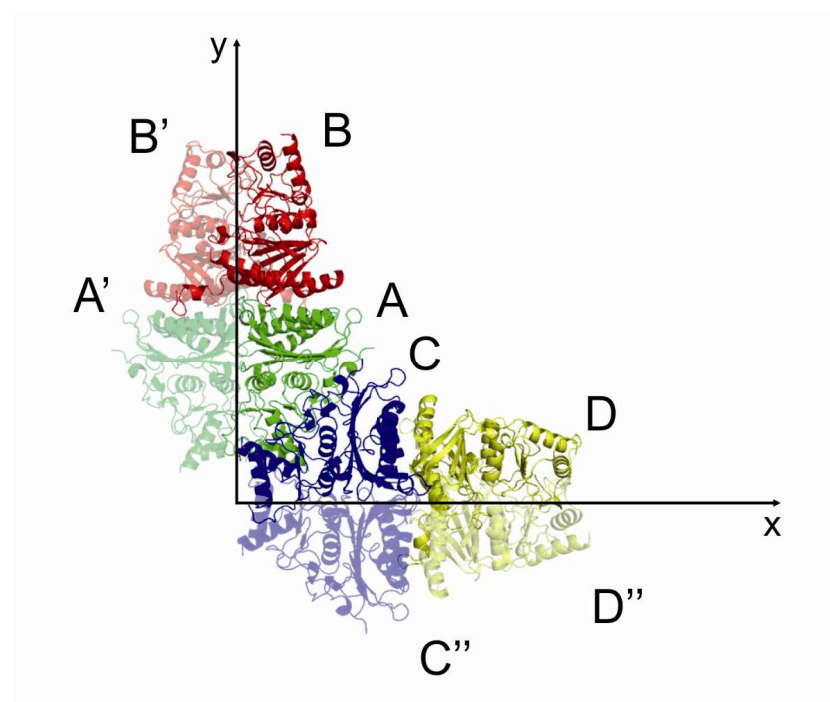
Zastosowanie procedury otrzymywania rekombinowanej ludzkiej mięśniowej FBPazy, opracowanej w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Zwierząt we Wrocławiu, pozwoliło mi otrzymać ok. 170 mg czystego białka z 3 litrów hodowli. Otrzymane białko zawierało AMP, dlatego przed rozpoczęciem prób krystalizacji musiałem je oczyścić poprzez sączenie molekularne w wysokim stężeniu jonów magnezu. Dodatkowo, wspólnie z dr Robertem Kołodziejczykiem uzyskałem kryształy natywnej FBPazy oraz mutanta E69Q. Zarejestrowanie obrazów dyfrakcyjnych otrzymanych kryształów pozwoliło mi rozwiązać osiem struktur krystalicznych FBPazy w różnych formach oraz z różnymi ligandami (Tabela 33). Dzięki tym wynikom mogłem przyrzeć się dokładnie budowie ludzkiej mięśniowej FBPazy.

Tabela 33. Zestawienie podstawowych parametrów charakteryzujących struktury ludzkiej mięśniowej FBPazy rozwiązane w ramach niniejszej pracy.

Struktury FBPazy	Kod PDB	Forma	Ligand	Inhibitor	Kąt κ [°]	Mutacja
WT_R_0	5ET5	R	-	-	-86	-
WT_R_F6P	5ET8	R	F-6-P	-	-86	-
WT_R_F16BP	5K56	R	F-1,6-BP	-	-86	-
WT_T_AMP	5ET6	T	-	AMP	+22	-
WT_T_0	5ET7	T	-	-	+22	-
EQ_R_0	5K54	R	-	-	-86	E69Q
EQ_R_F6P	5K55	R	F-6-P	-	-86	E69Q
EQ_R_F16BP	5L0A	R	F-1,6-BP	-	-86	E69Q

FBPaza w formie T krystalizowała w grupie przestrzennej C_{222} . Struktura jest izomorficzna z wcześniej opisaną strukturą mutanta E69Q ludzkiej FBPazy mięśniowej [Zarzycki et al., 2011]. W części asymetrycznej znajdują się cztery podjednostki połączone w dwie niezależne pary A-B, C-D. Każda para stanowi połowę oddzielnego tetrameru. Kompletny tetramer C1-C2-C3-C4 tworzy się z podjednostek A-B-B'-A' oraz

C-D-D''-C'' (Rysunek 40, Tabela 34) działaniem różnych osi dwukrotnych w tej samej grupie przestrzennej.



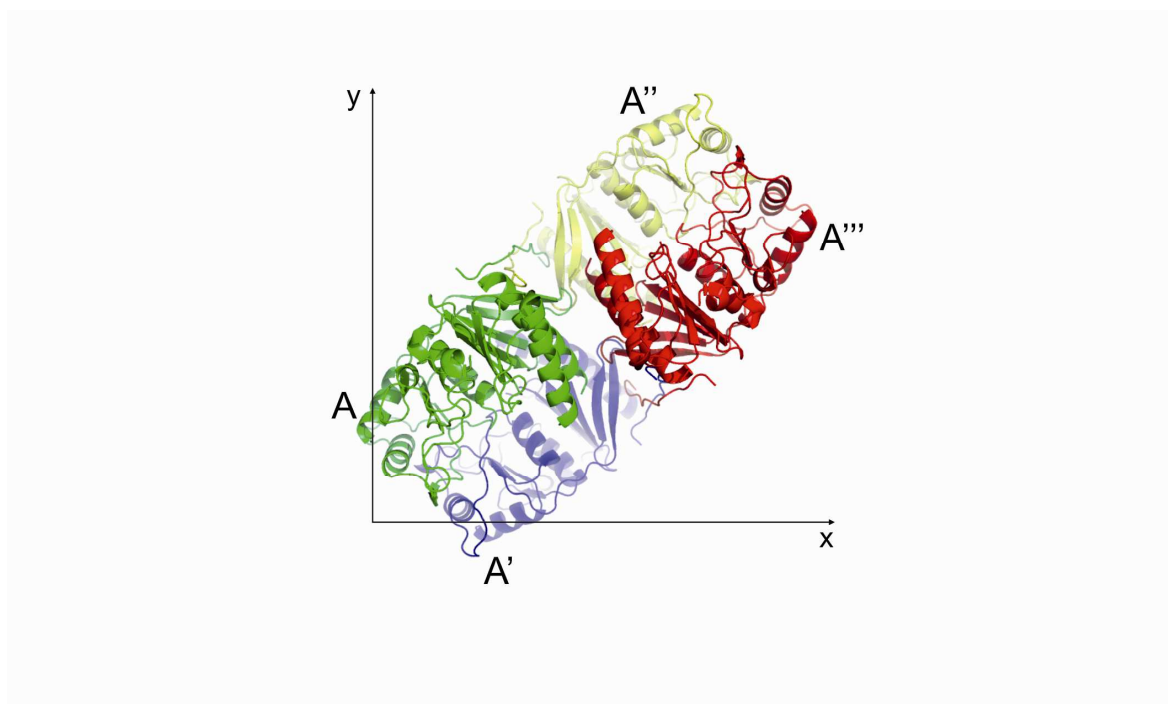
Rysunek 40. Tworzenie dwóch tetramerów FBPazy przez operacje symetrii w rombowej grupie przestrzennej $C222$. Widok wzdłuż osi z.

Tabela 34. Opis generowania podjednostek symetrycznych tworzących dwa niezależne tetramery w grupie przestrzennej $C222$.

Podjednostka	Operacja symetrii
A'	$(-x, y, -z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do $[010]$
B'	$(-x, y, -z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do $[010]$
C''	$(x, -y, 1-z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do $[100]$
D''	$(x, -y, 1-z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do $[100]$

Enzym natywny jak i mutant w formie R krystalizowały w grupie przestrzennej $I4_122$ z jednym monomerem w części asymetrycznej. Kompletny tetramer C1-C2-C3-C4 tworzy się z podjednostek A-A'-A''-A''' przez operacje symetrii (Rysunek 41, Tabela 35).

Protomery we wszystkich sześciu przypadkach są do siebie podobne, dlatego ich budowę omówię na podstawie struktury WT_R_0.



Rysunek 41. Tworzenie tetrameru FBPazy przez operacje symetrii w tetragonalnej grupie przestrzennej $I4_122$. Widok wzdłuż osi z.

Tabela 35. Opis generowania podjednostek symetrycznych tworzących dwa niezależne tetramery

Podjednostka	Operacja symetrii
A'	$(y, x, -z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do osi [110]
A''	$(-y, -x, -z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do osi [1-10]
A'''	$(-x, -y, z)$, obrót wokół osi dwukrotnej równoległej do osi [001]

6.2. PROTOMER

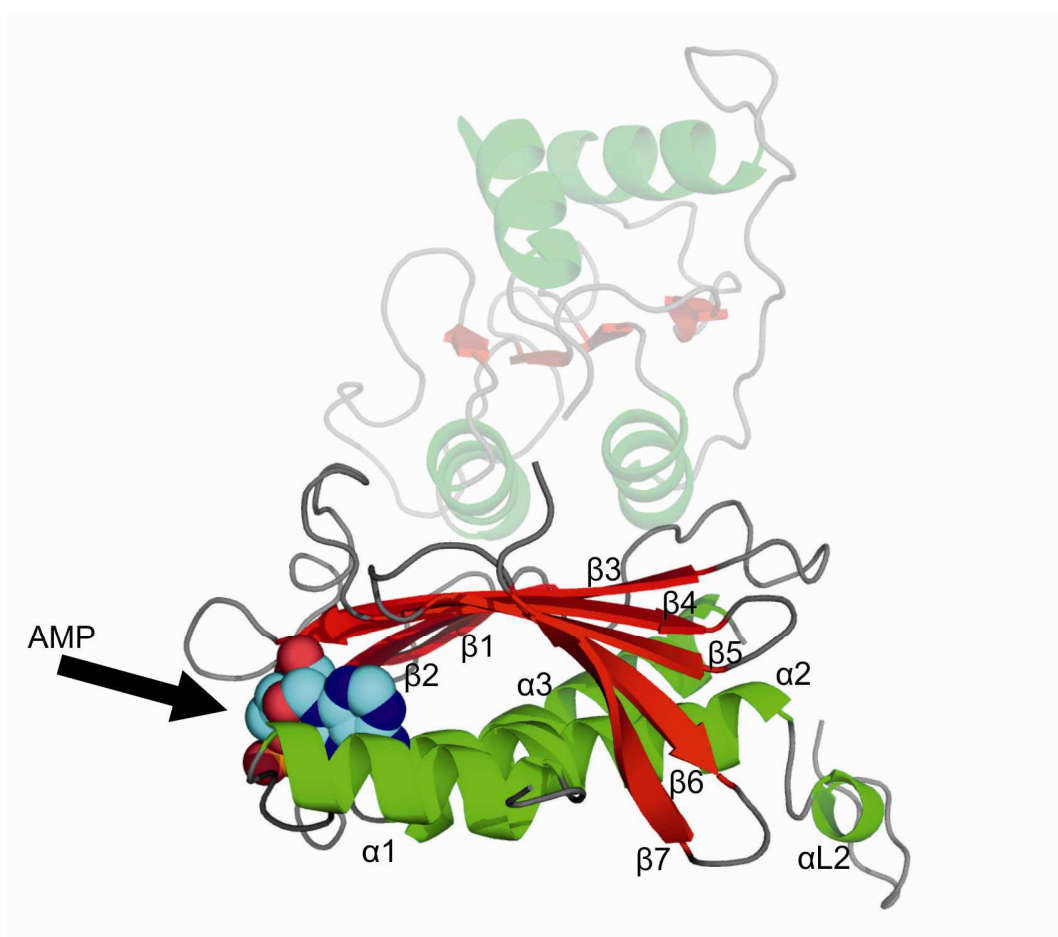
6.2.1. Budowa ogólna

Podjednostka we wszystkich strukturach zbudowana jest z 12-13 arkuszy β oraz 6-7 helis α , które wraz z odcinkami pozbawionymi struktury II-rzędowej tworzą dwie domeny (Tabela 36). Dodatkowo, w obrębie niektórych pętli występują krótkie helisy typu 3_{10} . Różnice w ilości elementów struktury drugorzędowej spowodowane są zmianami podczas przechodzenia FBPazy ze stanu T do R. Podjednostka FBPazy podzielona jest na dwie domeny. Przy końcu N znajduje się domena allosteryczna (reszty 1-200) a przy końcu C domena katalityczna (reszty 201-335).

Table 36. Porównanie struktur ludzkiej mięśniowej FBPazy w trzech stanach. Elementy struktury drugorzędowej określono za pomocą programu DSSP (Kabsch i Sander, 1983). Przerwy w sekwencji (...) oznaczają reszty nie posiadające gęstości elektronowej.

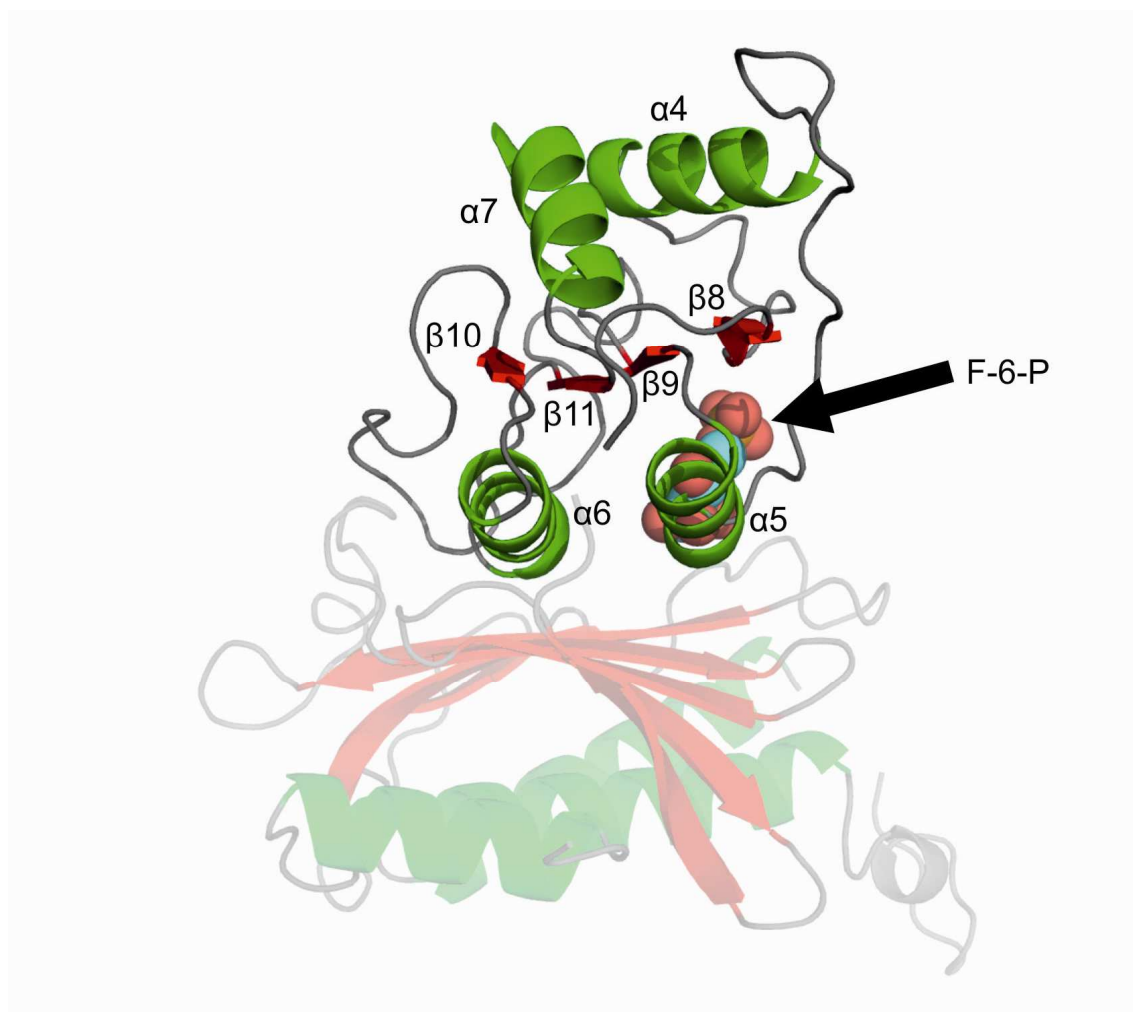
Elementy struktury drugorzędowej	Reszty aminokwasowe		
	WT_T_AMP	WT_T_0	WT_R_0
Domena allosteryczna			
Koniec N	8-12	11-12	8-10
α1	13-23	13-19	-
βα1	-	-	11-15
L1	24-28	20...29	16-19...28
α2	29-48	30-49	29-49
L2 (pętla katalityczna)	49-63...70	50...72	50-51...73
αL2	53-56	-	-
α3	71-86	73-86	74-87
L3		87-90	88-90
β1		91-96	
L4	97-109	97-112	97-109
βL4	103-104	99-104	103-104
αL4 (helisa 3 ₁₀)		107-109	
β2	110-121	113-118	110-121
L5	122-131	119-122...130-131	122...129-131
αL5 (helisa 3 ₁₀)	123-128	-	-
β3	132-140	132-139	132-140
L6	141-142...147-160	140-158	141...147-160
αL6a (helisa 3 ₁₀)	149-152	149-151	150-152
αL6b (helisa 3 ₁₀)		156-158	
β4	161-167	159-167	161-167
L7		168-170	
β5		171-176	
L8		177-181	
β6		182-187	
L9		188-191	
β7		192-197	
Domena katalityczna			
L10		198-207	
β8	208-210	208-209	208-210
L11	211-220	210-220	211-220
αL11 (helisa 3 ₁₀)	213-218	213-215	213-218
α4		221-231	
L12		232-240	
β9		241-242	
L13		243-247	
α5		248-258	
L14		259-260	
β10		261-264	
L15		265-280	
α6		281-290	
L16		291-293	
β11		294-296	
L17		297-315	
αL17 (helisa 3 ₁₀)		302-304	
β12		316-319	
T1		320	
α7		321-335	321-332
Koniec C	336-337	336-337	333-334

Opis budowy protomeru rozpocznę od enzymu w stanie T (WT_T_AMP). Jest on prawie identyczny z budową protomeru enzymu wątrobowego zarówno w stanie T jak i R. Domena allosteryczna (Rysunek 42) zawiera antyrównoległy arkusz β utworzony z siedmiu łańcuchów β (β 1- β 7). Arkusz β tworzy swego rodzaju sklepienie ponad trzema helisami (α 1- α 3) ułożonymi prawie równoległe do siebie. Pomiędzy tymi elementami znajduje się 9 pętli.



Rysunek 42. Domena allosteryczna w monomerze FBPazy. AMP (model czasowy) wskazuje miejsce inhibitorowe (allosteryczne).

Domena katalityczna zawiera cztery łańcuchy β (β 8- β 11) tworzące jeden antyrównoległy arkusz oraz cztery helisy α (α 4- α 7) umieszczone parami pod i nad arkuszem. Elementy połączone są ośmioma pętlami (Rysunek 43).

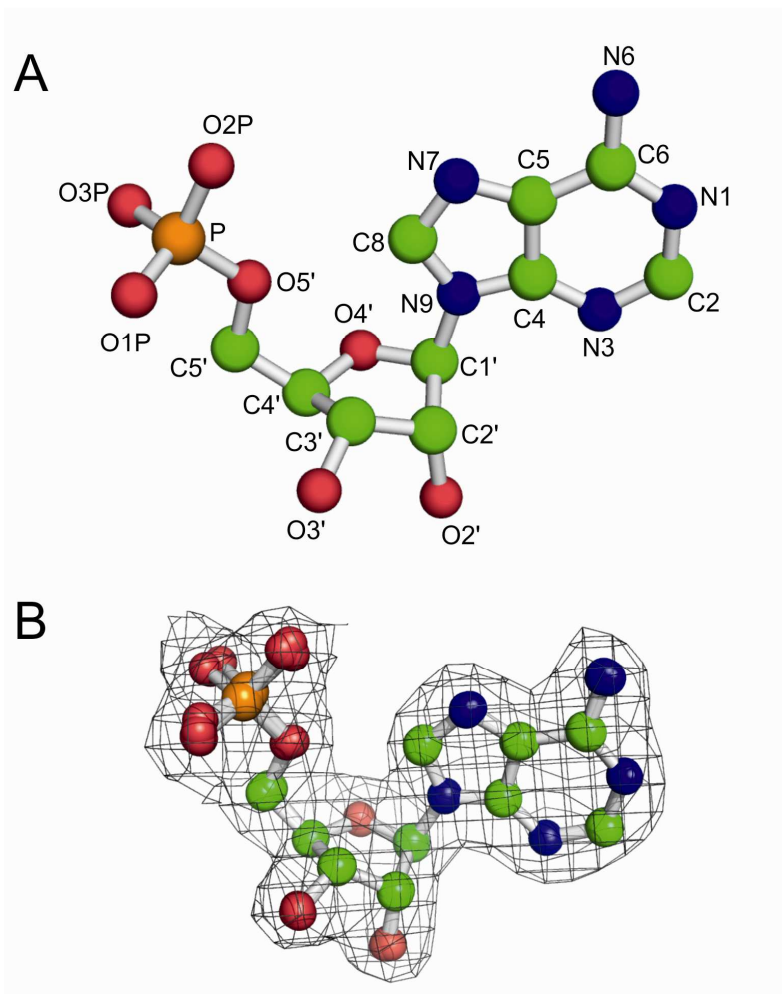


Rysunek 43. Domena katalityczna w monomerze FBPazy. F-6-P (model czaszowy) wskazuje miejsce aktywne.

W obrębie pętli L2, L4, L5, L6, L11 oraz L17 znajduje się kilka krótkich helis 3_{10} . Na poziomie struktur trzeciorzędowych podjednostki wszystkich rozwiązanych przeze mnie struktur FBPazy są do siebie bardzo podobne. Dla stanu R rmsd atomów C α podjednostek waha się pomiędzy 0,21 a 0,33 Å, natomiast dla podjednostek formy T waha się od 0,16 do 0,48 Å. Ponadto rmsd atomów C α podjednostek form R i T wynosi 0,51 Å. Jeżeli to samo porównanie wykonamy dla domen allosterycznych i katalitycznych odpowiednich stanów, otrzymujemy wartości odpowiednio 0,79 i 0,33 Å. Wynika z tego, że największe zmiany podczas przejścia ze stanu T do R na poziomie protomeru zachodzą w domenie allosterycznej.

6.2.2. Miejsce allosteryczne/inhibitorowe

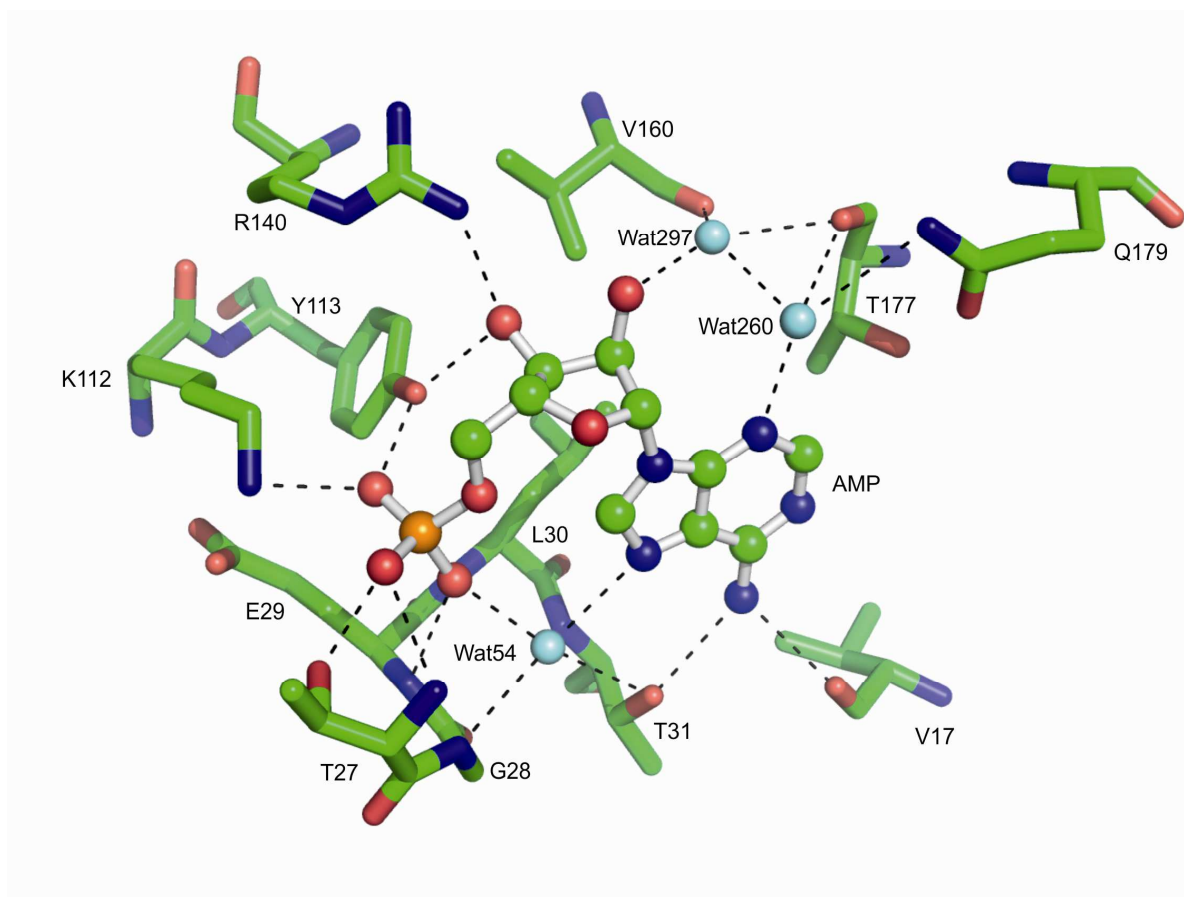
W obrębie domeny allosterycznej znajduje się miejsce wiązania nukleotydu. Tworzą je reszty wchodzące w skład helis $\alpha 1$ i $\alpha 2$, łańcuchów $\beta 2$ i $\beta 3$ oraz pętli L1 oraz L8. W strukturze w stanie T(+AMP) w każdej podjednostce w miejscu wiązania nukleotydu znajduje się jedna cząsteczka AMP o dobrze zdefiniowanej gęstości elektronowej (Rysunek 44).



Rysunek 44. (A) Numeracja atomów w cząsteczce AMP. (B) Superpozycja czterech cząsteczek AMP z czterech podjednostek struktury FBPaży w formie T. Kontur mapy OMIT wynosi 4σ .

Cztery cząsteczki AMP są prawie identycznie ułożone w przestrzeni w poszczególnych podjednostkach. Delikatne różnice można zaobserwować jedynie w ułożeniu grupy fosforanowej. Rmsd dla poszczególnych par cząsteczek wynosi 0,06(AB), 0,03(AC) i 0,08(AD) Å. Ze względu na swoją funkcję nukleotyd jest rozpoznawany specyficjnie. Fosforan tworzy wiązania wodorowe z łańcuchami bocznymi reszt Thr27, Lys112, Tyr113

oraz z łańcuchami głównymi reszt Glu29 i Leu 30. Atomy tlenu z grup hydroksylowych rybozy są rozpoznawane przez Arg140, grupa aminowa z adeninie łączy się z Val17 i Thr31. Dodatkowo AMP łączy się poprzez cząsteczki wody z resztami Gly28, Thr31, Val160, Thr177, Gln179 (Rysunek 45, Tabela 37).



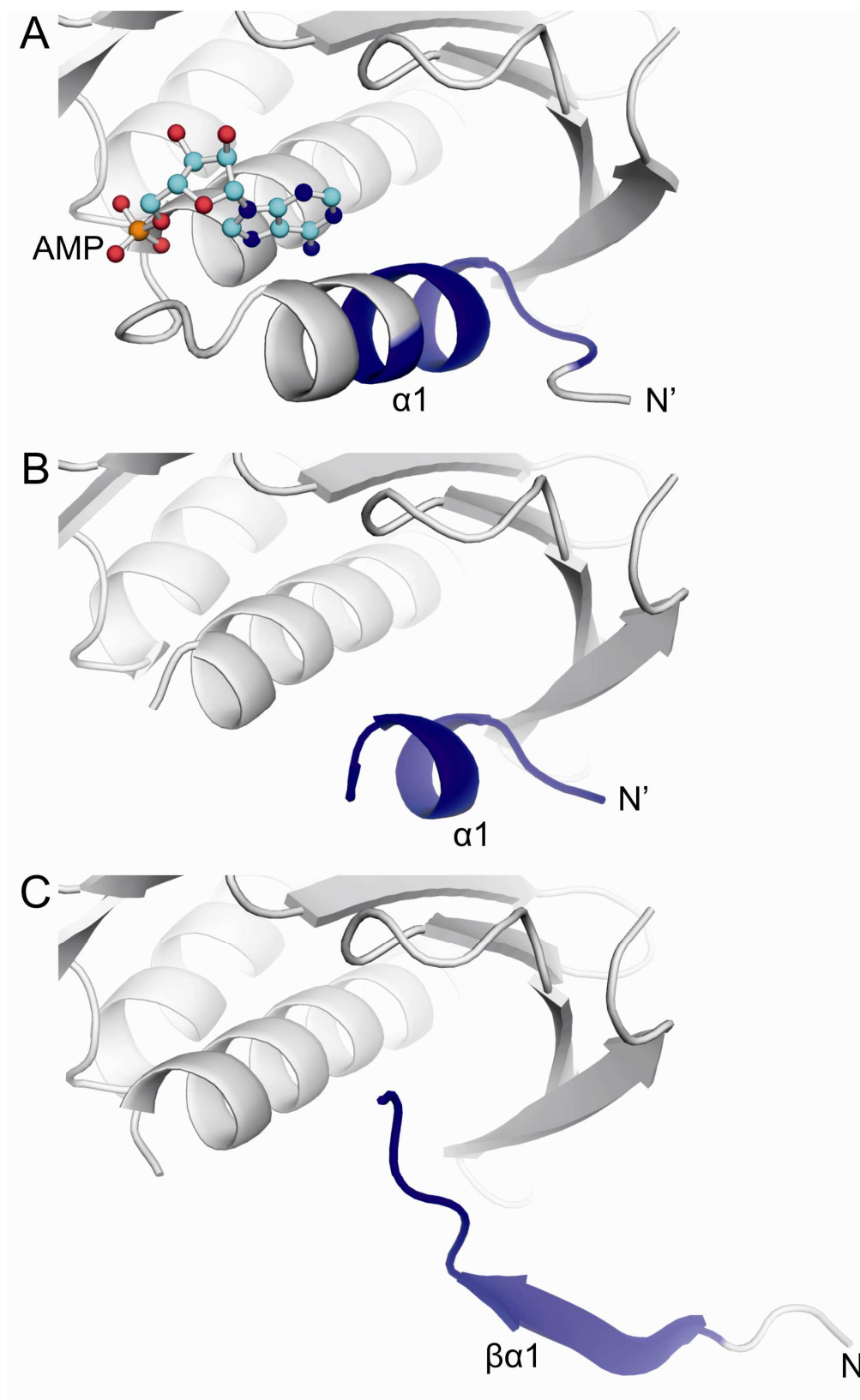
Rysunek 45. Reszty FBPazy tworzące wiązania wodorowe z AMP.

Tabela 37. Wiązania wodorowe w miejscu wiązania AMP w FBPazie w formie T.

Molekuła	Atom	Odległość [Å]	Atom	Reszta
AMP	N3	2,75	O	Woda260
	N6	2,94	O	Val17
	N6	2,98	O γ 1	Thr31
	N7	2,90	O	Woda54
	O1P	2,66	N ϵ	Lys112
	O1P	2,48	OH	Tyr113
	O2'	2,77	O	Woda297
	O2P	3,04	N	Glu29
	O2P	2,95	N	Leu30
	O2P	2,58	O	Woda54
	O3'	2,78	N η 1	Arg140
	O3'	2,73	OH	Tyr113
	O3P	2,69	O γ 1	Thr27
	O3P	2,80	N	Thr27
	Woda54	O	3,07	N
Woda54	O	3,07	O γ 1	Thr31
Woda260	O	3,20	O	Thr177
Woda260	O	3,31	N ϵ 2	Gln179
Woda260	O	2,87	O	Woda297
Woda297	O	2,81	O	Val160

W wyniku działania jonami magnezu na kryształy formy T podczas mrożenia kryształu usunąłem ze struktury cząsteczki AMP. Efektem tego jest obserwowany częściowy zanik gęstości elektronowej helisy α 1 oraz pętli L1 wchodzących w skład miejsca wiązania nukleotydu. Kryształy formy R otrzymywane były z preparatu wolnego od AMP i dlatego ich miejsce wiązania nukleotydu wygląda zupełnie inaczej. Helisa α 1 uległa całkowitemu rozpleceniu z jednoczesnym utworzeniem łańcucha $\beta\alpha$ 1 (Rysunek 46). Częściowy zanik gęstości elektronowej przy braku cząsteczki AMP był już obserwowany w innych strukturach obu izoenzymów [Shi et al., 2013]. Ale jak dotąd w żadnej z izoform FBPazy nie następowała przemiana struktury drugorzędowej z α w β .

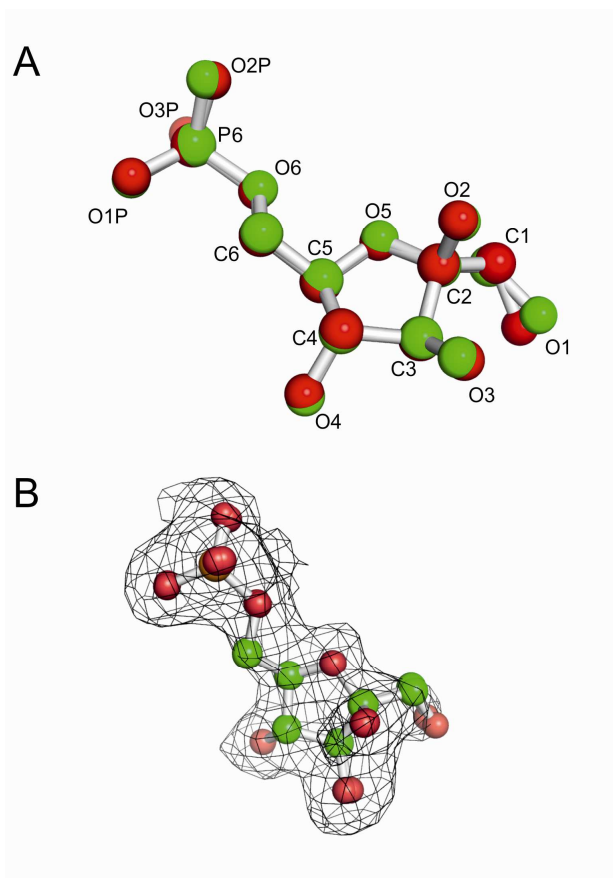
Z porównania rozwiązanych struktur FBPazy wynika, że pętla L1 oraz helisa α 1 są odpowiedzialne za wiązanie cząsteczki AMP oraz, że ich struktura II-rzędowa jest ściśle związana z obecnością nukleotydu. Przejście helisy α 1 w łańcuch $\beta\alpha$ 1 po wymyciu AMP odgrywa ważną rolę w stabilizacji tetrameru FBPazy i będzie omówione później.



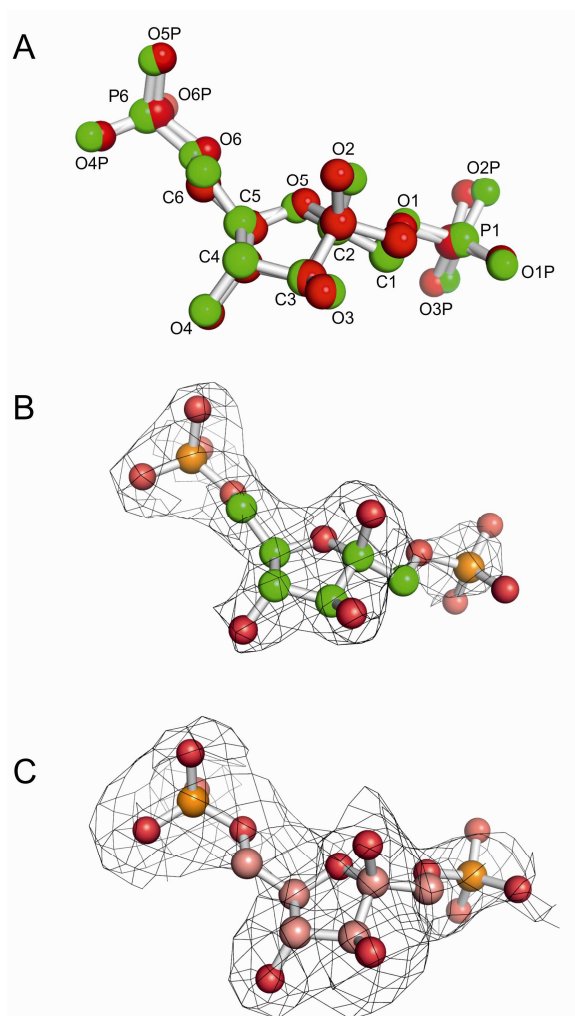
Rysunek 46. Porównanie miejsc wiązania AMP w strukturach formy T z AMP (WT_T_AMP; A), formy T bez AMP (WT_T_0; B) oraz formy R (WT_R_0; C). Niebieskim kolorem zaznaczone są analogiczne fragmenty sekwencji (Leu11-Val17) w każdej ze struktur.

6.2.3. Miejsce aktywne

Kryształy FBPazy w stanie R nasączone były roztworem substratu (F-1,6-BP) jak również produktu (F-6-P) reakcji katalizowanej przez enzym. W celu niedopuszczenia do zmiany stanu białka w kryształach, która spowodowałaby jego zniszczenie, roztwory do nasączenia wzbogacone zostały 100 mM roztworem chlorku wapnia, który jest jednym z inhibitorów enzymu. Dzięki tym zabiegom możliwe stało się uchwycenie ligandów w miejscu aktywnym i porównanie struktur enzymu mięśniowego z pozostałymi strukturami FBPazy. Miejsca aktywne w enzymie natywnym i mutancie E69Q są do siebie bardzo podobne, a ligandy zostały rozpoznane w ten sam sposób. Rmsd dla wszystkich atomów niewodorowych β -fruktozo-6-fosforanu w obu strukturach wynosi 0,10 Å (Rysunek 47), a dla β -fruktozo-1,6-bisfosforanu wynosi 0,34 Å (Rysunek 48).



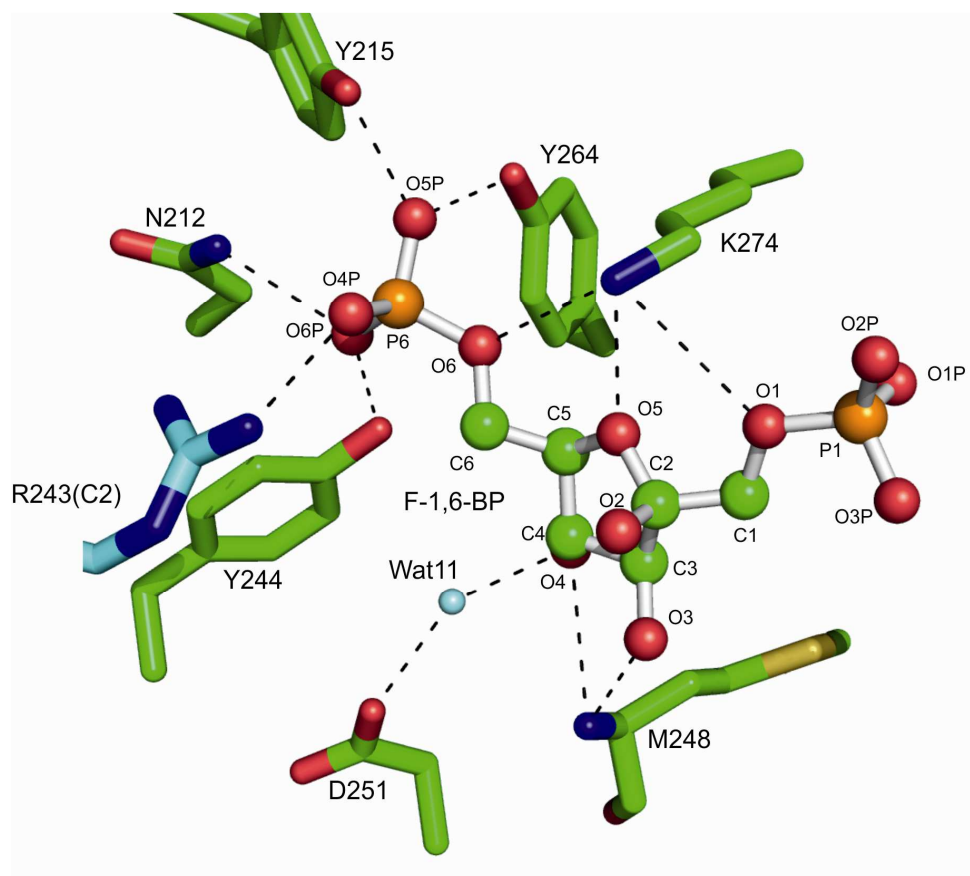
Rysunek 47. (A) Superpozycja dwóch cząsteczek β -fruktozo-6-fosforanu z struktury natywnej FBPazy (kolor zielony) oraz mutantu E69Q (kolor czerwony). (B) β -F-6-P z natywnej FBPazy w mapie OMIT przedstawionej z konturem 2σ .



Rysunek 48. (A) Superpozycja dwóch cząsteczek β -fruktozo-1,6-bisfosforanu z struktury natywnej FBPazy (kolor zielony) oraz mutantu E69Q (kolor czerwony). (B) β -F-1,6-BP z natywnej FBPazy. Kontur mapy OMIT wynosi 3σ . (C) β -F-1,6-BP z mutantu FBPazy E69Q. Kontur mapy OMIT wynosi $1,5\sigma$.

Miejsce aktywne enzymu mięśniowego omówię na przykładzie podjednostki C1. Zbudowane jest ono z reszt wchodzących w skład zarówno domeny allosterycznej, jak i katalitycznej. Ligandy (F6P, F-1,6-BP) stabilizowane są w miejscu aktywnym przez sieć wiązań wodorowych pomiędzy grupą fosforanową przy węglu C6 a resztami tyrozyn (215, 244, 264) oraz asparaginą 212. Dodatkowo lizyna 274 oddziałuje z atomami tlenu O1, O5 i O6 cząsteczki F-1,6-BP, tworząc wiązania stabilizujące grupę fosforanową przy węglu C1. Reszta Lys274 jest kluczowa dla stabilizacji ligandu w miejscu aktywnym FBPazy [Ke et al., 1991]. Badania prowadzone na enzymie wątrobowym pokazały, że mutacja tej reszty (K274A) powoduje spadek K_m dla F-1,6-BP oraz K_i dla F-2,6-BP [El-Maghrabi et al., 1992]. Dwie grupy hydroksylowe fruktozy (O3, O4) oddziałują z łańcuchem głównym metioniny 248. Interesujący jest również fakt, że w rozpoznawaniu

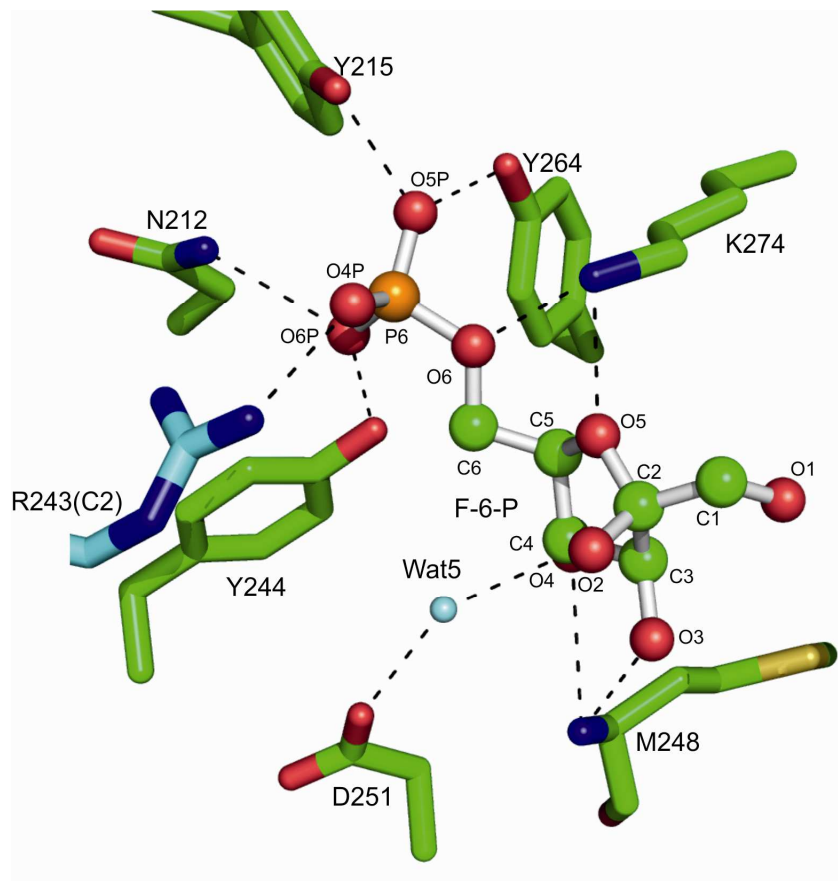
grupy fosforanowej przy węglu C6 bierze również udział łańcuch boczny arginyiny 243 należącej do sąsiadującej podjednostki C2 (Rysunek 49, 50; Tabela 38, 39).



Rysunek 49. Reszty aminokwasowe podjednostek C1 (zielone) oraz C2 (niebieskie) biorące udział w wiązaniu substratu F-1,6-BP w strukturze WT_R_F16BP.

Tabela 38. Wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczką F-1,6-BP a białkiem w strukturze WT_R_F16BP

Molekuła	Atom	Odległość [Å]	Atom	Molekuła
F-1,6-BP	O4P	2,74	N η 2	ARG243(C2)
	O6P	2,90	N γ 2	ASN212
	O1	3,51	N ϵ	LYS274
	O5	2,77	N ϵ	LYS274
	O6	3,16	N ϵ	LYS274
	O3	2,60	N	MET248
	O4	3,21	N	MET248
	O5P	2,49	OH	TYR215
	O6P	2,74	OH	TYR244
	O5P	2,63	OH	TYR264
Woda11	O4	2,52	O	WAT11
	O	2,68	O γ 2	ASP251



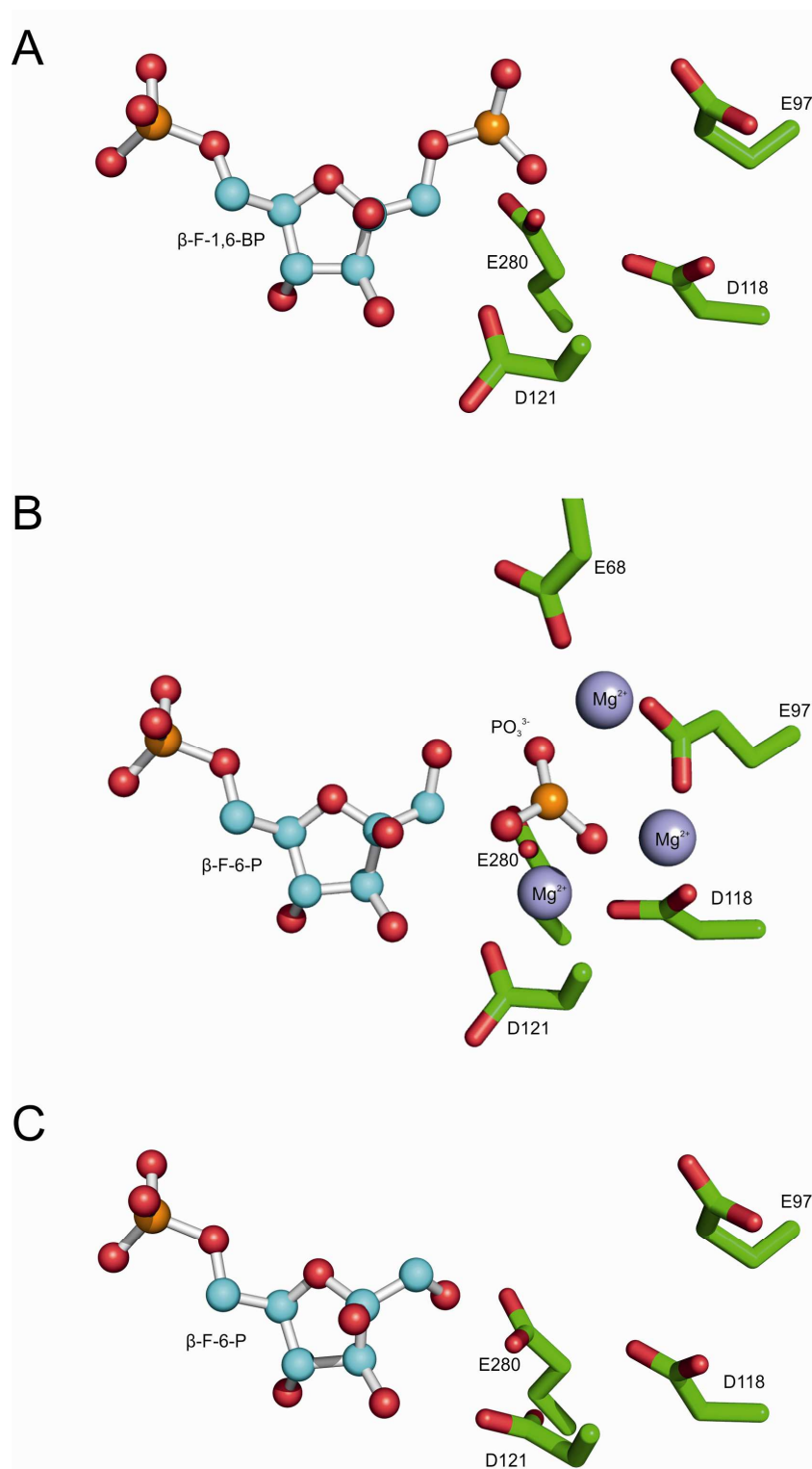
Rysunek 50. Reszty aminokwasowe podjednostek C1 (zielone) oraz C2 (niebieskie) biorące udział w wiązaniu produktu F6P w strukturze WT_R_F6P.

Tabela 39. Wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczką F-6-P a białkiem w strukturze WT_R_F6P

Molekuła	Atom	Odległość [Å]	Atom	Molekuła
F-6-P	O4P	2,71	N η 2	ARG243(C2)
	O6P	2,94	N γ 2	ASN212
	O6	2,89	N ϵ	LYS274
	O5	2,76	N ϵ	LYS274
	O3	2,80	N	MET248
	O4	3,27	N	MET248
	O5P	2,48	OH	TYR215
	O6P	2,61	OH	TYR244
	O5P	2,56	OH	TYR264
	O4	2,70	O	WAT5
Woda5	O	2,62	O γ 2	ASP251

Część aminokwasów z domeny allosterycznej tworzących miejsce aktywne nie posiada dobrej gęstości elektronowej. Dodatkowo w rozwiązanych strukturach nie obserwujemy gęstości elektronowej pozwalającej na zlokalizowanie jonów magnezu.

Może to oznaczać, że jony zostały związane z białkiem w niepełnym obsadzeniu lub posiadają niepełną sferę koordynacyjną, przez co są trudne do odróżnienia od cząsteczek wody. Jednak brak jakiegokolwiek gęstości elektronowej w teoretycznych miejscach występowania jonów magnezu nie potwierdza tej hipotezy. Bardziej prawdopodobne jest wyjaśnienie oparte na analizie porównawczej znanych struktur FBPazy. Z prawie 90 zdeponowanych w PDB struktur FBPazy tylko w czterdziestu dwóch udało się zaobserwować gęstość elektronową dla jonów metali dwuwartościowych (Mg^{2+} lub Zn^{2+}). Wszystkie struktury zawierające jony metali dwuwartościowych mają również w miejscu aktywnym substrat (F-1,6-BP) lub produkt F-6-P i wolną grupę fosforanową. Dodatkowo zauważono, że zmiany w ułożeniu reszty Asp74 na końcu C pętli katalitycznej podczas jej przechodzenia z położenia disengaged w engaged wpływają na reszty Glu97 i Glu98 [Hines et al., 2007]. Na podstawie tej obserwacji można stwierdzić, że warunkiem koniecznym do obecności jonów w strukturze jest obecność substratu F-1,6-BP, ponieważ tworzy on za pośrednictwem grupy fosforanowej przy węglu C1 oraz reszt Glu68, Glu97, Asp118, Asp121 i Glu280 silnie nukleofilowy rejon o dużej kumulacji ładunku ujemnego, który przyciąga jony Mg^{2+} niezbędne do przeprowadzenia reakcji defosforylacji. Obecność substratu pociąga za sobą przejście pętli L2 w pozycję engaged, która dodatkowo stabilizuje ułożenie reszt kwasowych w miejscu aktywnym. Kryształy formy R były co prawda nasączone zarówno substratem jak i produktem, ale dodatkowo w roztworze znajdowały się jony wapnia, które uniemożliwiły przejście pętli katalitycznej do pozycji engaged. Brak w miejscu aktywnym gęstości elektronowej jednego z aminokwasów Glu68 wchodzącego w skład pętli L2 oraz odchylony łańcuch Glu97 zdają się potwierdzać tę hipotezę. Na rysunku 51 przedstawiłem porównanie fragmentu miejsca aktywnego, odpowiedzialnego za wiązanie jonów magnezu w FBPazie wątrobowej (PDB: 1NUX) z dwoma strukturami FBPazy mięśniowej w formie R rozwiązanej przeze mnie.



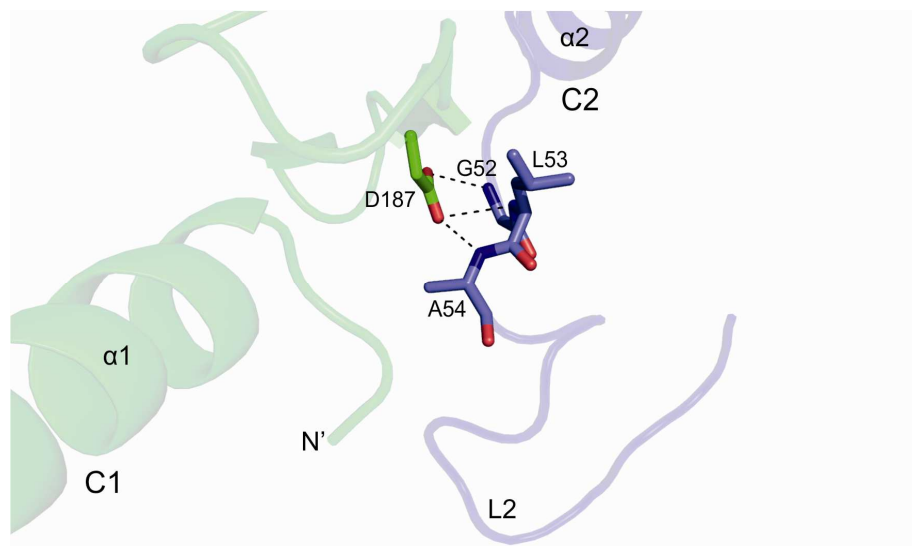
Rysunek 51. Reszty aminokwasowe biorące udział w reakcji defosforylacji za pośrednictwem jonów magnezu. (A) β -F-1,6-BP ludzka mięśniowa FBPaza (W_R_F16BP), (B) β -F6P i P_i enzym wątrobowy (Kod PDB 1NUX), (C) β -F6P ludzka mięśniowa FBPaza (WT_R_F6P).

Dodatkowo istotnym elementem omawiania miejsca aktywnego jest fakt, że reakcja hydrolizy jest stereospecyficzna. W roztworze fruktozo-1,6-bisfosforan występuje głównie

w formie anomeru β (80%) oraz α (15%) [Frey et al., 1977]. Jednak to anomer α jest głównym substratem dla FBPazy. Anomer β ulega hydrolizie dopiero po mutarotacji [Benkovic i deMaine, 1982; Villeret et al., 1995]. Na podstawie znanych struktur enzymu wątrobowego wiemy, że grupa hydroksylowa przy węglu C2 tworzy oddziaływanie stabilizujące z resztą Ser123 poprzez cząsteczkę wody, a przez to umiejscawia substrat węglem C1 na zewnątrz miejsca aktywnego. Taki system rozpoznawania substratu uniemożliwia odcięcie fosforanu w pozycji C6.

6.2.4. Pętla katalityczna

Pętla katalityczna L2 w strukturze WT_T_AMP znajduje się w pozycji disengaged. Brak gęstości elektronowej dla reszt Val63-Val70 nie stanowi problemu we właściwym określeniu jej konformacji. Podobne braki gęstości elektronowej pętli L2 obserwowane były również w strukturach enzymu wątrobowego z pętlą katalityczną w stanie disengaged. Łańcuch główny reszt Gly52-Ala53-Leu54 z pętli L2 podjednostki C2 tworzy wiązania wodorowe z łańcuchem bocznym kwasu asparaginowego 187 należącym do pętli L6 podjednostki C1 (Rysunek 52). Wiązanie to stabilizuje pętlę L2 w stanie disengaged. W strukturze WT_T_0 gęstość elektronowa pętli L2 zanika na odcinku Leu53-Lys71. Jest to skutek przejścia pętli w stan disordered, podczas którego enzym staje się gotowy na przyjęcie substratu. W strukturach formy R pętla znajduje się również w stanie disordered. W przypadku struktury FBPazy w stanie R bez ligandów w miejscu aktywnym pętla pozostaje w stanie disordered właśnie ze względu na brak substratu w miejscu aktywnym. W strukturach nasączanych ligandem lub produktem pętla pozostaje w stanie disordered ze względu na zastosowanie przy nasączaniu roztworu jonów wapnia, które na podstawie licznych hipotez odpowiedzialne są za blokowanie ruchów pętli katalitycznej w izoenzymie mięśniowym [Zarzycki et al., 2007].



Rysunek 52. Wiązania wodorowe (linia przerywana) pomiędzy resztami pętli katalitycznej w stanie disengaged podjednostki C2 a resztą Asp187 pętli L6 podjednostki C1. Długości wiązań podałem w Tabeli 40.

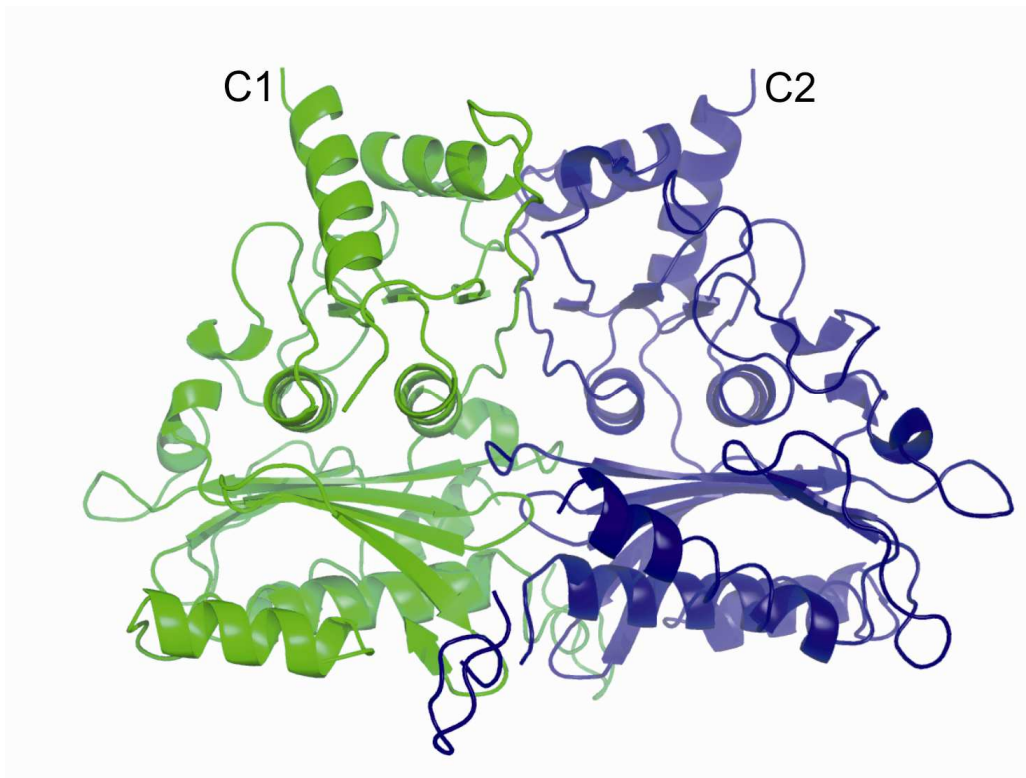
6.2.5. Mutacja E69Q

Próba uzyskania informacji o budowie miejsca wiązania jonów wapnia polegająca na nasączeniu kryształów ich roztworem nie powiodła się. W żadnej z rozwiązanych przeze mnie struktur nie znalazłem gęstości elektronowej metalu. Dodatkowo, brak gęstości elektronowej w okolicach końca C pętli L2 uniemożliwił wbudowanie reszty kwasu glutaminowego lub glutaminy w pozycji 69.

Na podstawie rozwiązanych struktur enzymu natywnego (W_R_0, W_R_F16BP) oraz mutantu E69Q (E_R_0, E_R_F16BP) można jednak stwierdzić, że faktycznie mutacja reszty 69 pozwoliła na zniesienie hamowania enzymu przez jony wapnia. W tych samych warunkach podczas nasączenia kryształów roztworem zawierającym jony magnezu, wapnia oraz substrat reakcji, obserwujemy mniejsze różnice w uzyskanym modelu dla enzymu natywnego (rmsd wynosi 0,25 Å) niż dla mutantu E69Q (rmsd wynosi 0,37 Å).

6.3. DIMER

6.3.1. Budowa ogólna



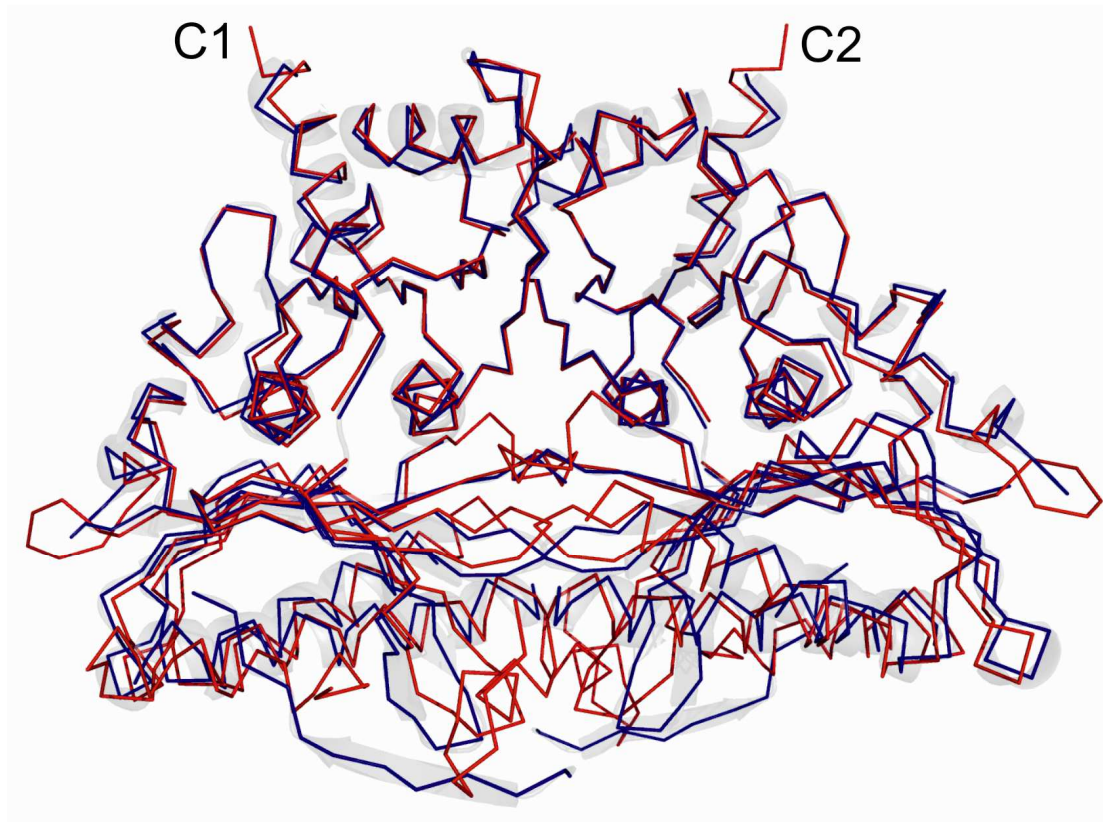
Rysunek 53. Dimer „górny”, C1C2, FBPaazy w formie T (WT_T_AMP)..

Protomery C1 i C2 oddziałują ze sobą tworząc dimer „górny” (Rysunek 53). Analogicznie protomery C3 i C4 tworzą dimer „dolny”. Sieć wiązań wodorowych pomiędzy dwoma protomerami podzielona jest, podobnie jak protomery, na dwie części. Wiązania wodorowe zlokalizowane pomiędzy domenami katalitycznymi są stałe i zmieniają się podczas przejścia ze stanu T do R tylko w nieznacznym stopniu. Wiązania wodorowe pomiędzy domenami allosterycznymi protomerów ulegają rozerwaniu podczas zmian konformacyjnych enzymu. Przykładem takich wiązań jest oddziaływanie pomiędzy resztami pętli katalitycznej protomeru C1 a resztą Asp187 protomeru C2 (rozdział 6.2.4). Długości wiązań wodorowych pomiędzy resztami biorącymi udział w tworzeniu dimerów podałem w tabeli 40. Ponieważ w strukturach formy R w kilku miejscach nie obserwujemy gęstości elektronowej dla niektórych reszt aminokwasowych, dlatego długości wiązań pomiędzy tymi resztami nie zostały wyszczególnione w zestawieniu.

Tabela 40. Odległości pomiędzy aminokwasami podjednostek C1-C2 w strukturach formy R i T. Kolorem szarym zaznaczone są reszty nieujęte w modelu z powodu braku gęstości elektronowej.

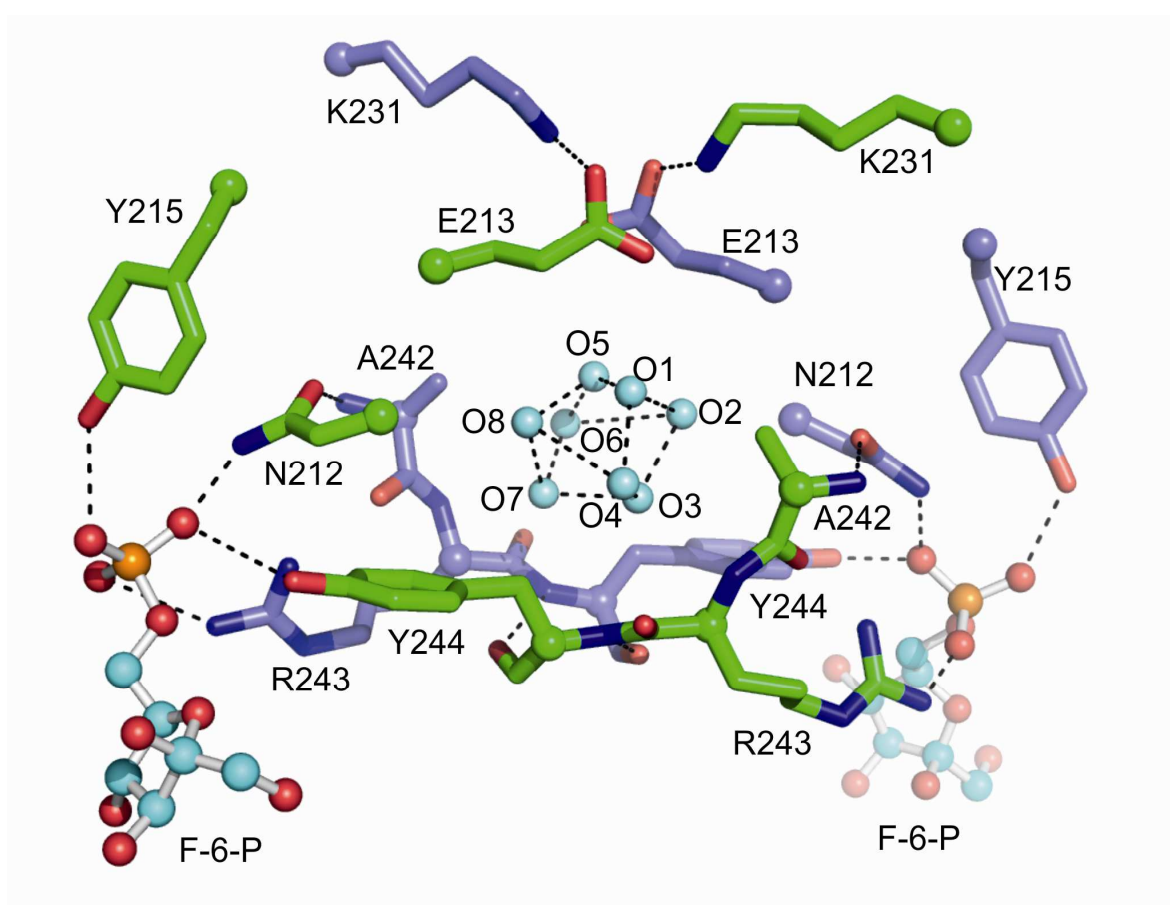
Forma R			Forma T		
C1/C2	Odległość [Å]	C2/C1	C1/C2	Odległość [Å]	C2/C1
Tyr258	-	Ser124	Tyr258 (OH)	2,50	(O) Ser124
Arg243	-	Ser124	Arg243 (Nη2)	3,43	(Oβ) Ser124
Ser169	-	Leu129	Ser169 (N)	2,99	(O) Leu129
Arg49 (Nη1)	3,15	(O) Gly168	Arg49 (Nη1)	3,12	(O) Gly168
Arg49 (Nη1)	2,64	(O) Ser169	Arg49 (Nη1)	2,73	(O) Ser169
Gly52	-	Asp187	Gly52 (N)	2,93	(Oγ1) Asp187
Ala54	-	Asp187	Ala54 (N)	2,89	(Oγ1) Asp187
Leu53	-	Asp187	Leu53 (N)	3,17	(Oγ2) Asp187
Ala242 (N)	2,96	(Oγ1) Asn212	Ala242 (N)	2,99	(Oγ1) Asn212
Tyr244 (N)	2,89	(O) Tyr244	Tyr244 (N)	2,72	(O) Tyr244
Cys128	-	Tyr258	Cys128 (N)	3,03	(OH) Tyr258
Lys231 (Nε)	3,72	(Oδ2) Glu213	Lys231 (Nε)	3,37	(Oδ2) Glu213

Niezwykle interesujący jest fakt, że pomimo olbrzymich zmian jakie zachodzą w domenach allosterycznych obu podjednostek dimeru (rmsd atomów Ca form R i T wynosi 1,43 Å), układ domen katalitycznych pozostaje prawie niezmienny (rmsd wynosi 0,54 Å) (Rysunek 54).



Rysunek 54. Porównanie przebiegu łańcuchów głównych FBPazy w stanie T (czerwony) oraz w stanie R (niebieski). W tle rysunku umieszczono dimer FBPazy w stanie R (szary).

Utworzenie dimeru jest związane z aktywnością enzymatyczną FBPazy. Jak już wcześniej wspomniałem, w rozpoznawaniu substratu w miejscu aktywnym biorą udział reszty aminokwasowe z domen katalitycznych obu podjednostek tworzących dimer. Łańcuch boczny Arg243 z podjednostki C1 bierze udział w tworzeniu miejsca aktywnego w podjednostce C2 (Rozdział 6.2.3). Łańcuchy główne Tyr244 z obydwu podjednostek oddziałują ze sobą za pomocą wiązań wodorowych. Asn212 z podjednostki C1 tworzy wiązanie wodorowe z łańcuchem głównym Ala242 z podjednostki C2, a reszta kwasu glutaminowego Glu213 z podjednostki C1 oddziałuje z lizyną Lys231 (Rysunek 55).



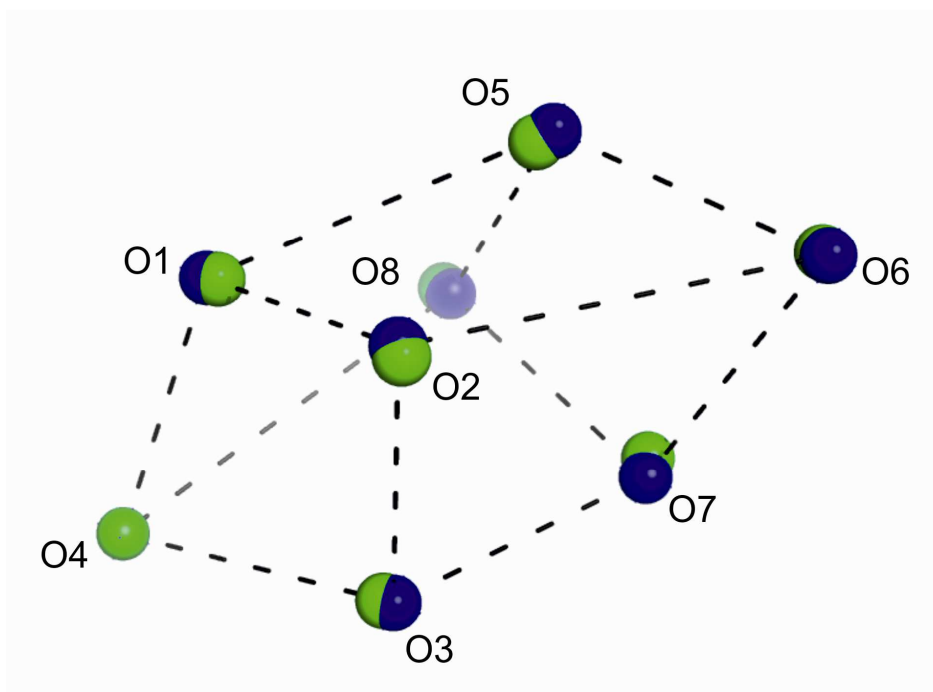
Rysunek 55. Sieć wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasowymi domen katalitycznych podjednostek C1 (zielona) i C2 (niebieska) w strukturze WT_R_F6P. Węgłe Ca przedstawione są jako kulki. Cząsteczki wody oznaczone są jako O.

Źródłem stabilności domen katalitycznych podczas przejścia enzymu ze stanu aktywnego w nieaktywny jest szczególna substruktura cząsteczek wody znajdująca się w przestrzeni wewnątrz dimeru (Rysunek 55). Zbudowana jest ona z 8 cząsteczek wody (O1-O8) połączonych wiązaniami wodorowymi o zróżnicowanych długościach. Tworzą

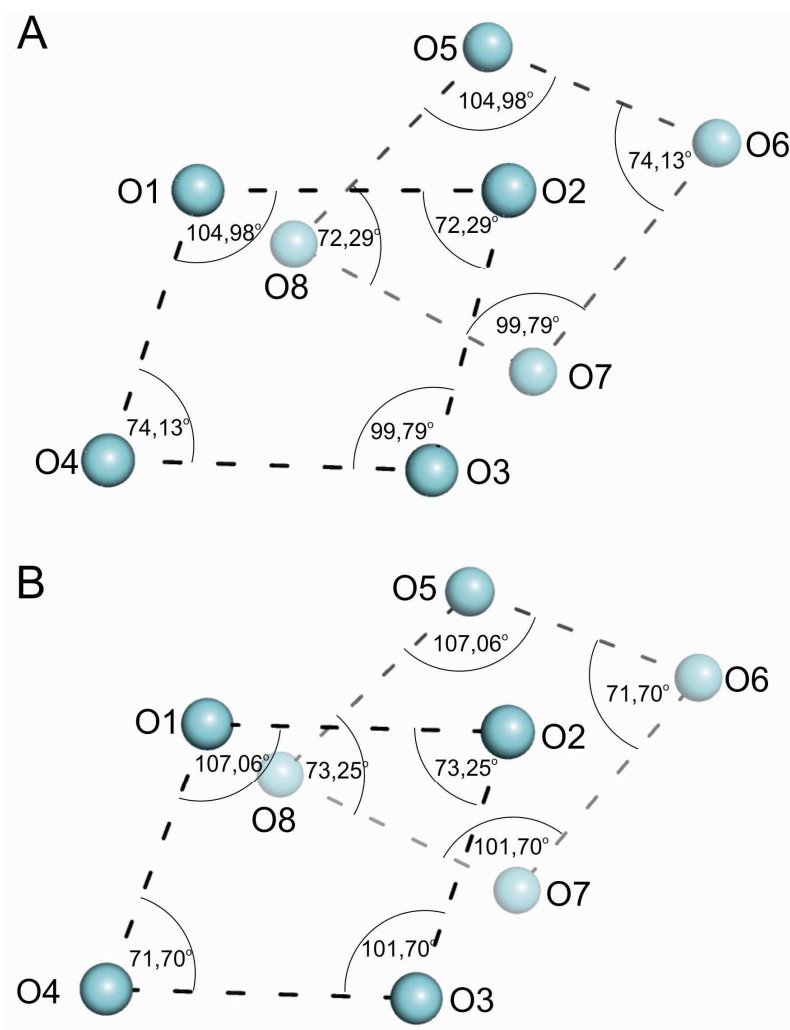
one swoistą strukturę oktaedryczną. Długości wiązań wodorowych między cząsteczkami wody oraz kąty między nimi różnią się dla stanu R i T (Rysunek 56, Tabela 41), co wskazuje na niewielkie zmiany strukturalne w centrum dimeru zachodzące podczas wiązania ligandów.

Tabela 41. Odległości [Å] pomiędzy atomami tlenu w oktaedrycznej strukturze wody w strukturach FBPazy formy R i T.

Odcinek	Forma R	Forma T
O1-O2	3,02	2,81
O1-O4	2,68	2,65
O3-O2	2,86	2,71
O3-O4	3,06	2,95
O5-O6	2,68	2,65
O5-O8	3,02	2,81
O7-O6	3,06	2,95
O7-O8	2,86	2,71
O1-O5	3,49	3,55
O2-O6	3,92	3,85
O3-O7	2,76	2,70
O4-O8	3,92	3,85



Rysunek 56. Superpozycja struktur oktaedrycznych wody obecnych w modelach WT_T_AMP (zielony) i WT_R_F6P (niebieski).



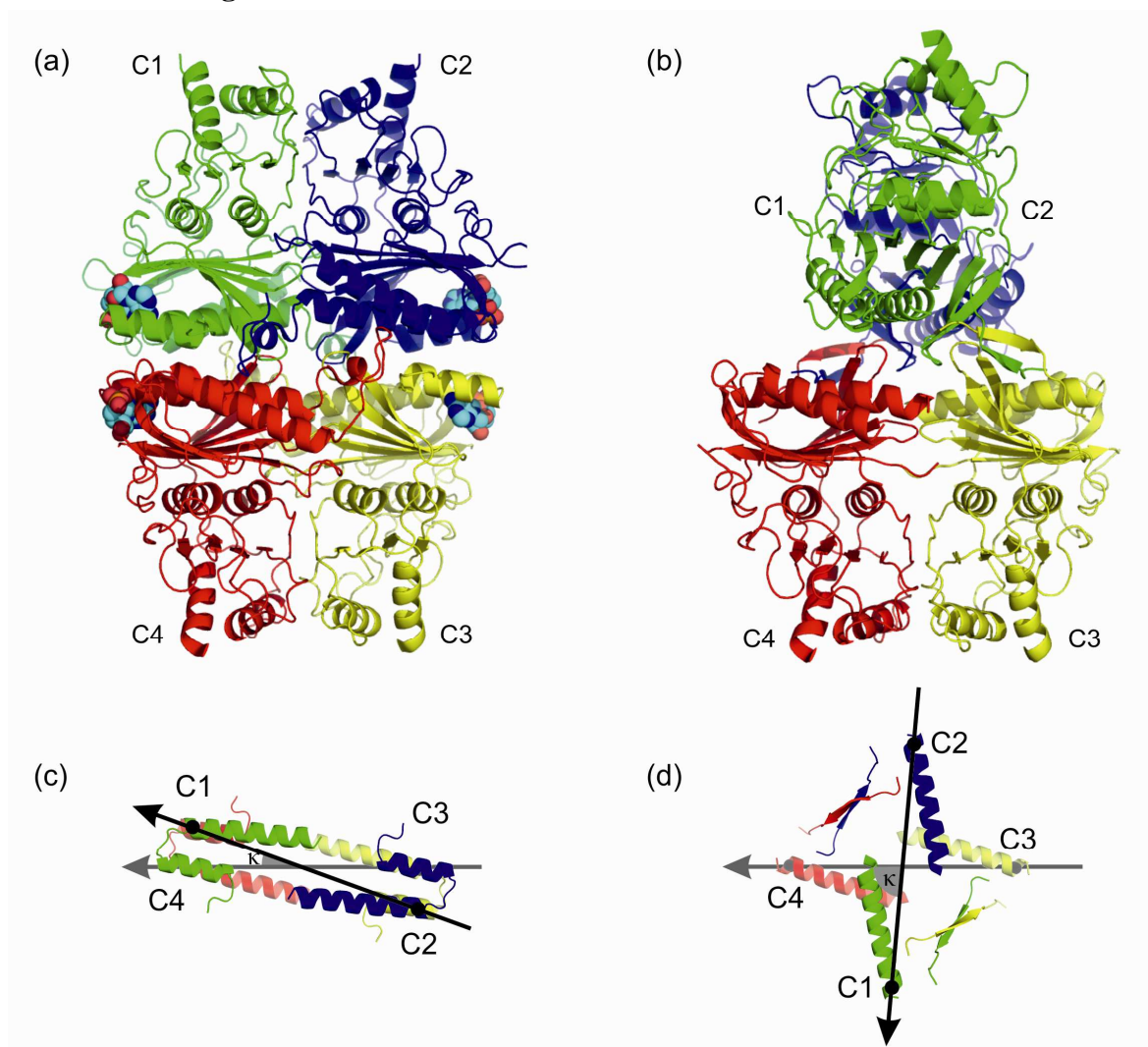
Rysunek 57. Zestawienie kątów w strukturze oktaedrycznej wody w modelach FBPazy w stanie R (A) i stanie T (B).

Dokładna analiza bezpośredniego otoczenia oktameru cząsteczek wody pokazuje, że tworzą one dodatkowe wiązania wodorowe z resztami Glu213, Arg243 i Tyr244. Przedstawiona przeze mnie struktura wody oktaedrycznej obecna jest również w niektórych zdeponowanych w PDB strukturach FBPazy wątrobowej (np. 4MJO).

Oktaedryczna struktura wody jest znaną jej formą strukturalną [Benson et al., 1992; Blanton et al., 1999]. Powstaje ona z dwóch tetraedrów, które tworzą w dimerze FBPazy rodzaj amortyzatora zapewniającego stabilność struktury domen katalitycznych podczas przejścia enzymu pomiędzy stanami R i T.

6.4. TETRAMER

6.4.1. Budowa ogólna



Rysunek 58. Tetramer FBPazy w formie T (a) i formie R (b). Kąt κ pomiędzy wektorami C2C1 i C3C4 w stanie T (c) i R (d).

Tetramer składa się z dwóch dimerów oddziałujących ze sobą poprzez domeny allosteryczne. W centrum tetramery znajduje się kieszeń hydrofobowa utworzona przez reszty zlokalizowane na końcu C helisy α_2 , pętle L9 oraz reszty na końcu N pętli L2. Kieszeń hydrofobowa jest rejonem bardzo zachowawczym i jest obecna we wszystkich znanych FBPazach. Badania przeprowadzone na enzymie wątrobowym wykazują, że rejon ten pełni istotną rolę podczas przechodzenia FBPazy pomiędzy stanami R i T [Gao et al., 2014]. Oprócz oddziaływań hydrofobowych stan T FBPazy stabilizują również wiązania wodorowe pomiędzy podjednostką C1 i C4 oraz analogicznie C2-C3 (Tabela 42).

W stanie R oddziaływania te znikają, a w ich miejsce tworzą się oddziaływania między podjednostkami C1-C3 oraz C2-C4 (Tabela 43).

Tabela 42. Oddziaływania pomiędzy podjednostkami C1-C4 w strukturach formy T.

C1/C4	Odległość [Å]	C4/C1
Arg15(Nη1)	2,70	(Oγ)Ser36
Arg15(Nη2)	2,81	(Oγ)Ser87
Arg22(Nε)	2,99	(O)Thr27
Gln32(Nε2)	2,98	(Oε1)Glu19
Gln32(Nε2)	3,01	(O)Arg15
Thr39(Oγ1)	3,24	(Oε2)Glu192
Tyr89(OH)	3,02	(Oδ2)Asp9
Ser36(Oγ)	2,85	(Nη1)Arg15
Ser87(Oγ)	2,77	(Nη1)Arg15
Thr27(O)	2,93	(Nε)Arg22
Glu19(Oδ1)	3,17	(Nε2)Gln32
Arg15(O)	2,97	(Nε2)Gln32
Glu192(Oδ2)	2,89	(Oγ1)Thr39
Glu192(Oδ2)	2,88	(Nε)Lys42
Asp9(Oδ1)	3,02	(OH)Tyr89
Lys42(Nε)	2,89	(Oε2)Glu192
Lys109(Nε)	3,07	(Oδ2)Asp9

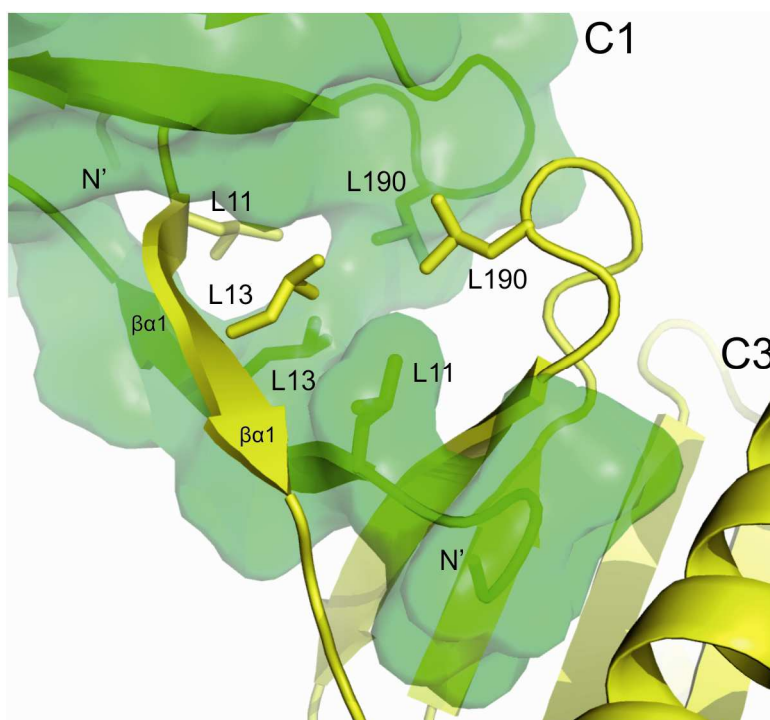
Tabela 43. Oddziaływania pomiędzy podjednostkami C1-C3 w strukturach formy R.

C1/C3	Odległość [Å]	C3/C1
Thr8(Oγ)	2,72	(O)Tyr16
Asp9(N)	3,36	(Oδ)Asn35
Leu11(N)	2,88	(O)Phe193
Thr12(N)	2,78	(O)Thr14
Thr14 (Oγ)	3,09	(O)Thr12
Tyr16(N)	2,90	(O)Met10
Phe193(N)	2,85	(O)Asp9
Leu195(N)	2,87	(O)Leu11
Lys42(Nε)	3,89	(Oδ)Asp9

W stanie T dimery są obrócone względem siebie o kąt $\kappa = +22^\circ$, co jest porównywalne z sytuacją w enzymie wątrobowym. W aktywnej FBPazie (stan R) dimery ułożone są w stosunku do siebie niemal prostopadle (Rysunek 58), odmiennie do stanu R izoenzymu wątrobowego ($\kappa = 0^\circ$).

6.4.2. Zatrząsk leucynowy

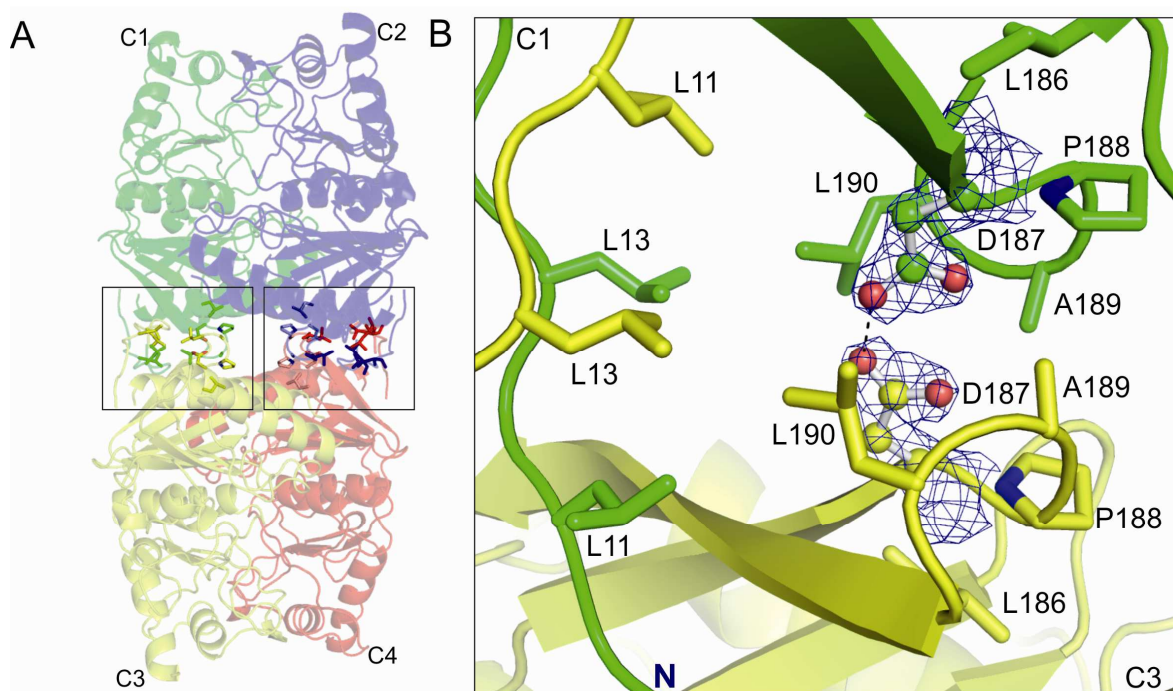
W następstwie przejścia FBPazy ze stanu T do R fragmenty na końcach N podjednostek C1 i C3 oraz C2 i C4 zbliżają się do siebie, tworząc rejon hydrofobowy, który nazwałem „zatrząskiem leucynowym”. Nazwa nawiązuje do charakterystycznego ułożenia sześciu reszt leucynowych, trzech z każdej podjednostki. Znajdujące się na końcu N reszty Leu11 i Leu 13 oddziałują z resztą Leu190 z pętli L9 drugiej podjednostki (Rysunek 59).



Rysunek 59. Zatrząsk leucynowy pomiędzy podjednostkami C1 (zielona) oraz C3 (żółta) w stanie R.

W enzymie wątrobowym nie ma możliwości utworzenia takiego zatrząsku ze względu na inną sekwencję aminokwasową. Leucyna 190 jest zastąpiona przez izoleucynę, natomiast w pozycji 11 mamy asparaginę, której polarny łańcuch boczny uniemożliwia utworzenie hydrofobowych oddziaływań. Jedynie leucyna 13 występuje w obu izoenzymach. Analizując budowę zatrząsku zaobserwowałem, że stanowi on część większego rejonu hydrofobowego, w skład którego wchodzi reszty aminokwasowe z końca C łańcucha β6 oraz pętli L9. Główną funkcją tego rejonu jest odseparowanie od cząsteczek wody reszt kwasu asparaginowego Asp187, które odgrywają istotną rolę w przejściach pomiędzy stanem R i T.

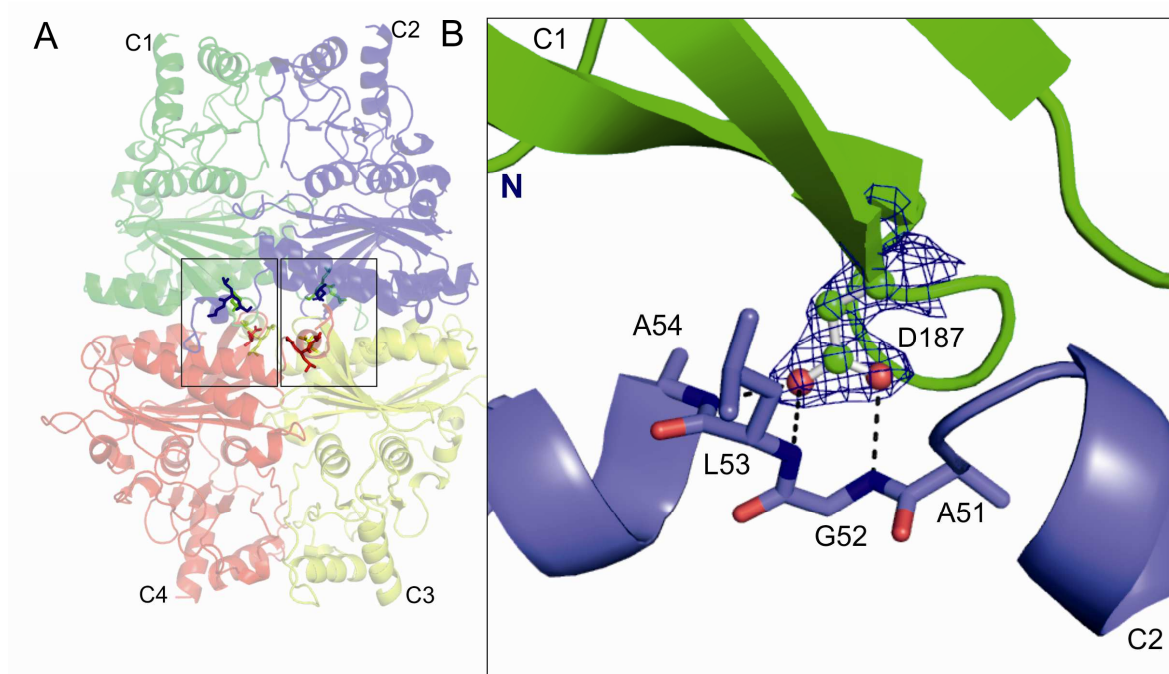
W stanie R, reszty Asp187 podjednostek C1 i C3 (oraz C2 i C4) znajdują się w bardzo bliskiej odległości. Odległość między parą atomów tlenu (O δ 2...O δ 2) wynosi 2,40 Å (Rysunek 60B). Porównując te odległości z długościami najsilniejszych wiązań wodorowych [Jaskolski et al., 1978] można stwierdzić, że tak bliski kontakt pomiędzy ujemnie naładowanymi resztami kwasowymi jest niemożliwy. Sugeruje to pełną lub połowiczną protonację reszt Asp187. Pełnej protonacji przeczy jednak fakt, że odległość pomiędzy drugą parą atomów tlenu (O δ 1...O δ 1) wynosi 3,17 Å, podczas gdy dwie protonowane reszty kwasu karboksylowego powinny utworzyć dimer z porównywalnymi odległościami O...O. Również pH roztworu krystalizacyjnego (pH 7,4) jest nie do pogodzenia z utrzymaniem w pełni protonowanej grupy karboksylowej (pKa ~3,9). Konkludując można stwierdzić, że reszty Asp187 są protonowane tylko w połowie.



Rysunek 60. (A) Umieszczenie Zatrząsków Leucynowych w tetramerze FBPazy w stanie R. (B) Oddziaływanie końców N podjednostek C1 (zielona) i C3 (żółta). Umieszczenie reszt Asp187 w obrębie rejonu hydrofobowego. Reszty kwasu asparaginowego przedstawione są w mapie gęstości elektronowej 2Fo-Fc o konturze 1.0 σ .

Gdy tetramer FBPazy przechodzi ze stanu R do T, dimer „górny” obraca się względem dimeru „dolnego”. W wyniku obrotu końce N podjednostek C1 i C3 oddalają się od siebie, powodując zanik zatrząsku leucynowego i odblokowanie reszt Asp187, które w kontakcie z rozpuszczalnikiem o fizjologicznym pH ulegają deprotonacji. Po przejściu tetrameru w stan T oraz pętli katalitycznej w pozycję disengaged, Asp187 z podjednostki

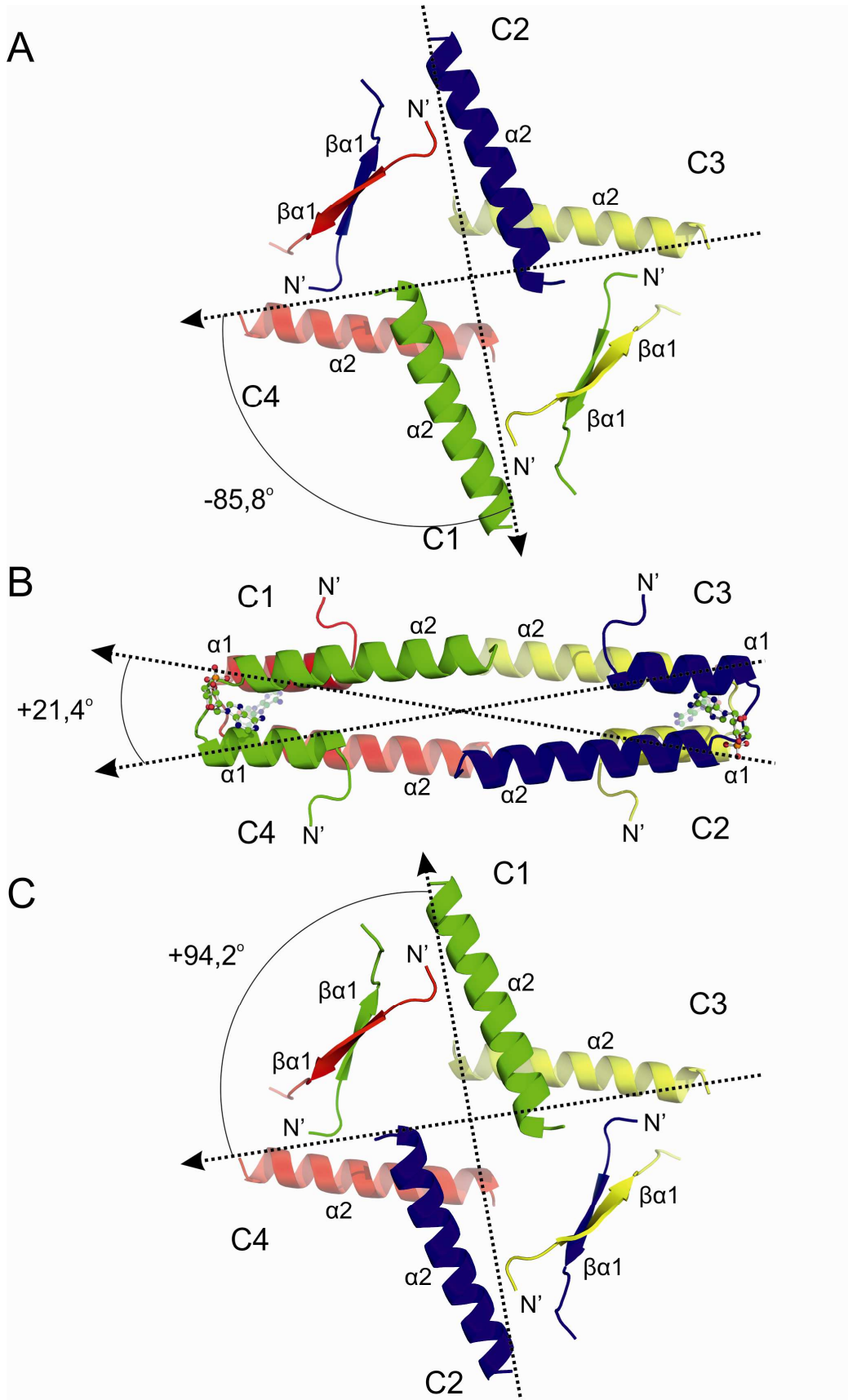
C1 znajduje się w sąsiedztwie pętli L2 z podjednostki C2. Tworzą się wiązania wodorowe N-H...O pomiędzy łańcuchem głównym Ala52-Gly53-Leu54 a łańcuchem bocznym Asp187 (Rysunek 61B). Oddziaływania te stabilizują pętle L2 w pozycji disengaged i uniemożliwiają jej udział w katalizie reakcji.



Rysunek 61. (A) Umiejscowienie oddziaływań podjednostek w tetramercie FBPazy w stanie T. (B) Oddziaływanie Asp187 z podjednostki C1 (zielona) z resztami aminokwasowymi pętli L2 podjednostki C2 (niebieska). Reszta kwasu asparaginowego przedstawiona jest w mapie gęstości elektronowej 2Fo-Fc o konturze 1.0σ. Obraz na panelu B przedstawiony jest pod innym kątem niż na panelu A.

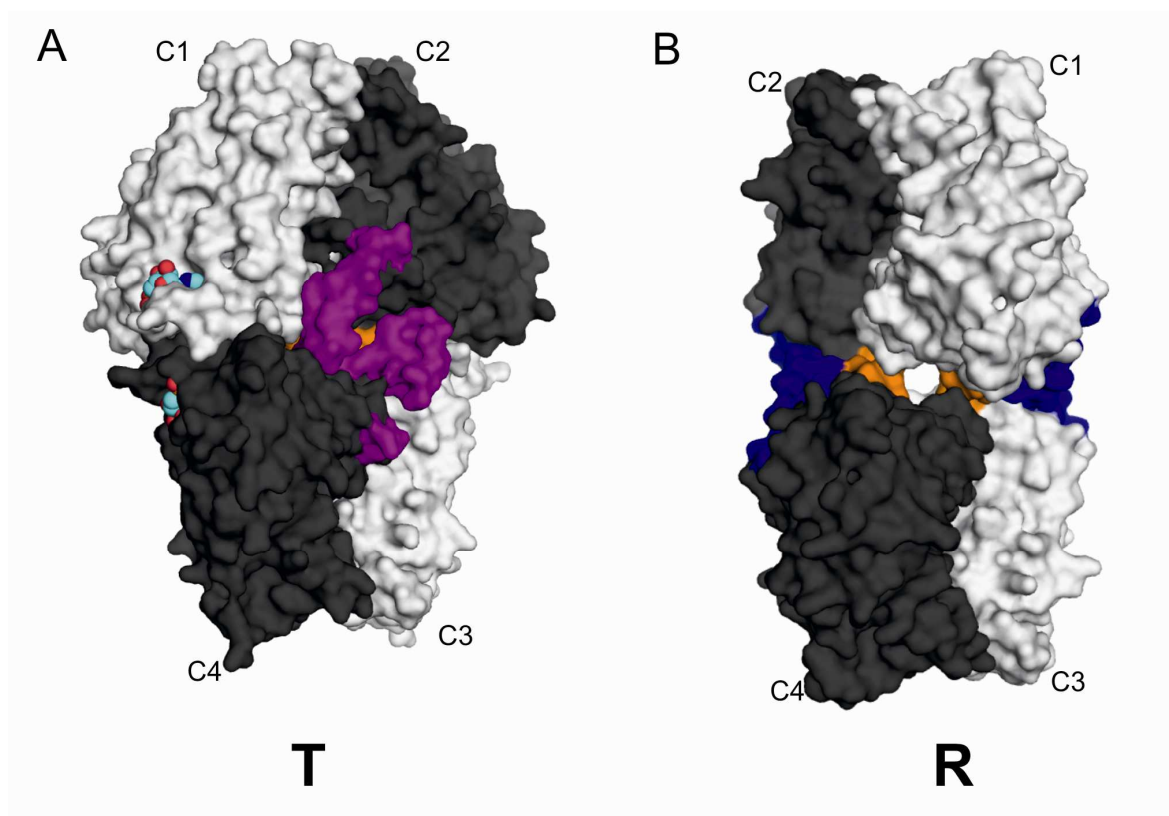
6.4.3. Obrót dimer-dimer

Istotnym zagadnieniem dotyczącym budowy tetramerów FBPazy w stanach R i T jest określenie kierunku obrotu dimerów względem siebie. W przypadku bardzo dobrze poznanego izoenzymu wątrobowego obrót dimeru C1C2 względem nieruchomego dimeru C3C4 odbywa się, dla przejścia z T do R, przeciwnie do ruchu wskazówek zegara o kąt ok. -20° (Cárcano, 2000). W przedstawionych przeze mnie strukturach izoenzymu mięśniowego dimery w stanie R są niemal prostopadłe do siebie. Przyjmując za punkt wyjścia stan T (Rysunek 62B) widzimy, że przy obrocie w prawo (Rysunek 62C) kąt pomiędzy podjednostką C1 a C4 zwiększyłby się o $72,8^\circ$. Gdyby obrót nastąpił w lewo wówczas zmiana kąta wynosiła by aż $107,2^\circ$ (Rysunek 62A).



Rysunek 62. Porównanie położenia helis $\alpha1$, $\alpha2$ oraz końca N w tetramerze FBPazy w formie R po obrocie w lewo (A), w formie T (B) oraz w formie R po obrocie w prawo (C).

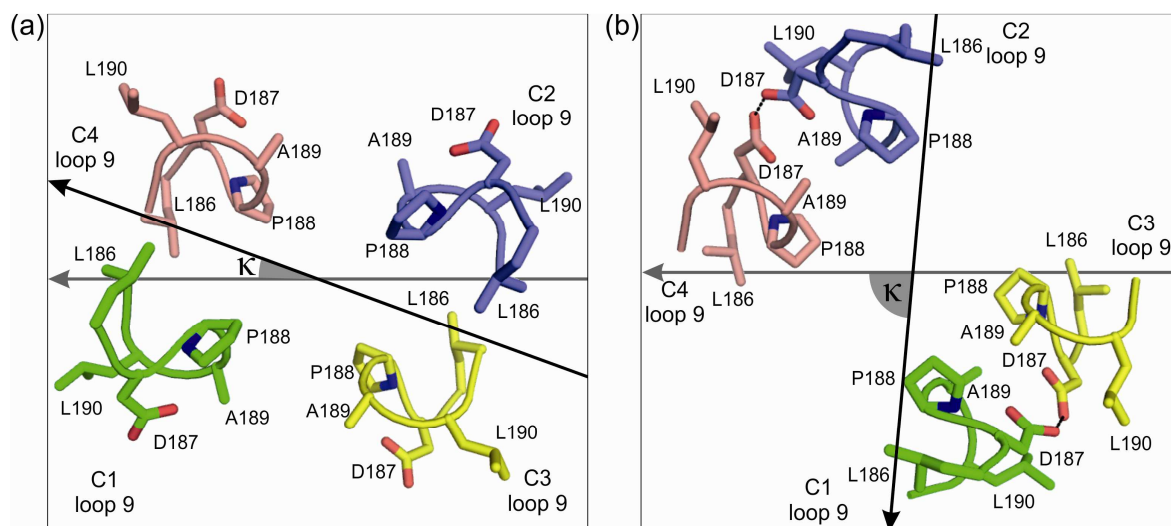
Chcąc odpowiedzieć na pytanie, w którą stronę następuje obrót postanowiłem przeanalizować wszystkie argumenty za i przeciw. Okazuje się, że za obrotem dimeru C1C2 w prawo przemawia tylko mniejsza zmiana kąta κ , która może być korzystniejsza energetycznie. Jednakże dotychczas nie zaobserwowano w FBPazach obrotu dimerów względem siebie w prawo podczas przejścia z formy T do R.



Rysunek 63. (A) Umieszczenie pętli L2 (fioletowy) oraz zatrząsków leucynowych (niebieski) w strukturze FBPazy w stanie T (a) i R (b). Kolorem pomarańczowym na obu panelach zaznaczone są pętle L9.

Analizując strukturę formy R i T izoenzymu mięśniowego można stwierdzić, że zarówno stan T ($\kappa=+21,4^\circ$) jak i stan R ($\kappa=-85,8^\circ$) są skrajnymi stanami stabilizowanymi przez specyficzne dla siebie oddziaływania (Rysunek 63). Dla stanu R jest to „zatrząsk leucynowy”, natomiast dla stanu T są to pętle L2 znajdujące się w pozycji „disengaged”. Podczas przejścia ze stanu T do R, gdy pętla L2 przechodzi w pozycję disordered, zanika zawada przestrzenna blokująca ruch dimerów. Jednak w tym momencie możliwy jest tylko obrót w lewo, przeciwnie do ruchu wskazówek zegara. Spowodowane jest to obecnością swego rodzaju „odbojników” utworzonych przez reszty aminokwasowe z pętli L9 (Rysunek 64A). Po przejściu FBPazy w stan R tworzą się dwa „zatrząski leucynowe”,

w których wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchami bocznymi Asp187 uniemożliwiają dalszy obrót dimerów (Rysunek 64B).

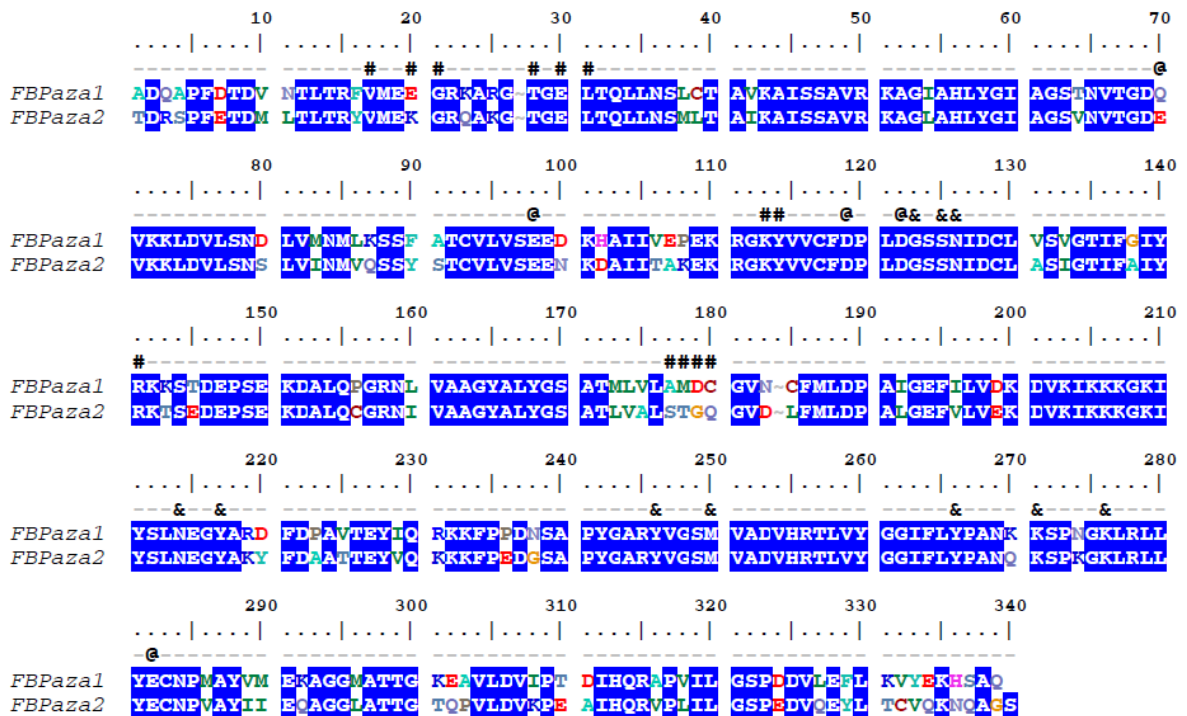


Rysunek 64. Budowa „odbojników” pętli L9 w strukturze FBPazy w stanie T (a) i stanie R (b). Wektory C2→C1 (czarna linia) oraz C3→C4 (szara linia) pokazują orientację dimerów górnego (C1C2) i dolnego (C3C4).

6.5. MECHANIZM PRZENOSZENIA SYGNAŁU AKTYWACJI/INHIBICJI

Ludzka mięśniowa FBPaza jest enzymem, który w normalnych warunkach fizjologicznych pozostaje nieaktywny. Struktury formy T(+AMP), T(-AMP) oraz R pozwalają zaproponować molekularny mechanizm aktywacji enzymu oraz podstawy jego zwiększonej podatności na inhibicję przez AMP.

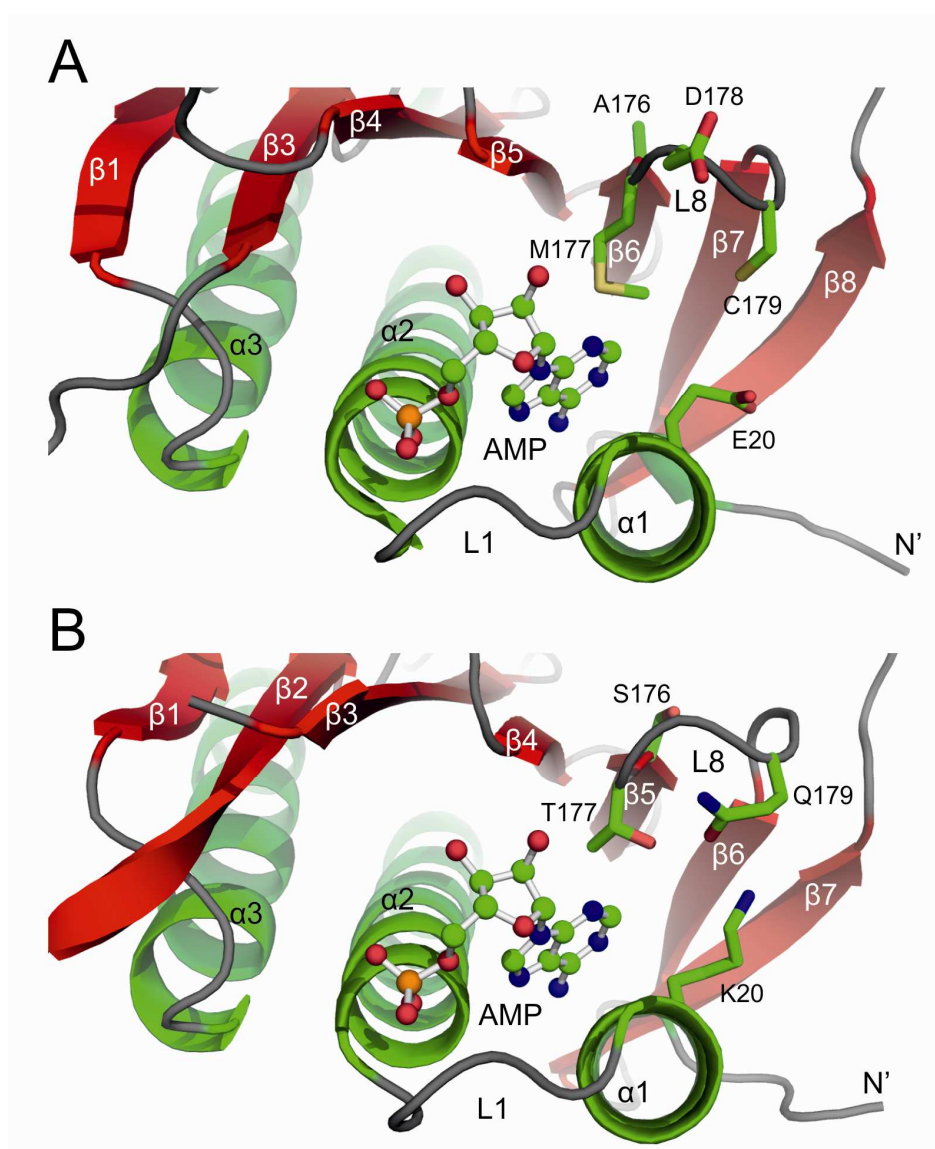
Izoenzymy FBPazy wykazują stosunkowo wysoki stopień identyczności sekwencji aminokwasowej (Rysunek 65). W przypadku enzymów ludzkich 23% różnicy w sekwencji aminokwasowej przekłada się na 78 różnych reszt aminokwasowych rozrzuconych po całej sekwencji.



Rysunek 65. Porównanie sekwencji aminokwasowych ludzkich FBPaz wątrobowej i mięśniowej. Identyfikacja wynosi 77%, podobieństwo 89%. Reszty biorące udział w wiązaniu AMP (#), jonów Mg²⁺ (@) oraz substratu (&). Niebieski kolor tła oznacza identyczność według macierzy BLOSUM62.

Porównanie rozwiązanych przeze mnie struktur formy R z substratem (F-1,6-BP) i produktem (F-6-P) ze strukturami enzymu wątrobowego pokazuje, że pomimo dużych zmian w aranżacji tetrameru miejsce aktywne pozostaje niezmiennione. Z powyższych obserwacji wynika, że przyczyn zwiększonej podatności enzymu mięśniowego na hamowanie przez AMP należy szukać w domenie allosterycznej, ponieważ to w jej obrębie dochodzi do największych zmian podczas przejścia FBPazy ze stanu T do R.

Największe różnice sekwencyjne obserwujemy w obrębie reszt aminokwasowych biorących udział w wiązaniu nukleotydu. W pozycji 20 w izoenzymie wątrobowym występuje reszta kwasu glutaminowego, a w enzymie mięśniowym zasadowa reszta lizyny. Dodatkowo znaczące różnice występują w resztach tworzących pętle L8. W FBPazie1 występuje sekwencja Ala176-Met177-Asp178-Cys179, podczas gdy w FBPazie2 mamy sekwencję Ser176-Thr177-Gly178-Gln179. Ta różnica powoduje zmianę w otoczeniu miejsca wiązania AMP (Rysunek 66). Wskazuje ona również na potencjalną możliwość aktywacji enzymu poprzez fosforylację reszt seryny lub treoniny w miejscu wiązania nukleotydu. Taką możliwość regulacji aktywności FBPazy *in vivo* poprzez fosforylację konkretnej treoniny lub seryny już postulowano [Ekdahl, 1987; 1988; Rakus, 2003].



Rysunek 66. Porównanie wiązania AMP w enzymie wątrobowym (A) oraz mięśniowym (B).

Przyłączenie AMP do enzymu wątrobowego nie prowadzi do powstania wiązania wodorowego pomiędzy inhibitorem a pętlą L8, a ponadto reszta kwasu glutaminowego Glu20 nie tworzy stabilizującego wiązania z pętlą L8, przez co nukleotyd jest słabiej przyłączony do enzymu wątrobowego.

W wyniku odłączenia AMP od jednej z podjednostek (np. C1) FBPazy w formie T ulega rozpleceniu helisa $\alpha 1$ na końcu N oraz zanikają oddziaływania z pętlą L8. Podobnie jak w enzymie wątrobowym helisy $\alpha 2$ i $\alpha 3$ zmieniają swoją pozycję, powodując przejście pętli katalitycznej L2 w stan disordered. Na skutek wiązania pomiędzy łańcuchem głównym reszt Ala52-Gly53-Leu54 z pętli L2 a kwasem asparaginowym Asp187 z podjednostki C2, przemieszczeniu do środka tetrameru ulega pętla L9. W efekcie tego ruchu zmienia się objętość kieszeni hydrofobowej. Zmiany te powodują obrót dimerów względem siebie. W efekcie tego obrotu następuje wytworzenie dwóch „zatrząsków leucynowych”, które stabilizują tetramer FBPazy w formie R za pomocą wiązań wodorowych Asp187...Asp187. Dodatkowo zmiany ułożenia pętli L9 wywołują zmiany w położeniu pętli L7, która przenosi sygnał na aminokwasy pętli L5 podjednostki C2. Zmiany w pętli L5 powodują dalsze zmiany w miejscu wiązania substratu, w efekcie czego fruktozo-1,6-bisfosforan zostaje właściwie rozpoznany, a grupa fosforanowa przy atomie węgla 1 wraz z kwasowymi resztami Glu68, Glu97, Asp118, Asp121 i Glu280 tworzy nukleofilową kieszeń, do której mogą przyłączyć się jony magnezu niezbędne do przeprowadzenia hydrolizy.

Krótkie nasączenie kryształów kompleksu FBPazy z AMP pozwoliło uchwycić moment, w którym dimery nie uległy jeszcze przemieszczeniu, ale sieć kryształu zaczęła już się zmieniać. W strukturze brakuje gęstości elektronowej części miejsca wiązania nukleotydu oraz pętli katalitycznej L2. Obserwujemy również drastyczne pogorszenie zdolności dyfrakcyjnych kryształu z 1,84 do 3 Å. Długotrwałe nasączenie jonami magnezu powodowało rozpuszczanie kryształu. Dzieje się tak, ponieważ w efekcie uwolnienia AMP i przejścia pętli w stan disordered następuje obrót dimerów czyli zmiana konformacji z T na R. Zmiana konformacji enzymu powoduje destabilizację sieci krystalicznej, w efekcie czego kryształ rozpada się. W stanie R również nie obserwujemy gęstości elektronowej pętli L2. Widzimy natomiast, że po rozfałdowaniu helisa $\alpha 1$ na końcu N oddziałuje z identycznym fragmentem z innej podjednostki tworząc dwie struktury $\beta\alpha 1$. Wiąże się to z faktem wymycia z białka AMP przed krystalizacją oraz zastosowania podczas nasączenia kryształów ligandami jonów Ca^{2+} , które odpowiedzialne są za blokowanie ruchu pętli.

Łatwość uzyskiwania kryształów FBPazy w kompleksie z AMP wskazuje, że stan T jest uprzywilejowany termodynamicznie gdy w miejscu wiązania nukleotydu znajduje się AMP. Rozpad kryształu pod wpływem działania jonów Mg^{2+} świadczy o tym, że wypłukanie AMP destabilizuje formę T, a obrót dimerów jest dążeniem enzymu do uzyskania kolejnego stanu równowagi, stanu R.

7. PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiłem wyniki badań krystalograficznych rekombinowanej ludzkiej mięśniowej fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu.

Nadekspresję białka (FBPazy) prowadziłem w komórkach *E. coli* używając konstruktów, który otrzymałem z Zakładu Fizjologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Białko oczyszczano metodą frakcjonowania siarczanem amonu oraz chromatografią powinowactwa. Czysty preparat FBPazy zawierał pewną ilość AMP, która wystarczyła do wysycenia wszystkich miejsc wiązania nukleotydu w białku i uzyskania nieaktywnego enzymu, który jako pierwszy został poddany krystalizacji. W celu odblokowania FBPazy inkubowałem białko w roztworze zawierającym jony Mg^{2+} oraz zastosowałem sączenie molekularne na kolumnie HiLoad200. Tak otrzymaną aktywną FBPazę również poddałem krystalizacji. Otrzymałem dwa rodzaje kryształów. Nieaktywny enzym z AMP (stan T) krystalizował w układzie rombowym, natomiast FBPaza aktywna (stan R) w układzie tetragonalnym. Zarejestrowane dane dyfrakcyjne pozwoliły rozwiązać struktury enzymu mięśniowego w dwóch stanach, T i R. Struktura FBPazy w stanie T okazała się niemal identyczna ze strukturą nieaktywnego ludzkiego enzymu wątrobowego. Tetramer zawiera cztery cząsteczki AMP, pętla katalityczna znajduje się w położeniu disengaged, a kąt skręcenia dimeru „górnego” w stosunku do „dolnego” (κ) wynosi około 21° . Kryształy FBPazy w stanie T nasączałem dodatkowo roztworem jonów Mg^{2+} w celu usunięcia cząsteczek AMP. Krótkie nasączenie spowodowało zmianę zdolności dyfrakcji kryształów z 1,84 do 2,99 Å, czego nie obserwowałem przy nasączaniu kryształów innymi związkami (np. Ca^{2+} , F-1,6-BP). W rozwiązanej strukturze nie ma cząsteczek AMP, miejsce wiązania nukleotydu uległo częściowej zmianie, pętla katalityczna jest w stanie disordered choć nie nastąpił jeszcze obrót dimerów względem siebie. Struktura FBPazy mięśniowej w stanie R okazała się diametralnie różna od struktury enzymu wątrobowego w tej formie. Pętla katalityczna znajduje się w położeniu disordered, a kąt skręcenia dimerów górnego w stosunku do dolnego (κ) wynosi około -85° . Kryształów FBPazy w stanie R użyłem dodatkowo do ustalenia struktury aktywnego enzymu mięśniowego z substratem i produktem katalizowanej przez niego reakcji. W tym celu nasączałem kryształy roztworami odpowiednich ligandów (F6P i F-1,6-BP) wzbogaconymi o jony Ca^{2+} , które

miały zapobiec przejściu pętli katalitycznej w położenie engaged i zajściu reakcji defosforylacji.

Rozwiązałem też i udokładniłem trzy struktury mutantu E69Q ludzkiej mięśniowej FBPazy w stanie R. Kryształy tego białka otrzymano według tej samej procedury co kryształy natywnej FBPazy w stanie R. Kryształy mutantu były również nasączone roztworami substratu i produktu reakcji wzbogaconymi o jony Ca^{2+} . Struktury FBPazy natywnej i mutantu E69Q są identyczne. Sumarycznie rozwiązałem osiem struktur krystalicznych ludzkiej mięśniowej FBPazy, z czego trzy dla mutantu E69Q i pięć dla enzymu o sekwencji natywnej. W dwóch przypadkach enzym przyjął nieaktywną formę T, natomiast w pozostałych przypadkach jest on w stanie R.

Zauważyłem, że źródłem stabilności domen katalitycznych podczas przejścia enzymu ze stanu aktywnego w nieaktywny jest osiem cząsteczek wody tworzących oktaedryczną strukturę. Pełni ona rolę amortyzatora zmian strukturalnych w obrębie dimeru FBPazy. Analizując oddziaływania pomiędzy protomerami w stanie R, znalazłem nową formę oddziaływania podjednostek C1-C3 (C2-C4), którą nazwałem „zatrzaskiem leucynowym”. Spełnia on rolę stabilizującą tetramer w stanie R, a jednocześnie izoluje od cząsteczek wody resztę Asp187, która odgrywa kluczową rolę w mechanizmie aktywacji i inhibicji ludzkiej mięśniowej FBPazy. W stanie T reszta kwasu asparaginowego 187 stabilizuje pętlę katalityczną w pozycji disengaged. Oddziaływanie to ma miejsce w parach protomerów C1-C2 i C3-C4. W stanie R Asp187 oddziałuje z taką samą resztą z drugiej podjednostki tworząc wiązanie wodorowe stabilizujące formę krzyżową tetrameru. Oddziaływanie to zachodzi pomiędzy protomerami C1-C3 oraz C2-C4. Szczegółowa analiza i porównania odpowiednich rejonów rozwiązanych struktur, w szczególności obu struktur stanu T, pozwoliła wykazać, że przejście ze stanu T do R rozpoczyna się po usunięciu cząsteczek AMP z miejsca allosterycznego. W efekcie usunięcia nukleotydów następują liczne zmiany w domenach allosterycznych podjednostek tetrameru. Obserwując takie ruchy w kryształach można się spodziewać, że in vivo sytuacja przebiega podobnie. W komórce jednak nie jest możliwe, by odblokowanie FBPazy następowało na skutek wzrostu stężenia jonów magnezu. Jednym z obecnie postulowanych możliwych mechanizmów odblokowania enzymu jest utworzenie kompleksu FBPazy z aldolazą. W następstwie tego oddziaływania FBPaza mięśniowa staje się niewrażliwa na hamowanie przez AMP. Mechanizm tego odblokowania pozostaje jeszcze nieznanym.

FBpaza, enzym znany od ponad 80 lat, pozostaje ciągle atrakcyjnym obiektem badawczym. Przedstawione przeze mnie wyniki znajdują potwierdzenie w najnowszych badaniach. Opublikowana niedawno struktura ludzkiej wątrobowej FBPazy w stanie R (PDB: 5LDZ) [Ruf, 2016] potwierdza, że po odłączeniu AMP z miejsca wiązania nukleotydu następują zmiany struktur II-rzędowych na końcu N białka.

8. STRESZCZENIE

Fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanu jest kluczowym allosterycznym enzymem szlaku gliko- i glukoneogenezy, występuje prawie we wszystkich organizmach. Katalizuje nieodwracalną reakcję hydrolizy fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu oraz bierze udział w regulacji metabolizmu energetycznego i homeostazy. Wszystkie FBPazy do swojej aktywności katalitycznej wymagają jonów metali dwuwartościowych (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}). Jako jeden z kluczowych enzymów ważnych dla utrzymania glukostazy FBPaza znajduje się pod kontrolą dwóch antagonistycznych hormonów: insuliny i glukagonu. Hormony te kontrolują wytwarzanie i degradację inhibitora kompetycyjnego FBPazy fruktozo-2,6-bisfosforanu (F-2,6-BP). Aktywność enzymu jest również inhibowana przez AMP i jony Ca^{2+} .

U ssaków istnieją dwa izoenzymy: wątrobowy i mięśniowy kodowane przez dwa różne geny. Białka te różnią się kinetyką i własnościami immunologicznymi, jak również składem aminokwasowym. Mięśniowa FBPaza jest około 100 razy bardziej wrażliwa na działanie inhibitora allosterycznego i około 1000 razy bardziej wrażliwa na hamowanie przez jony Ca^{2+} niż enzym wątrobowy. Pomimo, że FBPaza znana jest od ponad 80 lat, a liczba zdeponowanych w banku danych PDB jej struktur przekracza 80, znacznie więcej wiadomo o strukturze i funkcji izoenzymu wątrobowego niż mięśniowego.

Celem mojej pracy było poznanie struktury ludzkiej mięśniowej FBPazy. W wyniku przeprowadzonych badań rozwiązałem osiem struktur krystalicznych enzymu mięśniowego w różnych jego stanach. Na podstawie struktur nieaktywnej FBPazy w stanie T przedstawiłem zmiany konformacyjne, jakie zachodzą w obrębie podjednostek tetrameru FBPazy. Zmiany te zachodzą na skutek usunięcia z białka cząsteczek inhibitora AMP poprzez działanie jonami magnezu. Dodatkowo rozwiązane struktury aktywnego enzymu w stanie R pozwoliło zrozumieć sposób stabilizacji tetrameru aktywnego enzymu. Pomędzy dimerami górnym i dolnym tworzą się specyficzne oddziaływania, które nazwałem „zatrzaskiem leucynowym”. Jego utworzenie jest możliwe dzięki niemal prostopadłemu ułożeniu dimerów względem siebie, będącego następstwem obrotu podjednostek mającego miejsce w trakcie aktywacji enzymu. Hydrofobowy "zatrzask leucynowy" ułatwia tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy kluczowymi resztami Asp187, które bez takiej ochrony nie mogłoby powstać. Ponadto, za pomocą trzech

struktur ludzkiej mięśniowej FBPazy, wykazałem, że wiązanie AMP do enzymu jest połączone z II-rzędowymi zmianami na końcu N białka.

9. ABSTRACT

Glucose is the main energy source in mammals where its homeostasis in blood is maintained by the balance of catabolic glycolysis on the one side and gluconeogenesis on the other hand. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) is an allosteric enzyme crucial for gluco- and glyconeogenesis pathways. It occurs almost in all living organisms. It catalyzes non-reversible hydrolysis of fructose-1,6-bisphosphate to fructose-6-phosphate and inorganic phosphate. Moreover, the enzyme plays a key role in the control of energy metabolism and glucose homeostasis. All FBPases require divalent cations, such as Mg^{2+} , Mn^{2+} or Zn^{2+} , for their activity to further enhance the catalysis. As one of the key enzymes vital for maintaining of glucose homeostasis, FBPase is permanently under the control of two reciprocally antagonistic hormones: insulin and glucagon. They both control the production and degradation of a competitive inhibitor of FBPase, fructose-2,6-bisphosphate (F-2,6-BP). Furthermore, the enzyme activity is regulated by two other inhibitors, AMP and Ca^{2+} .

Vertebrate genomes contain two distinct genes for two FBPase isozymes of liver and muscle. These proteins differ in the kinetics and immunological properties, as well as amino acid sequence. In addition muscle FBPase is about 100 times more susceptible to allosteric inhibitors and about 1000 times more sensitive to inhibition by Ca^{2+} than the liver isozyme. FBPases form a homotetramer of 222 symmetry with an upper and a lower dimer. The dimers can rotate with respect to each other, leading to the inactive T-state and active R-state conformations of FBPase. Despite of wealth biochemical and structural data accumulated mostly for liver FBPase in last half century, the molecular basis for a mechanism of their action is not clear.

The aim of my Ph.D. thesis was to investigate the structure of human muscle FBPase. In the course of studies I solved eight crystal structures of the muscle enzyme in its various states. On the basis of the structures of inactive FBPase in T-state, I was able to describe and map the conformational changes that occur within the tetramer of FBPase. These changes occur due to the removal of the AMP inhibitor from protein molecules as a consequence of the addition of magnesium ions. Furthermore, the fact that I was able to solve the structure of the active enzyme in the R-state gave me the unique possibility to understand the equilibrium state for the active enzyme in the tetrameric form. The upper and lower dimers form specific interactions which I called the "leucine lock".

Its formation is possible by almost perpendicular orientation of the dimmers on relative to each other, following a subunits rotation during the activation of the enzyme. The hydrophobic “leucine lock” allows the creation of a hydrogen bond between the key residues, Asp187, which could not be created without such protection. In addition, using snapshots from three crystal structures of human muscle FBPase, I could demonstrate that the AMP-binding event is correlated with a $\beta \rightarrow \alpha$ transition at the N-terminus of the protein and with the formation of a new helical structure.

10. BIBLIOGRAFIA (203 pozycje)

- Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-Garcia C, Fernández-fernandez C, Ameneiros-Ratriguez E. (2016) Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical* 5:85-100.
- Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta CrystD* 68:352-367.
- Allen FH. (2002) The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst B* 58:380-388.
- Al-Robaiy S, Eschrich K. (1999) Rat muscle fructose-1,6-bisphosphatase: cloning of the cDNA, expression of the recombinant enzyme, and expression analysis in different tissues. *Biol Chem* 380:1079-1085.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1994) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons New York 1:4.7.1-4.7.6.
- Babul J, Guixe V. (1983) Fructose bisphosphatase from *Escherichia coli*. Purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* 225: 944-949.
- Baier D and Latzko E. (1975) Properties and regulation of C-1 fructose 1,6 diphosphatase from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 396(1):141-148.
- Baker L, Winegrad AI. (1970) Fasting hypoglycaemia and metabolic acidosis associated with deficiency of hepatic fructose-1,6-diphosphatase activity. *Lancet* 2 (7662): 13-16.
- Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T. (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res* 11(16):5784-92.
- Bartrons R, Hue L, Van Schaftingen E, Hers HG. (1983) Hormonal control of fructose-2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 214(3):829-837.
- Becker J, Klopprogge C, Zelder O, Heinzle E, Wittmann C. (2005) Amplified expression of fructose-1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl Environ Microbiol* 71(12):8587-8596.
- Bejtka M, Malinska D. (2011) Glikogenozy choroby genetyczne związane z zaburzeniami metabolizmu glikogenu. *Postępy biochemii* 57(2):148-156.
- Benkovic SJ, deMaine MM. (1982) Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 53:45-82.
- Benkovic SJ, Schray KJ. (1976) The anomeric specificity of glycolytic enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 44:139-164.

- Benson SW, Eleanor D. Siebert ED. (1992) A simple two-structure model for liquid water. *J. Am. Chem. Soc.* 114:4269–4276.
- Bie J, Liu S, Li Z, Mu Y, Xu B, Shen Z. (2015) Discovery of novel indole derivatives as allosteric inhibitors of fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur J Med Chem* 90:394-40.
- Blanton WB, Gordon-Wylie SW, Clark GR, Jordan KD, Wood JT, Geiser U, Collins TJ. (1999) Synthesis and Crystallographic Characterization of an Octameric Water Complex, (H₂O)₈. *J Am Chem Soc* 121:3551–3552.
- Botha FC, Turpin DH. (1990) Fructose 1,6-bisphosphatase in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol* 93:1460-1465.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brown G, Singer A, Lunin VV, Proudfoot M, Skarina T, Flick R, Kochinyan S, Sanishvili R, Joachimiak A, Edwards AM, Savchenko A, Yakunin AF. (2009) Structural and biochemical characterization of the type II fructose-1,6-bisphosphatase GlpX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 284(6):3784-92.
- Brünger AT. (1992) The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355:472-474.
- Bult C, White O, Olsen G, Zhou L, Fleischmann R, Sutton G, Blake J, FitzGerald L, Clayton R, Gocayne J, Kerlavage A, Dougherty B, Tomb J, Adams M, Reich C, Overbeek R, Kirkness E, Weinstock K, Merrick J, Glodek A, Scott J, Geoghagen N, Venter J. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273(5278):1058-73.
- Buschiazzo A, Ugalde JE, Guerin ME, Shepard W, Ugalde RA, Alzari PM. (2004) Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *EMBO J.* 23:3196-205.
- Cárcamo JG, Yañez AJ, Ludwig HC, León O, Pinto RO, Reyes AM, Slebe JC. (2000) The C1-C2 interface residue lysine 50 of pig kidney fructose-1, 6-bisphosphatase has a crucial role in the cooperative signal transmission of the AMP inhibition. *Eur J Biochem.* 267:2242-2251.
- Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst D* 66:12-21.
- Chhetri DR, Mukherjee AK, Adhikari J. (2006) Biosynthesis of myo-inositol in pteridophytes: Isolation and characterization of L-myo-Inositol -1-phosphate synthase from *Diplazium glaucum*. *Braz J Plant Physiol* 18(2):291-298.
- Chiadmi M, Navaza A, Miginiac-Maslow M, Jacquot J-P, Cherfils J. (1999) Redox signaling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase. *EMBO J* 18(23): 6809-6815.

- Choe J-Y, Fromm HJ, Honzatko RB. (2000) Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: Mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. *Biochemistry* 39:8565-8574.
- Choe J-Y, Poland BW, Fromm HJ, Honzatko RB. (1998) Role of a dynamic loop in cation activation and allosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 33:11441-11450.
- Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. (2010) Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. *Review Curr Opin Hematol* 1:36-42.
- Christian J. Hendriksz, Paul Gissen (2010) Glycogen storage disease. *Paediatrics and Child Health*. 21(2): 84-89) (Hasan Ozen (2007) Glycogen storage diseases: New perspectives. *World J Gastroenterol* 13(18): 2541-2553
- Conway T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Reviews* 103:1-28.
- Cori CF, Cori GT. (1929) Glycogen formation in the liver from d- and l-lactic acid. *J Biol Chem* 81:389-403.
- Csèke C, Buchanan BB. (1986) Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochem Biophys Acta* 853:43-63.
- Czech MP, Corvera S. (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274:1865-1868.
- Daie J. (1993) Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynthesis Res* 38:5-14.
- Dawson, RMC.; Elliot, DC.; Elliot, WH.; Jones, KM. (1986) *Data for Biochemical Research*. 3rd. Oxford: Oxford Science Publications, Clarendon Press 537
- DeLano WL. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Dobson GP, Hitchins S, Teague Jr WE. (2002) Thermodynamics of the pyruvate kinase reaction and the reversal of glycolysis in heart and skeletal muscle. *J Biol Chem* 277:27176-27182.
- Donahue JL, Bownas JL, Niehaus WG, Larson TJ. (2000) Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1, 6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:5624-5627.
- Douillard C, Mention K, Dobbelaere D, Wemeau JL, Saudubray JM, Vantyghem MC. (2012) Hypoglycaemia related to inherited metabolic diseases in adults. *Orphanet J rare Dis* 7:1-11.
- Dubin A. (2003) *Wprowadzenie do chemii białek*. Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. ISBN: 8388519387.

- Dzeja P, Terzic A. (2009) Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *Int J Mol Sci* 10(4):1729-1772.
- Dzugaj A, Kochman M. (1980) Purification of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim Biophys Acta* 614: 407-412.
- Dzugaj A. (2006) Localization and regulation of muscle fructose-1,6-bisphosphatase, the key enzyme of glyconeogenesis. *Adv Enzyme Regul* 46:51-71.
- Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P. (2013) Metabolism and the Circadian Clock converge. *Phys Rev* 93(1):107-135.
- Ekdahl K. (1987) Studies on the Regulation of Rat Liver Pyruvate Kinase and Fructose-1,6-Bisphosphatase. *J Med Sci* 92:217-232.
- Ekdahl K. (1988) In vitro phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase from rabbit and pig liver with cyclic AMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys* 262:27-31.
- El-Maghrabi MR, Austin LR, Correia JJ, Pilkis SJ. (1992) Lysine 274 is essential for fructose 2,6-bisphosphate inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 267:6526-6530.
- El-Maghrabi MR, Gidh-Jain M, Austin LR, Pilkis SJ. (1993) Isolation of a human liver fructose-1,6-bisphosphatase cDNA and expression of the protein in *Escherichia coli*. Role of ASP-118 and ASP-121 in catalysis. *J Biol Chem* 268:9466-9472.
- El-Maghrabi MR, Lange AJ, Jiang W, Yamagata K, Stoffel M, Takeda J, Fernald AA, LeBeau MM, Bell GL, Baker L, Pilkis SJ. (1995) Human fructose-1,6-bisphosphatase gene (FBP1): Exon-intron organization, localization to chromosome bands 9q22.2-q22.3, and mutation screening in subjects with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Genomics* 27:520-525.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Cryst D* 66:486-501.
- Engh RA, Huber R. (2001) Structure quality and target parameters. *International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules*. M. G. Rossmann and E. Arnold. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 382-392.
- Exton JH, Park CR. (1967) Control of Gluconeogenesis in liver. *J Biol Chem* 242(11):2622-2636.
- Fenton AW, Alontaga AY. (2009) The impact of ions on allosteric functions in human liver pyruvate kinase. *Methods Enzymol* 466:83-107.
- Fliege R, Tong S, Shibata A, Nickerson KW, Conway T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinine-dependent glucose dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* 58(12):3826-3829.

- Fournier PA, Bräu L, Ferreira LD, Fairchild T, Raja G, James A, Palmer TN. (2002) Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insights from rat and human studies. *Comparative Biochemist Physiol A* 133:755-763.
- Frescas D, Valenti L, Accili D. (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280:20589-20595.
- Frey WA, Fishbein R, de Maine MM, Benkovic SJ. (1977) Substrate form of D-fructose 1,6-bisphosphate utilized by fructose 1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 16(11):2479-2484.
- Fujita Y, Freese E. (1979) Purification and properties of 1, 6 bisphosphatase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 254:5340-5349.
- Fujita Y, Yoshida KI, Miwa Y, Yanai N, Nagakawa E, Kasahara Y. (1998) Identification and expression of the *Bacillus subtilis* fructose-1,6-bisphosphatase gene *fbp*. *J Bacteriol* 180:4309-4313.
- Gao Y, Shen L, Honzatko RB. (2014). Central cavity of fructose-1,6-bisphosphatase and the evolution of AMP/fructose 2,6-bisphosphate synergism in eukaryotic organisms. *J Biol Chem*. 289(12):8450-8461.
- Garman EF, Owen RL. (2006) Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Cryst D* 62:32-47.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press 571-607.
- Gerich JE, Meyer CH, Woerle HJ, Stumvoll M. (2001) Renal gluconeogenesis. Its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 24:382-391.
- Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D. (1993) Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5):1932-1936.
- Gidh-Jain M, Zhang Y, Vanpoelje PD, Liang J, Huang S, Kim J, et al. (1994) The allosteric site of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. Analysis of six AMP site mutants based on the crystal structure. *J Biol Chem* 269:27732-27738.
- Gizak A, Maciaszczyk E, Dzugaj A, Eschrich K, Rakus D. (2008) Evolutionary conserved N-terminal region of human muscle fructose-1,6-bisphosphatase regulates its activity and the interaction with aldolase. *Proteins* 72:209-216.
- Gizak A, Majkowski M, Dus D, Dzugaj A. (2004) Calcium inhibits muscle FBPase and affects its intracellular localization in cardiomyocytes. *FEBS Lett* 576:445-448.

- Gizak A, Mazurek J, Wozniak M, Maciaszczyk-Dziubinska E, Rakus D. (2013) Destabilization of fructose 1,6-bisphosphatase–Z-line interactions is a mechanism of glycconeogenesis down-regulation in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1833:622-628.
- Gizak A, Pirog M, Rakus D. (2012) Muscle FBPase binds to cardiomyocyte mitochondria under glycogen synthase kinase-3 inhibition Or elevation of cellular Ca²⁺ level. *FEBS Lett* 586:13-19.
- Gizak A, Rakus D, Dzugaj A. (2003) Immunohistochemical localization of human fructose-1,6-bisphosphatase in subcellular structures of myocytes. *Histol Histopathol* 18:135-142.
- Gizak A, Rakus D, Dzugaj A. (2008) Nuclear localization of fructose-1,6-bisphosphatase in smooth muscle cells. *J Mol Histol* 36:243-248.
- Gizak A, Zarzycki M, Rakus D. (2009) Nuclear targeting of FBPase in HL-1 cells controlled by beta-1 adrenergic receptor-activated G5 protein signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1793:871-877.
- Glasel JA. (1995) Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios. *Biotechniques* 18:62-63.
- Gleeson TT. (1996) Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu Rev Physio* 58:565-581.
- Gomori G. (1943) Hexose diphosphatase. *J Biol Chem* 148:139-149.
- Granata R, Baragli A, Settanni F, Scarlatti F, Ghigo E. (2010) Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J Mol Endocrinol* 45:107–118.
- Granchi C, Fancelli D, Minutolo F. (2014) An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic. *Metabolism Bioorg Med Chem Lett* 24:4915-4925.
- Guo X, Li H, Xu H, Woo S, Dong H, Lu F, Lange AJ, Wu Ch. (2012) Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharma Sinica B* 2(4):358-367.
- Gutka HJ, Rukseree K, Wheeler PR, Franzblau SG, Movahedzadeh F. (2011) glpX gene of *Mycobacterium tuberculosis*: heterologous expression, purification, and enzymatic characterization of the encoded fructose 1,6-bisphosphatase II. *Appl Biochem Biotechnol* 164(8):1376-1389.
- Hall A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98
- Hao M, Zhang S, Qiu J. (2012) Toward the prediction of FBPase inhibitory activity using chemoinformatic methods. *Int J Mol Sci* 13:7015-7037.
- Henquin J-C, Sempoux Ch, Marchandise J, Godecharles S, Guio Y, Nenquin M, Rahier J. (2013) Congenital hyperinsulinism caused by hexokinase I expression or glucokinase-activating mutation in a subset of β -cells. *Diabetes* 62(5):1689-1696.

- Herzog B, Stitt M, Heldt HW. (1984) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate *Plant Physiol* 75:561-565.
- Hines J, Fromm H, Honzatko R. (2006) Novel allosteric activation site in *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 281(27):18386-18393.
- Hines JK, Chen X, Nix JC, Fromm HJ, Honzatko RB. (2007) Structures of mammalian and bacterial fructose-1,6-bisphosphatase reveal the basis for synergism in AMP/fructose 2,6-bisphosphate inhibition. *J Biol Chem* 282:36121-36131
- Howarth C, Gleeson P, Attwell D. (2012) Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J. Cereb Blood Flow Metab* 32:1222-1232.
- Iancu CV, Mukund S, Fromm HJ, Honzatko RB. (2005) R-state AMP complex reveals initial steps of the quaternary transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 280(20):19737-19745.
- Ikeda Y, Noguchi T. (1998) Allosteric regulation of pyruvate kinase M2 isozyme involves a cysteine residue in the intersubunit contact. *J Biol Chem* 273(20):12227-12233.
- Ishibashi H, Cottam GL. (1978) Glucagon-stimulated phosphorylation of pyruvate kinase in hepatocytes. *J Biol Chem* 253: 8767-8771.
- Iversen LF, Brzozowski M, Hastrup S, Hubbard R, Kastrup JS, Larsen IK, et al. (1997) Characterization of the allosteric binding pocket of human liver fructose-1,6-bisphosphatase by protein crystallography and inhibitor activity studies. *Prot Sci* 6:971-82.
- Jaskolski M, Gdaniec M, Kosturkiewicz Z, Szafran M. (1978) Very short hydrogen bond: x-ray structure of 2,6-dimethylpyridine N-oxide semiperchlorate. *Polish Journal of Chemistry* 52:2399-2404.
- Jeffery CJ, Bahnson BJ, Chien W, Ringe D, Petsko GA. (2000) Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry* 39:955-964.
- Jiang G, Zhang BB. (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E671-E678.
- Johnson LN. (1992) Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J* 6:2274-2282.
- Jules M, Le Chat L, Aymerich S, Le Coq D. (2009) The *Bacillus subtilis* ywjI (glpX) gene encodes a class ii fructose-1,6-bisphosphatase, functionally equivalent to the class III fbp enzyme. *J Bacteriol* 191(9):3168-3171.
- Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 6(2):195-210.
- Kabsch W, Sander C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22:2577-2637.

- Kabsch W. (2010) XDS. *Acta Cryst D* 66:125-132.
- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns B, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy A, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey D, Rückert C, Rupp O, Sahn H, Wendisch V, Wiegräbe I, Tauch A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of - aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotech* 104(1-3):5-25.
- Kalsbeek A, Yi CX, La Fleur SE, Fliers E. (2010) The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 21:402-410.
- Ke H, Thorpe CM, Seaton BA, Marcus F, Lipscomb WN. (1989) Molecular structure of fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1475-1479.
- Ke H, Zhang Y, Liang JY, Lipscomb W. (1991) Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose 6-phosphate at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2989-2993.
- Ke H, Zhang Y, Lipscomb W. (1990) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5243-5247.
- Kelly GJ, Zimmermann G, Latzko E. (1982) Fructose in leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzymol.*90:371-378.
- Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P. (2002) Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn* 225(4): 384-391.
- Kleywegt GJ, Jones TA. (1997) Model building and refinement practice. *Methods Enzymol* 277: 208-230.
- Konzer A, Ruhs A, Braun H, Jungblut B, Braun T, Kruger M. (2013) Stable isotope labeling in zebrafish allows in vivo monitoring of cardiac morphogenesis. *Mol Cell Proteomics* 12 (6):1502-1512.
- Krissinel E, Henrick K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline states. *J Mol Biol* 372(3):774-797.
- Krug M, Weiss MS, Mueller U, Heinemann U. (2012) XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *J Appl Cryst* 45:568-572.
- Kruger DF, Martin CL, Sadler CE. (2006) New insights into glucose regulation. *Diabetes Educ* 32: 221.
- Kubota K, Inaba S, Nakano R, Watanabe M, Sakurai H, Fukushima Y, Ichikawa K, Takahashi T, Izumi T, Shinagawa A. (2015) Identification of activating enzymes of a novel FBPase inhibitor prodrug CS-917. *Pharma Res Per* 3(3):e00138.

- Kuznetsova E, Xu L, Singer A, Brown G, Dong A, Flick R, Oui H, Ouff M, Joachimiak A, Savchenko A, Yakunin AF. (2010) Structure and Activity of the metal-independent fructose-1,6-bisphosphatase YK23 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285(27):21049-21059.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-695.
- Lamont BJ, Visinoni S, Fam BC, Kebede M, Weinrich B, Papapostolou S, Massinet H, Proietto J, Favaloro J, Andrikopoulos S. (2006) Expression of Human Fructose-1,6-Bisphosphatase in the Liver of Transgenic Mice Results in Increased Glycerol Gluconeogenesis. *Endocrinology* 147(6):2764-2772.
- Larsen TM, Benning MM, Wesenberg GE, Rayment I, Reed GH. (1997) Ligand-induced domain movement in pyruvate kinase: structure of the enzyme from rabbit muscle with Mg²⁺, K⁺, and L-phospholactate at 2.7 Å resolution. *Arch Biochem Biophys* 345(2):199-206.
- Laughlin LT, Reed GH. (1997) The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117. *Arch Biochem Biophys* 348(2):262-267.
- Leslie AGW, Powell HR. (2007) Processing Diffraction Data with Mosflm. *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography* 245:41-51.
- Li B, Qiu B, Lee DSM, Walton ZE, Ochocki JD, Mathew LK, Mancuso A, Gade TPF, Keith B, Nissim I, Simon MC. (2014) Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression. *Nature* 513:251-255.
- Liang J-Y, Zhang Y, Huang S, Lipscomb WN. (1993) Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2132-2136.
- Liu F, Fromm HJ. (1988) relationship between thiol group modification and the binding site for fructose-2,6-bisphosphate on rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 263(20):10035-10039.
- Mamczur P, Sok AJ, Rzechonek A, Rakus D. (2012) Cell cycle-dependent expression and subcellular localization of fructose-1,6-bisphosphatase. *Histochem Cell Biol* 137:121-136.
- Mansour TE, Ahlfors ChE. (1968) Studies on heart phosphofructokinase. *J Biol Chem* 243(10):2523-2533.
- Marcus F, Edelstein I, Reardon I, Heinrikson RL. (1982) Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7161-7165.
- Marcus F, Edelstein I, Rittenhouse J. (1984) Inhibition of *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 119(3):1103-1108.
- Marcus F. (1976) Interaction of salicylate at the AMP site of fructose 1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 70:159-162.

- Matthews BW. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33: 491-497.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* 40:658-674.
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 26(10): 587-597.
- Meyerhof O, Junowicz-Kocholaty R. (1943) The equilibria of isomerase and aldolase and the problem of the phosphorylation of glyceraldehyde phosphate. *J Biol Chem* 149:71-92.
- Meyerhof O. (1945) The origin of the reaction of harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J Biol Chem* 157:105-120.
- Michels PAM, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763:1463-1477.
- Mizunuma H, Tashima Y. (1986) Characterization of rat muscle fructose 1,6-bisphosphatase. *J Biochem* 99:1781-1788.
- Mokrasch LC, McGlivery RW. (1956) Purification and properties of fructose 1,6 diphosphatase. *J Biol Chem* 221:909-917.
- Movahedzadeh F, Rison SCG, Wheeler PR, Kendall SL, Larson TJ, Stoker NG. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* Rv1099c gene encodes a GlpX-like class II fructose-1,6-bisphosphatase. *Microbiology* 150: 3499-3505.
- Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. (2015) *Biochemia Harpera Ilustrowana*. PZWL. ISBN: 978-83-200-4554-3.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood method. *Acta Cryst D* 53:240-255.
- Nelson SW, Kurbanov F, Honzatko RB, Fromm HJ. (2001) The N-terminal segment of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase participates in the allosteric regulation of catalysis. *J Biol Chem* 276: 6119-6124
- Nishimasu H, Fushinobu S, Shoun H, Wakagi T. (2004) The first crystal structure of the novel class of fructose-1,6-bisphosphatase present in thermophilic archaea. *Structure* 12(6):949-959.
- Noda T, Hoffschulte H, Holzer H. (1984) Characterization of fructose 1,6-bisphosphatase from bakers' yeast. *J Biol Chem* 259:7191-7197.
- Opheim DJ, Bernlohr RW, (1975) Purification and regulation fructose 1, 6 bisphosphatase from *Bacillus licheniformis*. *J Biol Chem* 250: 2024-3033.
- Otto-Buczowska E, Chobot A. (2012) Role of ghrelin and leptin in the regulation of carbohydrate metabolism Part II. Leptin. *Postępy Hig Med Dośw* 26(66):799-803.

- Otwinowski Z, Minor W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth Enzym* 276:307-326.
- Painter J, Merritt EA. (2006) Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Cryst. D* 62:439-450.
- Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ. (1995) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate: A metabolic signaling enzyme. *Annal Rev Biochem* 64:799-835.
- Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, Claus TH. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Biochem* 57:755-783.
- Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, McGrane MM, Pilkis J, Claus TH. (1981) The role of fructose 2,6-bisphosphate in regulation of fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 256:11489-95.
- Pirog M, Gizak A, Rakus D. (2014) Changes in quaternary structure of muscle fructose-1,6-bisphosphatase regulate affinity of the enzyme to mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 48:55-59.
- Rakus D, Dzugaj A. (2000) Muscle aldolase decreases muscle FBPase sensitivity toward AMP inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 275:611-616.
- Rakus D, Gizak A, Kasprzak AA, Zarzycki M, Maciaszczyk-Dziubinska E, Dzugaj A. (2013) The mechanism of calcium-induced inhibition of muscle fructose-1,6-bisphosphatase and destabilization of glyconeogenic complex. *PLoS ONE* 8(10):e76669.
- Rakus D, Maciaszczyk E, Wawrzycka D, Ułaszewski S, Eschrich K, Dzugaj A. (2005) The origin of the high sensitivity of muscle fructose-1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS Lett* 579:5577-5581.
- Rakus D, Pasek M, Krotkiewski H, Dzugaj A. (2003) Muscle FBPase in a complex with muscle aldolase is insensitive to AMP inhibition. *FEBS Lett* 547:11-14.
- Rakus D, Pasek M, Krotkiewski H, Dzugaj A. (2004) Interaction between muscle aldolase and muscle fructose-1,6-bisphosphatase results in the substrate channeling. *Biochemistry* 43:14948-1495.
- Ramakrishnan C, Ramachandran GN. (1965) Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys J* 5(6):909-933.
- Rashid N, Imanaka H, Kanai T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. (2002) A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in Archaea. *J Biol Chem* 277(34):30649-30649.
- Rittmann D, Schaffer S, Wendisch V, Sahm H. (2003) Fructose-1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum* expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme. *Archiv Microbiol* 180(4):285-292.
- Rojas-González JA, Soto-Suárez M, García-Díaz A, Romero-Puertas MC, Sandalio LM, Mérida A, Thormählen I, Geigenberger P, Serrato AJ, Sahrawy M. (2015) Disruption of

- both chloroplastic and cytosolic FBPase genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/erv062.
- Ruf A, Tetaz T, Schott B, Joseph C, Rudolph MG. (2016) Quadruple space-group ambiguity owing to rotational and translational noncrystallographic symmetry in human liver fructose-1,6-bisphosphatase. *Acta Cryst D* 72:1212-1224.
- Ryan C and Radziuk J. (1995) Distinguishable substrate pools for muscle glyconeogenesis in lactate-supplemented recovery from exercise. *Am J Physiol* 269: E538 – 550.
- Sahar S, Sassone-Corsi P. (2012) Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23(1):1-8.
- Scala J and Semarsky FE (1971) An induced fructose 1,6 bisphosphatase from cultured cells of *Acer pseudopaltanus* (English sycamore). *Phytochemistry* 10:567-570.
- Segel IH. (1976) *Biochemical Calculations*. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons. 246–273.
- Serrato AJ, Yubero-Serrano EM, Sandalio LM, Muñoz-Blanco J, Chueca A, Caballero JL, Sahrawy M. (2009) cpFBPaseII, a novel redox-independent chloroplastic isoform of fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Cell Environ* 32(7): 811-827.
- Shi R, Chen Z-Y, Zhu D-W, Li C, Shan Y, Xu G, Lin S-X. (2013) Crystal Structures of Human Muscle Fructose-1,6-Bisphosphatase: Novel Quaternary States, Enhanced AMP Affinity, and Allosteric Signal Transmission Pathway. *PLoS ONE* 8(9): e71242.
- Skalecki K, Mularczyk W, Dzugaj A.(1995) Kinetic properties of D-fructose-1,6-phosphate 1-phosphohydrolase isolated from human muscle. *J Biochem* 310:1029-1035.
- Skalecki K, Rakus D, Wisniewski JR, Kolodziej J, Dzugaj A. (1999) cDNA sequence and kinetic properties of human lung fructose(1, 6)bisphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 365:1–9.
- Smiley KL, Berry AJ, Suelter CH. (1967) An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. *J Biol Chem* 242:2502-2506.
- Solomon DH, Raynal MC, Tejwani GA, Cayre YE. (1988) Activation of the fructose -1,6-bisphosphatase gene by 1,25 dihydroxyvitamin D3 during monocytic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA Immunol* 85:6904-6908.
- Stec B, Yang H, Johnsonm KA, Chen L, Roberts MF. (2000) MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the 'missing' archaeal fructose-1,6-bisphosphatase. *Nature Struc Mol Biol* 7(11):1046-50.
- Stein S, Liehr T, Eschrich K. (2001) Characterization of the mouse liver fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Gene* 264:215-224.

- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti P, Alberini CM. (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810-823.
- Tani K, Fujii H, Nagata S, Miwa S. (1988) Human liver type pyruvate kinase: complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1792-1795.
- Tashima Y, Mizunuma H. (1982) Fructose-1,6-bisphosphatase from mouse and rabbit intestinal mucosa. *Methods Enzymol* 90 PtE: 357-365.
- Tejwani GA. (1983) Regulation of fructose-bisphosphatase activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Bio* 54:121-194.
- Tillmann H, Bernhard D and Eschrich K. (2002) Fructose-1,6-bisphosphatase genes in animals. *Gene* 291:57-66.
- Tillmann H, Stein S, Liehr T, Eschrich K. (2000) Structure and chromosomal localization of the human and mouse muscle fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Gene* 247:241-253.
- Traniello S, Melloni E, Pontremoli S, Sia CL, Horecker BL. (1972) Rabbit liver fructose 1,6-diphosphatase. Properties of the native enzyme and their modification by subtilisin. *Arch Biochem Biophys* 149:222-231.
- Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. (2012) role of orexin in the central regulation of glucose and energy homeostasis. *Endocr J* 59:365-374.
- Udvardy J, Godeh MM, Farkas G (1982). Regulatory properties fo fructose 1,6 bisphosphatase from cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *J Bacterial* 151: 203-208.
- Underwood AH, Newsholm EA. (1965) Some properties of fructose 1,6-diphosphatase of rat liver and their relation to the control of gluconeogenesis. *Biochem J* 95:767.
- Van Schaftingen E, Hers HG. (1981) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2861-2863.
- Van Tonder A, Terblanche SE, Oelofsen W. (1985) Isoland partial characterisation of rat muscle fructose bisphosphatase. *Biochim Biophys Acta* 831:186-191.
- Van Wijk R, Huizinga EG, van Wesel AC, van Oirschot BA, Hadders MA, van Solinge WW. (2009) Fifteen novel mutations in PKLR associated with pyruvate kinase (PK) deficiency: structural implications of amino acid substitutions in PK. *Hum Mutat* 30:446-453.
- Venner A, Karnani MM, Gonzalez JA, Jensen LT, Fugger L, Burdakov D. (2011) Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar sensing by intracellular fuels. *J Physiol* 589:5701-5708.
- Verhees CH, Ackerboom J, Schiltz E, deVos WM, VanderOost J, (2002) Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose-1,6-bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 184(12), 3401-3405.

- Villeret V, Huang S, Fromm HJ, Lipscomb WN. (1995) Crystallographic evidence for the action of potassium, thallium, and lithium ions on fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8916-8920.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.
- Warburg O, Christian W. (1942) Isolation and crystallization of enolase. *Biochem Z* 310:384-421.
- Wasserman DH, Kang L, Ayala JE, Fueger PT, Lee-Toung RS. (2011) The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *J Exp Biol* 214:254-262.
- Winn MD, Isupov MN, Murshudov GN. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst D* 57:122-133.
- Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. (2008) Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J* 275(1):1-21.
- Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M. (2013) Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS J* 280: 5705–5736.
- Wood S, Trayhurn P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British J Nutrition* 89:3-9.
- Wood WI. Tables for the preparation of ammonium sulfate solutions. *Anal. Biochem.* 1976; 73:250–257.
- Wu Ch, Khan SA, Peng L-J, Lange AJ. (2006) Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: Beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Advan Enzyme Regul* 46:72-88.
- Wu W, Zhao S. (2013) Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys* 45:18-26.
- Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. (2009) Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 86(3):174-179.
- Yiu WH, Lee YM, Peng WT, Pan CJ, Mead PA, Mansfield BC, Chou JY. (2010) Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type Ia using gene therapy. *Mol Ther* 6:1076-1084.
- Yonzon S, Jha S, Chhetri DR. (2015) Gluconeogenic fructose 1,6-bisphosphatase from *Ginkgo biloba* L.: isolation and characterization. *Ann Plant Scien* 4(05): 1116-1122.
- Zarzycki M, Kołodziejczyk R, Maciaszczyk-Dziubinska E, Wysocki R, Jaskolski M, Dzugaj A. (2011) Structure of E69Q mutant of human muscle fructose-1,6-bisphosphatase. *Acta Cryst D* 67:1028-1034.

- Zarzycki M, Maciaszczyk E, Dzugaj A. (2007) Glu 69 is Essential for the high sensitivity of muscle fructose-1,6-bisphosphatase inhibition by calcium ions. *FEBS Lett* 581:1347-1350.
- Zhang Y, Liang J-Y, Huang S, Lipscomb WN. (1994) Toward a mechanism for the allosteric transition of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *J Mol Biol* 244:609-624.
- Zimmermann GG, Kelly J, Latzko E. (1978) Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose 1,6 bisphosphatase. *J Biol Chem* 253:5952-5956.