

Autoreferat

Wysokorozdzielcze rentgenograficzne struktury peptydaz i ich inhibitorów

W związku z wnioskiem o przeprowadzenie przewodu habilitacyjnego

dr Szymon Krzywda
Wydział Chemii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
w Poznaniu



Poznań, wrzesień 2018 r.

1. *Imię i Nazwisko: Szymon Hubert Krzywda*

Dane kontaktowe: Wydział Chemii, UAM, ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań

e-mail: szymon@amu.edu.pl, tel. 783 503 851

2. *Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku*

Doktor nauk chemicznych 1998 r. Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Rozprawa doktorska pt. „Badania krystalograficzne mutantów mioglobiny z *Sus domesticus*”

Promotor: prof. dr hab. Mariusz Jaskólski

Magister biologii 1991 r.

Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Praca magisterska pt. „Analiza organizacji *loci* kodujących β -amylazy u żyta metodą hybrydyzacji wg Southerna”

Promotor: prof. dr hab. Jan Sadowski

3. *Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych*

1998 – 1999 adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

1999 – 2000 adiunkt, (urlop bezpłatny) i staż podoktorski ufundowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, Wydział Chemii, Uniwersytet w Yorku, UK

2000 – 2003 pracownik naukowy (ang. *postdoctoral research fellow*), Wydział Chemii, Uniwersytet w Yorku, UK

2003 – adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

4. *Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego*

Osiągnięciem naukowym wynikającym z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) jest cykl powiązanych tematycznie publikacji naukowych pt.:

Wysokorozdzielcze rentgenograficzne struktury peptydaz i ich inhibitorów

4.1 Wykaz powiązanych tematycznie artykułów naukowych **H1-H8** stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

Sumaryczny Czynniki Wpływu (*Impact Factor*, IF): **43,8**

Liczba cytowań: **404**

Liczba prac: **8**

H1. Czapinska, H., Otlewski, J., **Krzywda, S.**, Sheldrick, G. M., & Jaskolski, M. (2000)

High-resolution structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor with altered binding loop sequence
Journal of Molecular Biology, 295, 1237-1249

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w znalezieniu warunków krystalizacji BPTI; rejestracji rentgenowskich danych dyfrakcyjnych wraz z ich procesowaniem; udokładnieniu struktury; udziale w analizie wyników i przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 35%

IF₍₂₀₀₀₎=**5.4**, IF₅=**4.2**, liczba cytowań **34**

H2. Addlagatta, A., **Krzywda, S.**, Czapinska, H., Otlewski, J. & Jaskolski, M. (2001)

Ultrahigh-resolution structure of a BPTI mutant

Acta Crystallographica D, 57, 649-663

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na otrzymaniu kryształów BPTI rozpraszających promieniowanie rentgenowskie z subatomową rozdzielczością; zarejestrowaniu synchrotronowych subatomowych danych dyfrakcyjnych i ich przeprosowaniu; udokładnieniu modelu struktury BPTI-REF; udziale w analizie wyników i przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 30%

IF₍₂₀₀₁₎=**2.1**, IF₅=**3.4**, liczba cytowań **50**

H3. **Krzywda, S.**, Brzozowski, A. M., Karata, K., Ogura, T. & Wilkinson, A. J. (2002)

Crystallization of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli*

Acta Crystallographica D, 58, 1066-1067

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na nadekspresji i opracowaniu protokołu oczyszczenia i przechowywania domeny AAA zależnej od ATP peptydazy FtsH; znalezieniu warunków krystalizacji i wityfikacji kryształów; rejestracji wraz z procesowaniem synchrotronowych, wysoko-rozdzielczych danych dyfrakcyjnych; próbie rozwiązania struktury metodą podstawienia cząsteczkowego; udziale w analizie wyników i przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 50%

IF₍₂₀₀₂₎=**1.8**, IF₅=**3.4**, liczba cytowań **5**

H4. Krzywda, S., Brzozowski, A. M., Verma, C., Karata, K., Ogura, T. & Wilkinson, A. J. (2002)

The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å resolution

Structure, 10, 1073-1083

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na nadekspresji i oczyszczeniu domeny AAA zależnej od ATP peptydazy FtsH; otrzymaniu kryształów w/w domeny; przygotowaniu pochodnych kryształów z metalem ciężkim; rejestracji synchrotronowych danych dyfrakcyjnych dla pochodnej kryształu z MeHgCl i ich przepracowaniu; rozwiązaniu, udokładnieniu i walidacji modelu struktury domeny AAA zależnej od ATP peptydazy FtsH wraz ze zdeponowaniem modelu w bazie PDB; udziale w opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 45%

IF₍₂₀₀₂₎=**6.0**, IF₅=**5.0**, liczba cytowań **93**

H5. Khatib, F., DiMaio, F., Foldit Contenders Group, Foldit Void Crushers Group, Cooper, S., Kazmierczyk, M., Gilski, M., Krzywda, S., Zabranska, H., Pichova, I., Thompson, J., Popović, Z., Jaskolski, M. & Baker D. (2011)

Crystal structure of a monomeric retroviral protease solved by protein folding game players

Nature Structural & Molecular Biology, 18, 1175-1177

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w krystalizacji peptydazy M-PMV, udokładnieniu jej struktury i udziale w przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 5%

IF₍₂₀₁₁₎=**12.7**, IF₅=**12.8**, liczba cytowań **203**

H6. Gilski, M., Kazmierczyk, M., Krzywda, S., Zábranská, H., Cooper, S., Popović, Z., Khatib, F., DiMaio, F., Thompson, J., Baker, D., Pichová, I. & Jaskolski M. (2011)

High-resolution structure of a retroviral protease folded as a monomer

Acta Crystallographica D., 67, 907-914

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w krystalizacji peptydazy M-PMV, udokładnieniu jej struktury i udziale w przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 10%

IF₍₂₀₁₁₎=**12.6**, IF₅=**3.4**, liczba cytowań **9**

H7. Krzywda, S., Jaskólski, M., Rolka, K. & Stawikowski, M. J. (2014)

Structure of proteolytically resistant analogue of (NLys)⁵SFTI-1 in complex with trypsin: evidence for the direct participation of the Ser214 carbonyl group In serine protease-mediated proteolysis

Acta Crystallographica D, 70, 668-675

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy; otrzymaniu kryształów kompleksu (NLys)⁵SFTI-1 z trypsyną i znalezieniu warunków ich wiotryfikacji; rejestracji synchrotronowych, wysokorozdzielczych danych dyfrakcyjnych z ich procesowaniem; rozwiązaniu, udokładnieniu i walidacji modelu struktury w/w kompleksu wraz z jego zdeponowaniem w bazie PDB; opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 45%

IF₍₂₀₁₄₎=2.7, IF₅= 3.4, liczba cytowań 6

H8. Kopera, E., Bal, W., Lenarčič Živkovič, M., Dvornyk, A., Kludkiewicz, B., Grzelak, K., Zhukov, I., Zagórski-Ostojka, W., Jaskolski, M., & Krzywda, S*. (2014)

Atomic resolution structure of a protein prepared by non-enzymatic His-tag removal. Crystallographic and NMR study of GmSPI-2 inhibitor

PLOS ONE, 9, e106936, * autor korespondencyjny

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy; znalezieniu warunków krystalizacji i wiotryfikacji kryształów GmSPI-2; rejestracji synchrotronowych danych dyfrakcyjnych z rozdzielczością 0.98 Å i ich procesowaniu; rozwiązaniu struktury; opracowaniu strategii udokładniania programem SHEL97; udokładnieniu i walidacji modelu struktury wraz z jego zdeponowaniem w bazie PDB; udziale w opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

Mój udział procentowy szacuję na 45%

IF₍₂₀₁₄₎=3.2, IF₅=3.4, liczba cytowań 4

Suma dla prac H1-H8

IF = 43.8, IF₅ = 39, liczba cytowań 404

Wartości parametru Impact Factor (IF) podano z roku publikacji

Symbol IF₅ oznacza wartość aktualnego, pięcioletniego parametru Impact Factor

Cytowania podane są zgodnie z bazą ISI Web of Science (18.09.2018 r.)

Wysokorozdzielcze rentgenograficzne struktury peptydaz i ich inhibitorów

Autoreferat zawiera opis osiągnięcia naukowego udokumentowanego powiązanymi tematycznie pracami (H1-H8) dotyczącymi wysokorozdzielczych krystalograficznych struktur peptydaz i ich inhibitorów. Obejmują one wszystkie etapy określenia struktury – od nadekspresji białka, jego oczyszczenia i krystalizacji poprzez rejestrację i procesowanie danych dyfrakcyjnych, rozwiązanie i udokładnienie struktury po interpretację wyników.

Oprócz nowatorskich aspektów metodologicznych niezwykle ważnym poznawczo efektem tych prac są wyniki strukturalne, przedstawione w pracach (H1-H8). Wszystkie opisane poniżej struktury były do tej pory nieznanne, a ich szczegółowy opis i analiza stanowi, mam nadzieję, sporą wartość naukową.

1. Wprowadzenie

Dzięki postępowi metodologicznemu związanemu z etapem krystalizacji, zastosowaniem potężnych synchrotronowych źródeł promieniowania rentgenowskiego i coraz lepszych detektorów liczba struktur wysokorozdzielczych zwiększyła się. Struktury wysokorozdzielcze charakteryzujące się wysoką jakością i wiarygodnością pozwalają na analizę wielu aspektów strukturalnych makromolekuł. Umożliwiają m.in. zrozumienie funkcjonowania konkretnego białka czy też poszerzenie ogólnej wiedzy dotyczącej białek. Strukturalnymi „rarytasami” są struktury posiadające rozdzielczość atomową ($d_{min} < 1,2 \text{ \AA}$). Mimo, że ich liczba wzrosła dramatycznie od kilku, na początku lat 90, do ponad 3500 obecnie, to nadal jest ich stosunkowo niewiele biorąc pod uwagę liczbę wszystkich struktur zdeponowanych w banku struktur białkowych PDB (ang. *Protein Data Bank*) tj. ponad 140 000. W autoreferacie opisuję dwie takie struktury: inhibitora z nici jedwabiu *Galleria mellonella* (ang. *Silk Protease Inhibitor 2, GmSPI-2*) i inhibitora trypsyny z trzustki wołu (ang. *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, BPTI*). Takie „rarytasy” umożliwiają np. rewizję bibliotek standardowych parametrów stereochemicznych używanych w procesie udokładniania struktur białkowych a opartych obecnie o struktury małych cząsteczek zdeponowanych w bazie Cambridge Structural Database (CSD).

1.1. Peptydazy

Peptydazy (nazewnictwo za Barrett & McDonald, 1986) są enzymami proteolitycznymi katalizującymi hydrolizę wiązania peptydowego. Ze względu na miejsce hydrolizy dzielą się na egzo- lub endopeptydazy a mechanizm katalizy na peptydazy serynowe (np. trypsyna z trzustki wołu), cysteinowe, aspartylowe (np. retropepsyna z wirusa M-PMV), treoninowe, glutaminianowe i metalopeptydazy (np. FtsH z *Escherichia coli*).

System klasyfikacji peptydaz MEROPS grupuje je w klany charakteryzujące się homologią strukturalną i/lub identyczną kolejnością aminokwasów triady katalitycznej (Rawlings *et al.*, 2010). Klan peptydaz serynowych PA posiadający zwój trypsynowy jest najliczniejszą i prawdopodobnie najlepiej przebadaną grupą enzymów. Stanowi on 1/3 wszystkich znanych peptydaz (Di Cera, 2009).

Peptydazy odgrywają ważną rolę w procesach, takich jak: zapłodnienie, wzrost, trawienie, dojrzewanie, starzenie się a nawet śmierć organizmu. Kontrolując aktywność (np. trypsyny) syntezy czy też degradacji białek (np. FtsH z *E. coli*) regulują procesy fizjologiczne organizmu. Oczywistym jest, że enzymy te występują u zwierząt, roślin i bakterii. Występują także u wirusów, gdzie pełnią istotną rolę w ich replikacji.

Enzymy te posiadają ogromne znaczenie lecznicze np. inhibicja peptydazy wirusa HIV-1 jest najskuteczniejszym sposobem leczenia AIDS.

1.2. Inhibitory peptydaz

Inhibitorami peptydaz są cząsteczki, które hamują ich aktywność. Wiele naturalnie występujących inhibitorów jest polipeptydami lub białkami. Inhibitory można klasyfikować według nazwy peptydazy jaką inhibują lub mechanizmu ich działania. Obecnie stosuje się również zwyczajowe nazwy rodzin inhibitorów oparte na ich sekwencji i strukturze np. Kunitza, Bowman-Birka etc. jak i formalne nazewnictwo zaproponowane na podstawie podobieństwa sekwencyjnego (Rowlings *et al.*, 2004).

Ponieważ peptydazy stanowią istotny cel w przypadku leczenia wielu chorób, ich inhibitory stosowane są jako leki. Do wspomnianych wcześniej inhibitorów peptydazy HIV-1 należy dodać m.in. inhibitory ludzkiej trombiny stosowane w leczeniu choroby wieńcowej czy też inhibitory peptydazy ACE stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego.

Ważną rolę w projektowaniu leków odgrywają mimetyki peptydów. Wśród nich wyróżniają się polipeptoidy tj. poli-*N*-podstawione glicyny (Simon *et al.*, 1992). Monomery peptoidowe połączone wiązaniem amidowym, z powodu braku atomu wodoru przy atomie azotu, nie mogą utworzyć stabilnych struktur drugorzędowych. Ponieważ peptoidy posiadają, jak i polipeptydy, strukturę modułową można łączyć je w hybrydowe struktury peptydo-peptoidowe. W przeciwieństwie do większości peptydów, peptoidy są odporne na działanie peptydaz cysteinowych, aspartylowych, serynowych czy też metalopeptydaz (Miller *et al.*, 1994).

2. Wysoko (1,4 Å) i ultra (0,86 Å) rozdzielcza struktura inhibitora trypsyny z trzustki wołu

2.1. BPTI

Inhibitor trypsyny z trzustki wołu jest niewielkim, należącym do rodziny Kunitz'a, globularnym białkiem zbudowanym z 58 aminokwasów. Posiada ściśle określoną strukturę drugorzędową, hydrofobowe wnętrze i stabilizujące strukturę trzeciorzędową trzy mostki dwusiarczkowe. BPTI można uznać jako białko modelowe, gdyż wiele różnych aspektów jego struktury, procesu fałdowania, stabilności i dynamiki zostało szczegółowo zbadane (Fritz & Wunderer, 1983; Deisenhofer & Steigemann, 1975; Wlodawer *et al.*, 1984, 1987; Hamiaux *et al.*, 1999; Lubkowski & Wlodawer, 1999; Berndt *et al.*, 1992; Huber *et al.*, 1974; Scheidig *et al.*, 1997; Chen & Bode, 1983; van deLocht *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999).

BPTI, jak wiele innych białkowych inhibitorów peptydaz, wiąże się z enzymami poprzez sekwencyjny epitop zwany pętlą wiążącą (Bode & Huber, 1992; Apostoluk & Otlewski, 1998). U wielu

inhibitorów przyjmuje ona podobną, zwaną kanoniczną, konformację zdefiniowaną poprzez kąty torsyjne P_3 - P_3' (oznaczenie za Schechter & Berger, 1967).

2.2. 11,13Ala15Arg52Leu BPTI

Analizowana forma 11,13Ala15Arg52Leu BPTI pochodzi z serii mutantów przygotowanych do badań, metodą skanowania alaniną, nad wpływem aminokwasów pętli wiążącej na energię asocjacji BPTI z peptydazami serynowymi. Posiada ona następujące mutacje: 1) Lys15Arg – występuje częściej w inhibitorach rodziny Kunitz aniżeli natywna lizyna oraz zapewnia silniejsze wiązanie z kilkoma enzymami kaskady krzepnięcia krwi, 2) Thr11Ala – występuje jedynie w kilku inhibitorach tej rodziny, 3) Pro13Ala – mutacja nie spotykana w domenach podobnych do BPTI, powinna spowodować znaczne uelastycznienie pętli wiążącej, 4) Met52Leu – mutacja umożliwia odcięcie bromkiem cyjanu BPTI z białka fuzyjnego. Pomimo tak drastycznych zmian badany mutant inhibuje trypsynę wołową z $K_a = 4,1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ tj. jedynie 30 razy słabiej od formy natywnej.



Ilustracja 1. Otrzymany przeze mnie kryształ formy 11,13Ala15Arg52Leu BPTI.

2.3. Wysokorozdzielcza struktura 11,13Ala15Arg52Leu BPTI

2.3.1. Krystalizacja, rejestracja danych dyfrakcyjnych, rozwiązanie i udokładnienie struktury

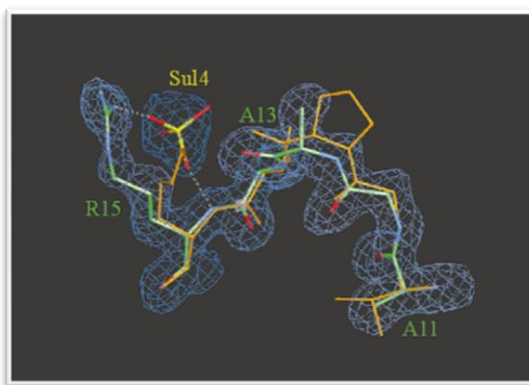
11,13Ala15Arg52Leu BPTI krystalizuje, w ciągu kilkunastu godzin, w nowej formie krystalicznej, w warunkach opisanych w **H1**. Większość form krystalicznych tego zasadowego białka otrzymano w warunkach wysokiego pH. Kryształy obecnej formy wzrastają w pH neutralnym ($\text{pH} = 7,5$). Przeciwnonami dla pozytywnie naładowanego BPTI są tu jony siarczanowe. Kryształy nowej formy krystalicznej BPTI (Ilustracja 1) należą do grupy przestrzennej $P4_32_12$ i charakteryzują się parametrami komórki elementarnej $a = 52,71 \text{ \AA}$, $c = 43,41 \text{ \AA}$. Część asymetryczna zawiera jedną kopię BPTI i 48% (v/v) roztworu w kryształach.

Dane dyfrakcyjne dla kryształu umieszczonego w kapilarze zarejestrowałem z maksymalną rozdzielczością $1,4 \text{ \AA}$ w temperaturze 290 K wykorzystując dyfraktometr i detektor w Centrum Badań Biokrytalograficznych (CBB) Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (**H1**). Pomimo wielogodzinnego (3 dni) rejestrowania danych dyfrakcyjnych w temperaturze pokojowej procesowane dane nie wskazywały na zniszczenie radiacyjne kryształu i charakteryzowały się doskonałymi parametrami (Tabela 1, **H1**).

Strukturę rozwiązaliśmy metodą podstawienia cząsteczkowego (ang. *molecular replacement*, MR) modelem 1BPI (Parkin *et al.*, 1996) a model udokładniliśmy za pomocą programu *SHELX97* (Sheldrick & Schneider, 1997) i *O* (Jones & Kjeldgaard, 1994). Udokładnienie struktury opisaliśmy w **H1** a dane statystyczne przedstawiliśmy w Tabeli 2, **H1**. Modelowi struktury, który zdeponowaliśmy w PDB przypisano kod 1QLQ (**H1**). Alternatywnie do w/w procedury, udokładniłem strukturę 11,13Ala15Arg52Leu BPTI programami dedykowanymi typowo dla białek tj. z pakietu *REFMAC* (Marshudov *et al.*, 1999), manualnie modyfikując model programami pakietu *Quanta* (Molecular Simulations, San Diego, CA) – model oznaczyłem jako BPTI-REF (**H1**).

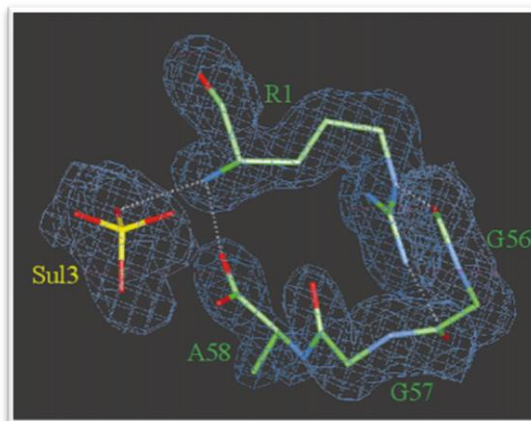
2.3.2. Struktura 11,13Ala15Arg52Leu BPTI

W wysokorozdzielczej, udokładnionej anizotropowo strukturze 11,13Ala15Arg52Leu BPTI (określonej w temperaturze pokojowej) wszystkie aminokwasy są precyzyjnie określone, włącznie ze zmutowanymi (Ilustracja 2) jak i dwoma aminokwasami C-terminalnymi. W dotychczas określonych



Ilustracja 2. Mapa gęstości elektronowej $2mF_o - DF_c$ (o konturze 1σ) fragmentu pętli wiążącej ze zmutowanymi aminokwasami Ala11, Ala13 i Arg15. Model omawianej struktury oznaczono kolorami zgodnie z konwencją CPK (ang. *Corey Pauling Koltun*) a nałożony na tę strukturę model 5PTI kolorem pomarańczowym. Dla przejrzystości przedstawiono jedynie łańcuchy boczne zmutowanych aminokwasów.

natywnych czy też zmutowanych formach BPTI, dwa C-terminalne aminokwasy często są w ogóle lub niedokładnie określone. Kompletny C-koniec jest widoczny np. w strukturach 1BPI i 9PTI 1AAL lecz te konformacje C-końca są inne od konformacji w formie 11,13Ala15Arg52Leu BPTI. Najbardziej podobna do omawianej jest konformacja C-końca w strukturze 1AAL (widoczna jedynie w cząsteczce A). Konformacja C-końca w obecnej strukturze jest „logiczna” ponieważ bardzo blisko zbliża się do swojego N-końca (Ilustracja 3). To „zbliżenie” odzwierciedla silne wiązanie wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy końcowymi grupami BPTI, które w pH krystalizacji powinny występować w formie jonu amonowego i karboksylowego (Ilustracja 3).

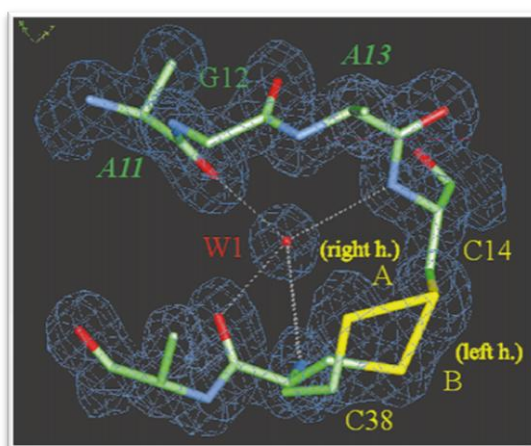


Ilustracja 3. Model N- i C-końca 11,13Ala15Arg52Leu BPTI wraz z mapą $2mF_0 - DF_c$.

Bezspornym jest, że na konformację N-końca, mniej problematycznego w strukturach BPTI, wpływa konformacja C-końca. To dostosowanie konformacji N-końca jest szczególnie widoczne w tej strukturze. Oprócz mostka solnego z uporządkowanym C-końcem, N-koniec tworzy jeszcze jeden mostek solny z jonem siarczanowym (Ilustracja 3).

2.3.3. Mostki dwusiarczkowe

Trzy, stabilizujące strukturę BPTI, mostki dwusiarczkowe mają ściśle określone formy enancjomeeryczne. Mostki Cys5-Cys55 i Cys30-Cys51 są lewoskrętne a mostek Cys14-Cys38 przyjmuje rzadszą formę prawoskrętną. W omawianej strukturze wszystkie mostki posiadają idealną gęstość elektronową. Jednakże mostek dwusiarczkowy Cys14-Cys38 występuje w dwóch, wyraźnie widocznych



Ilustracja 4. Gęstość elektronowa $2mF_0 - DF_c$ wraz z wbudowanym modelem ukazującym mostek dwusiarczkowy Cys14-Cys38 i wewnętrzną cząsteczkę wody W1 z tetraedrycznymi wiązaniami wodorowymi (H1).

konformacjach. Czynniki obsadzenia obu form zostały udokładnione i wynoszą 0,68(8) dla formy prawoskrętnej ($C^{\beta}-S^{\gamma}-S^{\gamma}-C^{\beta} +95^{\circ}$) i 0,37(8) dla formy lewoskrętnej (-90°). Są one realizowane poprzez podwójną konformację Cys38, Ilustracja 4 (H1).

Współistnienie dwóch enancjomerów mostka dwusiarczkowego w strukturach białek jest rzadkie. Pierwszy przypadek opisano w białku REI (Epp *et al.*, 1975) i następnie potwierdzono w innych białkach należących do klasy Bence-Jones'a. W strukturze BPTI podwójną konformację mostka dwusiarczkowego opisaliśmy po raz pierwszy.

Oprócz Cys38, jedynie trzem innym aminokwasom przypisaliśmy podwójne konformacje: Arg17, Lys46 i Asp50. Pod tym względem opisywana struktura charakteryzuje się wyjątkowym uporządkowaniem.

2.3.4. Porównanie struktury 11,13Ala15Arg52Leu z innymi strukturami BPTI i BPTI-REF

Najistotniejsze wydaje się, że trzy drastyczne pod względem strukturalnym mutacje (Thr11Ala, Pro13Ala, Lys15Arg) nie spowodowały żadnego nieuporządkowania czy nawet zmiany konformacji pętli wiążącej. Jest to szczególnie interesujące zwłaszcza w porównaniu ze strukturą 8PTI, w której pojedyncza mutacja Tyr35Gly spowodowała drastyczne zmiany pętli wiążącej jak i pętli wspomagającej (ang. *secondary loop*) (Housset *et al.*, 1991). O znacznej różnicy obu struktur świadczą również nieudane próby rozwiązania obecnej struktury metodą MR za pomocą modelu 8PTI.

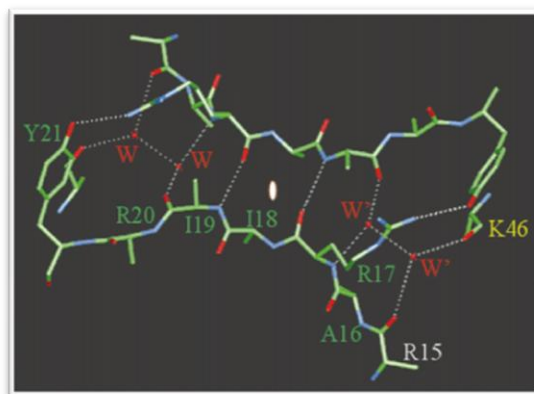
Nałożenie struktury 11,13Ala15Arg52Leu na strukturę referencyjną 5PTI (Wlodawer *et al.*, 1984) metodą najmniejszych kwadratów (programem *ALIGN*; Satow *et al.*, 1984) wykazało duże podobieństwo obu struktur wyrażone w wartości średniego kwadratowego odchylenia (r.m.s.d) pomiędzy 55 (poza końcowymi) parami atomów C_α wynoszącej 0,28 Å.

Powyższe dane wskazują na niezwykłą sztywność pętli wiążącej, na którą nie wpływa ani radykalna (w odniesieniu do łańcucha głównego) mutacja Pro13Ala ani (w odniesieniu do łańcucha bocznego) mutacja Thr11Ala ani też oddziaływania międzycząsteczkowe zmutowanych aminokwasów.

Porównanie modelu 11,13Ala15Arg52Leu BPTI z modelem BPTI-REF wskazuje, że (w granicach błędu statystycznego) są one praktycznie identyczne (Tabela 3, **H1**). Wyjątkiem są niewielkie różnice w posiadających niewielkie czynniki obsadzenia konformerach łańcuchów bocznych o podwójnych konformacjach oraz cząsteczkach wód posiadających wysokie czynniki temperaturowe. Oba modele charakteryzują się niewielką wartością średniego kwadratowego odchylenia (ang. r.m.s.d.) 0,04 Å dla 55 uporządkowanych atomów C_α. Warto podkreślić, że podobieństwo tych struktur udokładnionych z rozdzielczością 1,4 Å jest o rząd wielkości lepsze aniżeli w testowym udokładnieniu równoległym dwóch struktur z rozdzielczością 2,6 Å (Mowbray *et al.*, 1999).

2.3.5. Upakowanie 11,13Ala15Arg52Leu BPTI w kryształach

BPTI jest białkiem monomerycznym jednakże w dwóch strukturach występuje w kryształach jako dekamer (Hamiaux *et al.*, 1999; Lubkowski & Wlodawer, 1999). Obecna forma nie tworzy wyraźnej struktury czwartorzędowej lecz można zauważyć ciekawe oddziaływania wzdłuż osi dwukrotnych. Przede wszystkim dwie cząsteczki 11,13Ala15Arg52Leu BPTI tworzą strukturę kształtu „klatki” (Ilustracja 6, **H1**). Zaangażowane są w nią cząsteczki argininy 15 i 39.



Ilustracja 5. Powiązany osi 2-krotną międzycząsteczkowy arkusz β . Dla przejrzystości łańcuchy boczne nie zaangażowane w wiązania wodorowe przedstawiono jedynie za pomocą atomów C_{β} .

Inna oś dwukrotna (prostopadła do poprzedniej) tworzy oddziaływanie czwartorzędowe poprzez utworzenie antyrównoległego arkusza β pomiędzy aminokwasami 17-19. Ten międzycząsteczkowy arkusz β łączy wewnętrzcząsteczkowe arkusze β , w ramach struktury spinki, tworząc czterołańcuchowy antyrównoległy arkusz β , Ilustracja 5 (**H1**).

2.4. Ultra-rozdzielcza struktura 11,13Ala15Arg52Leu BPTI

Rejestrując dane dyfrakcyjne dla kryształu 11,13Ala15Arg52Leu BPTI w temperaturze pokojowej zdawaliśmy sobie sprawę, że jego potencjał dyfrakcyjny jest o wiele większy. Uzyskałem grant na pomiary wysokorozdzielcze w ośrodku synchrotronowym DESY w Hamburgu. Nie posiadaliśmy w CBB niskotemperaturowej przystawki i nie mogłem określić warunków witrifikacji dla kryształów 11,13Ala15Arg52Leu BPTI. Transport kryształów uzyskanych metodą dyfuzji par był bardzo kłopotliwy i ryzykowny. Zdając sobie sprawę z szybkiego wzrostu tych kryształów postanowiłem wykonać eksperyment krystalizacyjny opisany w **H1** w ośrodku synchrotronowym, przed dniem pomiarów. Następnego dnia, kryształy były gotowe do pomiarów.

2.4.1. Rejestracja ultra-rozdzielczych danych dyfrakcyjnych i ich procesowanie

Jeden z takich kryształów o wielkości 0,3 x 0,2 x 0,2 mm witrifikowałem w roztworze macierzystym uzupełnionym 30% glikolem etylenowym i umieściłem w wiązce rentgenowskiej stacji pomiarowej X11. Kryształ rozpraszał promieniowanie rentgenowskie z maksymalną rozdzielczością 0,86 Å. Szczegóły rejestracji danych opisałem w **H2**.

Rejestracja danych z tak wysoką rozdzielczością wymaga idealnych parametrów oprzyrządowania stacji pomiarowej. Niestety pewien obszar detektora ultra-rozdzielczych danych musiałem pominąć z interpretacji z powodu cienia jakie rzucała na detektor dysza schładzająca kryształ parami azotu do temperatury 100 K. Okazało się także, że kubek wiązki pierwotnej rzucał asymetryczny cień na detektor, co negatywnie wpłynęło na rejestrację danych niskorozdzielczych (**H2**).

Kryształ należał do tej samej formy krystalicznej, tj. $P4_32_12$ o parametrach komórki elementarnej $a = 51,891$, $c = 43,035$ Å. Wartości te zmierzone przy 100 K są odpowiednio 1,56 i 0,87%

mniejsze od zmierzonych w 290 K (**H1**). Przeprosowane dane charakteryzują się znakomitymi parametrami (Tabela 1, **H2**), przede wszystkim dużą, wynoszącą 17,3 krotnością i niskim wskaźnikiem $R_{\text{int}} = 0,036$.

2.4.2. Udokładnienie ultra-rozdzielczej struktury 11,13Ala15Arg52Leu BPTI

Udokładnienie struktury programem *SHELX97* (Sheldrick, 1997) opisaliśmy w **H2** a jego przebieg przedstawiliśmy w Tabeli 2, **H2**. Udokładnienie zaczęliśmy od współrzędnych atomów i izotropowych atomowych czynników przesunięcia (ang. *atomic displacement parameter*, ADP) pochodzących z modelu 1QLQ. Pierwsze mapy gęstości elektronowej wskazały, że zbędny jest etap dopasowania ciała sztywnego (ang. *rigid-body fit*).

Na etapie udokładniania anizotropowego zastosowaliśmy model anizotropowy dla wszystkich atomów, włącznie z atomami cząsteczek roztworu i alternatywnych konformacji. Z perspektywy czasu mogłoby się wydać, że rozsądniej (choć mniej dogodniej) byłoby zastosować izotropowe ADP dla grup posiadających niewielkie czynniki obsadzenia. Jednakże ustawienia domyślne programu *SHELX97* zakładają ograniczenie anizotropowych ADP, zarówno aby uniknąć nadmiernych różnic pomiędzy połączonymi atomami (DELU, SIMU) jak i utrzymać atomy tlenu należące do cząsteczek wody niemal izotropowo (ISOR). Należy nadmienić, że do ostatecznego zbudowania modelu stosowaliśmy domyślne więzy geometryczne programu *SHELX97*, używającego wartości docelowe określone przez Engha & Hubera (Engh & Huber, 1991) dla wartości łańcucha polipeptydowego oraz średnie wartości otrzymane z CSD (Allen & Kennard, 1991) dla jonów siarczanowych i cząsteczek glikolu etylenowego.

Położenia geometryczne atomów wodoru w grupach C–H i N–H wygenerowaliśmy automatycznie w programie *SHELX97*. Atomy wodoru siedmiu grup hydroksylowych również wygenerowaliśmy automatycznie lecz ich lokalizację zweryfikowaliśmy manualnie aby była zgodna z mapą różnicową gęstości elektronowej i oddziaływaniami wodorowymi. We wszystkich przypadkach osiągnęliśmy zadowalający efekt.

Budowanie modelu 11,13Ala15Arg52Leu BPTI i weryfikację jego poprawności prowadziliśmy za pomocą programu *O* (Jones *et al.*, 1991).

Nie powiodła się próba udokładnienia obsadzeń cząsteczek wody w przeciwieństwie do doświadczenia Walsh'a i współpracowników (Walsh *et al.*, 1998) podczas udokładniania struktury makrocząsteczkowej z podobną rozdzielczością.

Udokładnianie przy użyciu domyślnych więzów programu *SHELX97* zbiegło się przy wartości wskaźnika rozbieżności $R = 0.1040$ i $R_{\text{free}} = 0.1368$. Ponieważ stosunek refleksów do parametrów wynosił około 7, spróbowaliśmy usunąć lub poluznić więzy. Udało się to w pełni dla więzów geometrycznych obsadzonego w pełni łańcucha głównego. Poluzniliśmy również więzy nałożone na oddziaływania niewiążące poprzez zwiększenie (z 0.02 do 0.05) odchylenia standardowego parametru BUMP.

Następnie włączyliśmy refleksy ze zbioru testowego do ostatniego etapu udokładniania. Zbiegło się ono przy wartości $R = 0.1039$ i 7,23 refleksu na udokładniany parametr. Parametry charaktery-

zujące proces udokładniania przedstawiliśmy w Tabeli 3, **H2**. Zdeponowanej strukturze w PDB przypisano kod 1G6X.

Wszystkie etapy udokładniania przeprowadziliśmy stosując algorytm sprzężonych gradientów. Na koniec, wykonaliśmy jeden cykl udokładniania pełnomacierzowego bez jakichkolwiek więzów. Połączenie L.S. 1/BLOC 1 w programie *SHELX97* umożliwiło oszacowanie niepewności parametrów pozycyjnych.

2.4.3. Jakość ultra-rozdzielczej struktury 1G6X

Ultra-rozdzielczy model struktury 1G6X zawiera wszystkie atomy 11,13Ala15Arg52Leu BPTI i charakteryzuje się bardzo wysoką jakością. Cały łańcuch główny widoczny jest w mapie gęstości elektronowej $3F_o - 2F_c$ konturowanej powyżej $1,5 \sigma$ (a nawet 4σ).

Atomy wodoru w strukturze 1G6X widoczne są w różnicowej mapie gęstości elektronowej powyżej $2,5 \sigma$. W tej samej mapie widoczne są atomy H (nie ujęte w modelu) najlepiej uporządkowanych cząsteczek wody.

Jedynie dwa aminokwasy (omówione poniżej) znajdują się poza najbardziej uprzywilejowanym obszarem wykresu Ramachandrana. Z 95,7% aminokwasów znajdujących się w tym obszarze, struktura ta może równać się (pod tym względem) jedynie z wysokorozdzielczą strukturą 11,13Ala15Arg52Leu BPTI tj. 1QLQ oraz strukturą 1BPI (Parkin *et al.*, 1996).

Ostateczny cykl udokładniania algorytmem pełnomaciezowym stanowi najlepsze określenie jakości modelu. Oszacowane odchylenia standardowe (*ang. estimated standard deviations, e.s.d.s*) charakteryzujące długości wiązania C–C (często stosowane jako globalny wskaźnik jakości małowymiarowych struktur organicznych) są tak małe jak $0,006 \text{ \AA}$ i posiadają średnią wartość $0,010 \text{ \AA}$. Ostatnia wartość została obliczona dla wszystkich wiązań C–C atomów z pełnym obsadzeniem, wliczając w to wiązania C–C łańcuchów bocznych. Łańcuchy te, ze względu na m.in. znaczną swobodę są gorzej uporządkowane i tym samym obciążone większymi wartościami odchyleń standardowych. Przykładem błędów długości wiązań we fragmentach dobrze uporządkowanych są wartości e.s.d.s. wiązania karbonylowego – wynoszą one od $0,005$ do $0,020 \text{ \AA}$ ze średnią wartością $0,008 \text{ \AA}$.

2.4.4. Udokładnianie ultra-rozdzielczej struktury 11,13Ala15Arg52Leu BPTI bez i z rozluźnionymi więzami

Liczba refleksów przypadająca na parametr w końcowym cyklu udokładniania 11,13Ala15Arg52Leu BPTI (7,23) nie odbiega od sytuacji udokładniania małowymiarowych struktur niecentrosymetrycznych. Sugeruje to, możliwość udokładniania tej struktury bez jakichkolwiek więzów. Jednakże tak drastyczne podejście byłoby niewłaściwe przy udokładnianiu fragmentów struktury charakteryzujących się sporą mobilnością czy też nieporządkiem z powodu braku wystarczającej informacji o ich położeniu w danych dyfrakcyjnych.

Udokładniając ultra-rozdzielczą strukturę 1G6X zastosowaliśmy pośrednie i bardziej praktyczne rozwiązanie. Zachowaliśmy więzy dla łańcuchów bocznych a usunęliśmy je dla łańcucha głównego z wyjątkiem trzech aminokwasów (Leu29, Gly56 i Gly57) posiadających jego podwójną konformację. Pomimo tak znacznego zredukowania więzów udokładnianie przebiegało w sposób stabilny

i dość szybko zbiegło się do minimum, które było bliskie minimum modelu udokładnionego z zachowaniem więzów (Tabela 2, **H2**). Jest to wynik w dwójnasób pozytywny. Po pierwsze wskazuje, że poluznienie czy też całkowite usunięcie więzów jest w pełni uzasadnione w przypadku udokładniania wysokorozdzielczych struktur makromolekuł. Po wtóre, wskazuje na olbrzymi potencjał wysokorozdzielczych danych dyfrakcyjnych w „kierowaniu” udokładniania uporządkowanych modeli makrocząsteczek. Do pewnego stopnia oznacza to, że konsekwencje niewłaściwych wartości docelowych biblioteki wartości stereochemicznych mogą być nie aż tak poważne jak mogłoby się wydawać.

Stabilność udokładniania z i bez więzów zilustrowaliśmy w Tabeli 4, **H2**. Wartości r.m.s.d. nałożonych na siebie atomów C_{α} modeli z (RES) i bez (UNRES) więzów są minimalne i wynoszą 0,004 Å w pierwszym i 0,003 Å w drugim przypadku (**H2**). Wartości te są około 30 razy większe, choć nadal bardzo małe, jeśli porównamy w/w modele z modelem 1QLQ (Tabela 4, **H2**). Pomimo tego, że różnice pomiędzy modelami UNRES i RES są niewielkie, należy podkreślić, że usunięcie więzów stereochemicznych jest metodologicznie ważne, ponieważ położenia atomów udokładnionych bez więzów ujawniają obraz, który w przeciwnym razie może być zamazany poprzez efekt „zakładanego modelu”.

2.4.5. Stereochemia ultra-rozdzielczego modelu 1G6X

Wysoka jakość modelu wraz z częściowym udokładnianiem bez więzów i oszacowaniem błędów parametrów, umożliwia analizę stereochemicznych parametrów struktur białek. Niektóre z tych parametrów tj. rozkład wartości kątów $N-C_{\alpha}-C$, odchylenia wiązania peptydowego od planarności i konformacja asparagin wykazują niezwykle cechy w porównaniu z wartościami akceptowanymi jako standardowe i stosowane w bibliotekach stereochemicznych.

Wartości kąta $N-C_{\alpha}-C$ w wysokorozdzielczych strukturach białek charakteryzują się sporym rozrzutem (Esposito *et al.*, 2000). Rozpiętość tych wartości w 1G6X jest znaczna, biorąc pod uwagę r.m.s.d tej wartości wynoszące jedynie 0,6°. Jak wynika z Ilustracji 1 w **H2** wartości tego kąta mogą wahać się 5° od wartości docelowej 111,2°. W górnej granicy tego rozkładu występuje wartość 118° odpowiadająca tandemu dwóch glicyn, 36 i 37, należących do pętli wspomagającej. Nie ulega wątpliwości, że ten fragment struktury zinterpretowaliśmy właściwie w dobrze zdefiniowanej mapie gęstości elektronowej (Ilustracja 2a, **H2**). Pierścień aromatyczny Tyr35 jest akceptorem krótkiego oddziaływania $N-H\cdots\pi$ z grupą amidową łańcucha głównego Gly37. Może to wyjaśniać wyjątkową geometrię i chemiczną naturę tandemu reszt 36-37, jak i olbrzymie zmiany struktury pojedynczego mutantu Tyr35Gly BPTI (8PTI; Housset *et al.*, 1991).

Rozkład wartości kąta torsyjnego ω , który charakteryzuje konformację wokół wiązania peptydowego, jest bardzo szeroki (Ilustracja 3, **H2**). Charakteryzuje się on średnią wielkością 179,5° i odchyleniem standardowym 9,1°, podczas gdy niepewność poszczególnych wartości kąta ω , oszacowana na podstawie odwrócenia macierzy najmniejszych kwadratów, wynosi 0,6°. Jak wynika z Ilustracji 3 w **H2** dopuszczalne są odchylenia od planarności kąta ω wynoszące $\pm 20^\circ$. Tak duże wartości odchylenia sugerują konieczność weryfikacji rygorystyczności więzów narzucanych na planarności wiązania peptydowego. Więzy te wpływają także na wartości innych kątów torsyjnych

łańcucha peptydowego, na które zazwyczaj nie narzuca się więzów. Prowadzić to może do sztucznie wysokich zniekształceń na wykresie Ramachandrana.

Schemat wartości ADP wzdłuż łańcucha polipeptydowego 1G6X jest bardzo podobny do schematu struktury 1QLQ z tym, że odpowiadające wartości ADP są mniej więcej dwukrotnie mniejsze. Średnie wartości parametrów ADP atomów łańcucha głównego, łańcuchów bocznych i roztworu struktury 1G6X wynoszą odpowiednio 12, 16 i 29 Å².

Model 1G6X zawiera 12 aminokwasów posiadających podwójną konformację (wliczając 3 aminokwasy łańcucha głównego) czyli 21% wszystkich aminokwasów. W modelu 1QLQ jedynie 4 aminokwasy posiadają podwójną konformację. Podwójna konformacja mostka dwusiarczkowego Cys14-Cys38 jest identyczna w obu strukturach, a oba konformery posiadają takie same czynniki obsadzenia (w granicach błędu eksperymentalnego) (H2). Potwierdza to, że oba konformery znajdują się nieporządku statycznym. W obu strukturach N- i C-koniec jest uporządkowany. Różni się natomiast struktura tandemu glicyn poprzedzających C-koniec tj. Gly56-Gly57. Występują one w podwójnej konformacji z niemal identycznym obsadzeniem.

Dokładny opis podwójnych konformacji i próby ich racjonalnego wyjaśnienia w oparciu o strukturę zawarliśmy w H2.

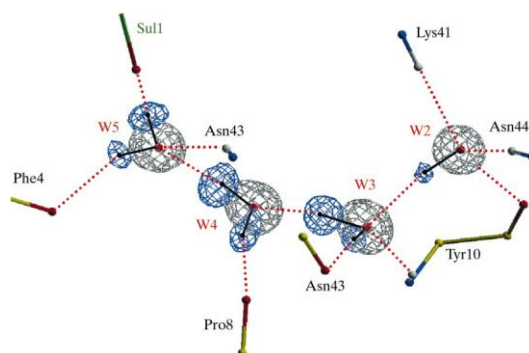
Podobnie wysoką liczbę aminokwasów w podwójnej konformacji zawierają struktury udokładnione z atomową rozdzielczością (np. Walsh *et al.*, 1998). Wydaje się, że nieporządek w strukturach białkowych (rozumiany jako widoczne, alternatywne konformacje) występuje częściej niż dotychczas zakładano. Jego skuteczną detekcją umożliwiają wysokorozdzielcze struktury udokładnione z wysoką precyzją (Esposito *et al.*, 2000).

2.4.6. Atomy wodoru i wiązania wodorowe w 1G6X

Generowanie atomów wodoru C–H i N–H przy wykorzystaniu standardowej geometrii jest proste. Wyjątkiem są atomy grupy metylowej i –NH₃⁺ które w procesie udokładniania wymagają optymalizacji osi obrotu wokół C–(C/M)H₃. Nieco inaczej wygląda sytuacja z grupami hydroksylowymi ponieważ obrót wokół osi C–OH jest stosunkowo swobodny. Dlatego też położenia atomów H ustalaliśmy biorąc pod uwagę otaczające je grupy akceptorowe wiązania wodorowego i/lub ich gęstość elektronową. Okazało się, że wszystkie atomy H, wygenerowane przez program SHELX97, spełniały te kryteria i zostały włączone do modelu. Atomy H wносиły wkład do wartości F_c lecz były udokładniane modelem sztywnego unoszenia. Nie wygenerowaliśmy atomów H dla cząsteczek wody jak i cząsteczek glikolu etylenowego. Atomy H analizowaliśmy za pomocą mapy gęstości elektronowej H-omit typu $mF_o - DF_c$, rekomendowanej przez Read'a (Read, 1997).

2.4.6.1. Atomy wodoru cząsteczek wody

Mapy gęstości elektronowej dla cząsteczek wody posiadających niewielkie wartości ADP ukazują położenie atomów wodoru. Najlepszym przykładem są cztery cząsteczki wody ukryte w wewnętrznej szczelinie BPTI przedstawione na Ilustracji 6. Wszystkie atomy H, z wyjątkiem jednego, są dobrze określone w mapie gęstości elektronowej konturowanej przy 0,12 e Å⁻³ (2,9 σ).



Ilustracja 6. Gęstość elektronowa i wiązania wodorowe wokół czterech wewnętrznych cząsteczek wody w strukturze 1G6X. Zaznaczyliśmy lokalizację atomów H, aby wskazać środki ciężkości gęstości elektronowej. Nie zostały one bowiem włączone do modelu.

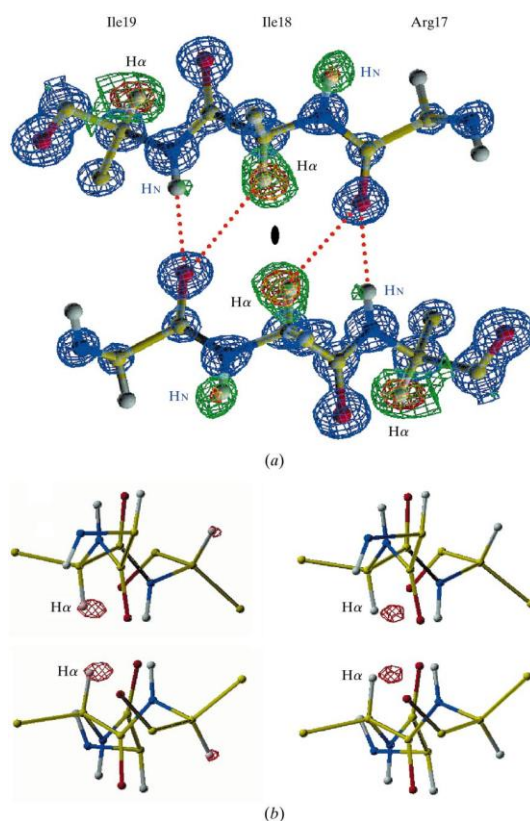
Zaobserwowaliśmy ciekawą cechę w kierunkowości wiązań wodorowych współtworzonych przez te atomy. Oprócz oddziaływań tych cząsteczek wody z BPTI tworzą one system homodromicznych wiązań wodorowych $H_2O \cdots H_2O$. W2 jest donorem wiązania wodorowego do W3, W3 do W4, W4 do W5. Cząsteczka wody W5 połączona jest z roztworem poprzez wiązanie wodorowe z cząsteczką jonu siarczanowego Sul1, którego to wiązania jest donorem.

2.3.6.2 Wiązania wodorowe C—H \cdots O

Od wielu lat w biologii strukturalnej zwraca się uwagę na wiązania wodorowe typu C—H \cdots X (Jeffrey & Sanger, 1991). W ultra-rozdzielczej strukturze BPTI gęstość elektronowa atomów wodoru widoczna jest w wielu miejscach struktury. Wiele atomów wodoru $C_\alpha H$ jest wyraźnie widocznych, szczególnie wtedy, gdy zaangażowane są one w wiązania wodorowe typu C—H \cdots O np. w arkuszu β .

Dobrym przykładem jest antyrównoległy, międzycząsteczkowy arkusz β przedstawiony na Ilustracji 7a. Atomy wodoru znajdujące się przy atomach C_α są wyraźnie widoczne już przy konturze 3 σ mapy różnicowej typu H-omit. Z ich położeń oczywistym jest, że wnoszą wkład C—H \cdots O do układu międzylańcuchowych wiązań wodorowych. Wkład w/w wiązań wodorowych w spójność arkusza β został zauważony przez wielu badaczy (Derewenda *et al.*, 1995; Fabiola *et al.*, 1997; Ridder *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2000). W przypadku antyrównoległego arkusza β grupa donorowa C_α —H poprzedzającego aminokwasu wzmacnia wiązanie wodorowe typu N—H \cdots O, którego akceptorem jest wspólna grupa karbonylowa przeciwnego łańcucha, Ilustracja 7a. Bardziej intrygujący jest obraz takiego arkusza β wzdłuż kierunku łańcuchów budujących ten arkusz (Ilustracja 7b). Widoczne jest wyraźne przesunięcie maksimów różnicowej mapy gęstości elektronowej typu H-omit względem położenia atomów wodoru wygenerowanych na podstawie założeń geometrycznych (Ilustracja 7a, lewa strona). Zjawisko to jest wyraźniejsze gdy w obliczeniu wartości F_c nie pominie się atomów wodoru w modelu sztywnego unoszenia (Ilustracja 7b, prawa strona).

Powyższe obserwacje wskazują, że wyidealizowana geometria atomu C_α stosowana do generowania atomów wodoru może nie być poprawna.



Ilustracja 7. Antyrównoległy, międzycząsteczkowy arkusz β w ultrarozdzielczej strukturze 1G6X. (a) gęstość elektronowa $3F_o-2F_c$ (kolor niebieski) i mapa różnicowa typu H-omit konturowana na dwóch poziomach. Atomy wodoru związane z atomem C_α widoczne są nawet przy bardzo wysokim poziomie konturu mapy ($0,12 \text{ \AA}^{-3}$ lub $3,0 \sigma$, kolor czerwony) i najwidoczniej biorą udział w międzyłańcuchowych wiązaniach wodorowych. Na ilustracji (a) arkusz β przedstawiony jest wzdłuż osi dwukrotnej. Na ilustracji (b) arkusz β został obrócony o 90° i oś dwukrotna biegnie w poprzek strony pomiędzy dwoma oddziałującymi łańcuchami. Przedstawiono je w dwóch sytuacjach. Lewa strona przedstawia je wraz z mapą różnicową (kontur $0,15 \text{ \AA}^{-3}$ lub $3,8\sigma$) obliczoną bez atomów wodoru $C_\alpha H$; prawa strona wraz z mapą różnicową (kontur $0,10 \text{ \AA}^{-3}$ lub $2,5\sigma$) obliczoną z wygenerowanymi w ich geometrycznych położeniach atomami wodoru $C_\alpha H$ wnoszącymi swój wkład do wartości F_c .

3. FtsH – jedyna istotna dla *Escherichia coli* peptydaza

3.1. Rola FtsH w komórce *E. coli*

Wewnątrzkomórkowa proteoliza służy m.in. pozbyciu się szkodliwych, nieprawidłowych białek powstających w wyniku mutacji, niezbalansowanej syntezy podjednostek białek oligomerycznych czy też niewłaściwego pofałdowania czy też rozfałdowania białek w wyniku np. szoku termicznego. Ważna jest także w modulacji aktywności białek jak np. czynników regulatorowych (Schmidt *et al.*, 1999).

W komórkach *Escherichia coli* wewnątrzkomórkowa proteoliza odbywa się za pośrednictwem pięciu, zależnych od ATP peptydaz: Lon, ClpXP, ClpAP, HslUV i FtsH. Posiadają one odrębne jak i pokrywające się specyficzności substratowe. FtsH posiada dwie wyjątkowe właściwości: jest

jedyną zależną od ATP peptydaz związaną z błoną komórkową i jedyną, która jest istotna dla wzrostu i przeżycia *E. coli*.

FtsH degradowuje białka niewłaściwie wbudowane w kompleksy membranowe (SecY, F_o a, YccA etc.). Szybka degradacja tych białek, jak i ich wysoka toksyczność w przypadku akumulacji w komórce wskazuje, że FtsH zapewnia integralność białek błonowych. Główną funkcją FtsH wydaje się jednak być kontrola jakości błony komórkowej poprzez specyficzne trawienie białka LpxC (decydującego wyznacznika poziomu biosyntezy lipopolisacharydów) – pozwala to na zachowanie równowagi w biosyntezie lipopolisacharydu i fosfolipidów (**H4**) (Ogura *et al.*, 1999).

FtsH posiada także bogatą paletę substratów cytoplazmatycznych: σ^{32} (Tomayasu *et al.*, 1995), białka ze znacznikiem SsrA (Herman *et al.*, 1998), białka CII, CIII i Xis bakteriofaga λ ; dlatego też mutacje w białku FtsH prowadzą do fenotypu lizogennego (Shotland *et al.*, 1997; Herman *et al.*, 1998; Leffers *et al.*, 1998).

Tak więc FtsH pełni ciekawą, podwójną rolę: (1) kontroluje jakość błony komórkowej poprzez właściwe składanie białek błonowych i zachowanie równowagi fosfolipidowej oraz (2) wpływa na stabilność wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych regulujących odpowiedzi adaptacyjne.

3.2. FtsH

Gen *ftsH* *E. coli* koduje polipeptyd zbudowany z 647 aminokwasów o masie 71 kDa. W pobliżu N-końca znajdują się dwa, kotwiczące białko w błonie komórkowej, segmenty transmembranowe, które prowadzą do powstania 70 aminokwasowej domeny periplazmatycznej i 520 aminokwasowej domeny cytoplazmatycznej. Sekwencja FtsH zawiera kilka motywów sekwencyjnych, w tym motyw Walker A (pętla P) i B wskazujących na funkcję FtsH jako ATPazy (Walker *et al.*, 1982). Motyw SRH (ang. *Second Region of Homology*) razem z motywami Walker przypisuje FtsH do grupy białek o bardzo niewiele mówiącej nazwie AAA (*ATPases associated with diverse cellular activities*). Ta nazwa odzwierciedla niepewność, czy poza wiązaniem i (najczęściej) hydrolizą ATP białka te posiadają wspólne cechy funkcjonalne. Białka AAA wykazują podobieństwo sekwencji w segmentach około 240 aminokwasowych jednakże biorą udział w procesach tak różnych jak fuzja membranowa, biogeneza organelli, regulacja transkrypcji czy też kontrola cyklu komórkowego (Ogura & Wilkinson, 2001).

Aminokwasy 417-421 FtsH, HEAGH, stanowią motyw wiążący jon cynku, charakterystyczny dla zależnych od Zn²⁺ metalopeptydaz.

Co ciekawe, FtsH wykazuje znaczne podobieństwo sekwencyjne (41% identyczności w 500 aminokwasach) do parapleginy, ludzkiego białka z mitochondrium – jego mutacja czy też delecja związana jest z chorobą Strümpflla (tj. dziedziczną paraplegią spastyczną) (Casari *et al.*, 1998).

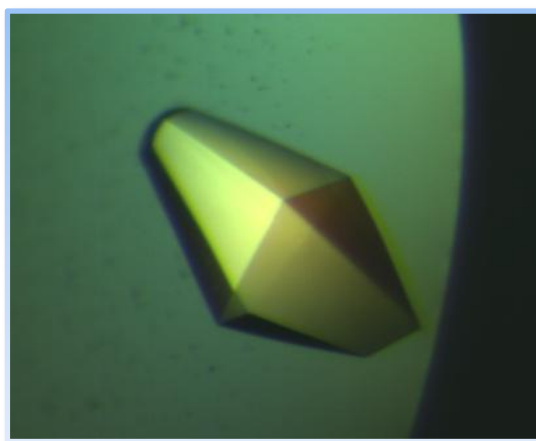
Zależne od ATP peptydazy są złożonymi, składającymi się z wielu podjednostek molekularnymi maszynami. Specyficznie rozpoznają substraty, które dzięki hydrolizie ATP rozwijają i transportują do wnętrza komory gdzie następuje ich hydroliza. Spektakularne wyobrażenie ich struktury i mechanizmu przyniosły badania proteosomu, HslUV i CplA(X)P (Schmids *et al.*, 1999; Bochtler *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000;

Wang *et al.*, 2001). HslU, ClpA i ClpX należą do większej od AAA rodziny – AAA⁺. Jej przedstawiciele nie posiadają motywu SHR (Ogura *at al.*, 2001; Neuwald *et al.*, 1999). Chociaż peptydazy zależne od ATP mogą posiadać wspólny mechanizm działania, to w przypadku FtsH występuje dodatkowa złożoność – błonowe substraty muszą zostać wyekstrahowane z błony lipidowej. Określona przez nas struktura domeny AAA białka FtsH z *E. coli* jest krokiem naprzód w zrozumieniu tego procesu. Strukturę przedstawiliśmy wraz z porównaniami do podobnych struktur domen białek AAA⁺.

Moim zamierzeniem było określenie struktury całego białka FtsH z *E. coli*. Posiadałem odpowiedni system nadekspresji w *E. coli* i protokół oczyszczania tego białka błonowego. W trakcie eksperymentów zmodyfikowałem system nadekspresji – z hodowli w 2-litrowych żłobkowanych kolbach na hodowlę w bioreaktorze. Kluczowe okazało się lepsze napowietrzenie hodowli i utrzymywanie pH na stałym poziomie. Dezintegrację komórek *E. coli* prowadziłem standardowo, używając sonikatora ultradźwiękowego i preparatu bakterii w rozkruszonym lodzie. Mimo stosowania krótkich impulsów ultradźwięków temperatura preparatu bakteryjnego znacznie się podnosiła, co negatywnie wpływało na wydajność oczyszczania FtsH. Wydajność znacznie się poprawiła gdy zamiast lizy ultradźwiękami zastosowałem prasę French'a. Jej komorę schładzałem przed lizą w chłodni, co chroniło preparat przed wzrostem temperatury. Z 5-litrowej hodowli bakteryjnej oczyszczałem do 2 mg FtsH. Niestety próby krystalizacji całego białka nie przyniosły rezultatu. Dlatego też postanowiłem określać jego poszczególne domeny, zaczynając od domeny AAA.

3.3. Oczyszczanie i krystalizacja AAA FtsH

Opracowaną przeze mnie procedurę ekspresji i oczyszczania domeny AAA FtsH z *E. coli* opisałem w **H3** i **H4**. Jej końcowy produkt powinien zawierać aminokwasy 126-398 FtsH plus 3 (GSH) i 2 (LE) dodatkowe aminokwasy po aminowej i karboksylowej stronie białka (pochodzące z etapu klonowania).



Ilustracja 8. Otrzymany przeze mnie kryształ AAA FtsH z *E. coli*. (**H3**).

Krystalizację przeprowadziłem metodą dyfuzji par, techniką wiszącej kropli stosując próby przesiewowe z różnorodnymi zestawami odczynników (Jancarik *et al.*, 1991, Brzozowski & Walton, 2001). Kryształy o wyglądzie bipyramidy tetragonalnej i wymiarach 0.2 x 0.1 x 0.1 mm wyrosły

z warunku nr 1 zestawu *Clear Strategy Screen II* (Brzozowski *et al.*, 2001) zawierającego jako czynnik strącający 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Ilustracja 8.

Analiza próbek AAA FtsH użytych w krystalizacji za pomocą elektroforezy SDS ujawniła dwa prążki o zbliżonej mobilności. Dlatego też próbkę białka pochodzącą z rozpuszczonego kryształu wysłałem do sekwencjonowania. Pięć cykli degradacji Edmana pozwoliło odczytać sekwencję MLTED odpowiadającą aminokwasom 144-148 FtsH. Tak więc białko zostało dodatkowo przycięte po Arg143 generując domenę AAA FtsH zawierającą aminokwasy 144-398 z dodatkową leucyną i kwasem glutaminowym na C-końcu. Oczyszczanie AAA FtsH obejmowało wiele etapów a końcowy produkt był bardzo jednorodny. Dodatkowe cięcie należy więc przypisać niespecyficznej aktywności trombiny. Oprócz oryginalnego miejsca cięcia w sekwencji trombina odcięła dodatkowe 21 aminokwasy (3 pochodzące z pET15b i 19 z sekwencji FtsH) GSHMQGGGGKKGAMSFGKSKAR↓MLTED. Takie niespecyficzne cięcie nie jest zjawiskiem rzadkim. Nie występuje ono przy chemicznym odcinaniu znaczników powinowactwa. Przykład takiego podejścia omówiłem przy okazji wysokorozdzielczej struktury inhibitora z nici jedwabiu *GmSPI-2* w **H8**.

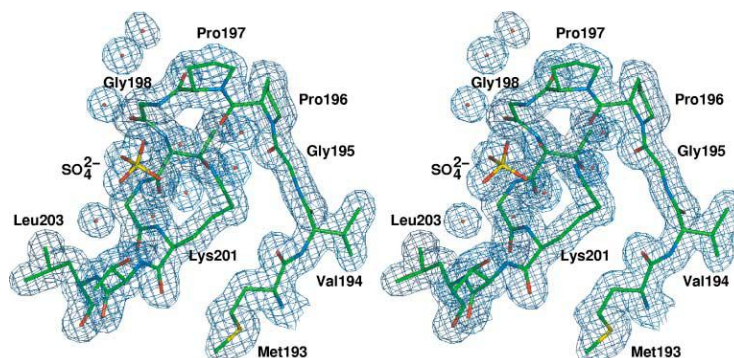
3.4 Rejestracja, procesowanie danych, rozwiązanie i udokładnienie struktury

Jeden witrafikowany kryształ (roztwór macierzysty uzupełniony 25 % glicerolem) umożliwił mi zarejestrowanie wysokorozdzielczych, 1,5 Å, synchrotronowych (ID14-2, ESRF, Grenoble, Francja) danych dyfrakcyjnych, charakteryzujących się świetnymi parametrami opisanymi w **H3**. Dane przeprocesowałem programami *DENZO*, *SCALEPACK* (Otwinowski *et al.*, 1997) i z pakietu *CCP4* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Posiadają one symetrię $P4_1(3)2_12$. Parametry komórki elementarnej, współczynnik Matthews'a i zawartość rozpuszczalnika wskazują, że w części asymetrycznej komórki elementarnej znajduje się jeden monomer AAA FtsH (**H3**).

W czasie gdy przeprocesowałem dane, znane były struktury kilku domen AAA w formie monomerów czy też heksametrów (Ogura & Wilkinson, 2001). Funkcjonalnymi formami białek zawierających domeny AAA są koliste mono- lub hetero-oligomery. Mikroskopia elektronowa FtsH wykazała, że białko to tworzy struktury koliste, choć nie udało się zidentyfikować liczby podjednostek w takiej strukturze (Shotland *et al.*, 1997). Symetria 422 kryształu AAA FtsH oraz zakładany monomer w części asymetrycznej wykluczały istnienie heksameru. Nie udało mi się rozwiązać struktury AAA FtsH metodą podstawienia cząsteczkowego stosując jako modele różne struktury domen AAA⁺ m.in. domeny D1 białka p97 posiadającego najwyższe podobieństwo sekwencji do AAA FtsH (Zhang *et al.*, 2000).

Strukturę rozwiązałem metodą pojedynczego podstawienia izomorficznego z anomalną dyfrakcją monochromatyczną (*ang. single-wavelength anomalous diffraction, SAD*) wykorzystując dane natywne i SAD dla pochodnej AAA FtsH z chlorkiem metylortęci oraz programy *SOLVE* (Terwillinger *et al.*, 1999), *MLPHARE* (Otwinowski, 1991) i *DM* (Cowtan, 1994) (**H4**).

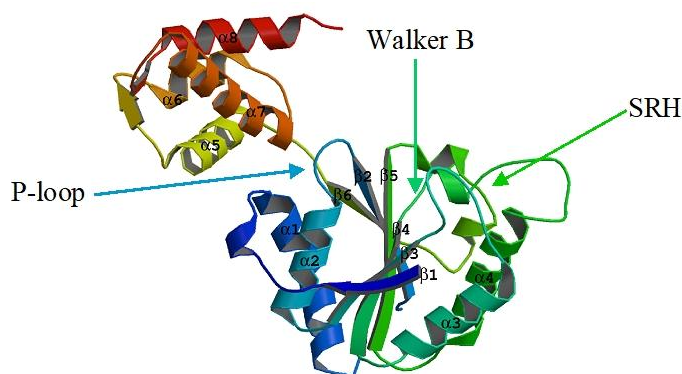
Mapy gęstości elektronowej uzyskane programem *DM* były tak dobrej jakości, że umożliwiły automatyczne zbudowanie częściowego modelu procedurami *warpNtrace* programu *ARP* (Perrakis *et al.*, (1997).



Ilustracja 9. Interpretacja ostatecznej mapy gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ o konturze 1σ przedstawiająca fragment pętli P z jonem SO_4^{2-} w miejscu zajmowanym przez grupę β -fosforanową domniemanej cząsteczki ATP (ilustracja stereograficzna).

Dalsze etapy udokładnienia struktury przeprowadziłem w miarę standardowy sposób i opisałem w **H4**.

Doskonałej jakości mapy gęstości elektronowej (Ilustracja 9) umożliwiły mi zbudowanie modelu struktury AAA FtsH rozciągającego się od metioniny 144 do dodatkowej leucyny na C-końcu. Jedyna przerwa w łańcuchu występuje pomiędzy aminokwasami 180 a 185 – brak jest dla nich gęstości elektronowej i przyjąłem, że są one nieuporządkowane. Dodatkowo model zawiera 384 cząsteczki wody i pięć jonów siarczanowych. Model AAA FtsH charakteryzuje się dobrymi parametrami geometrycznymi (na wykresie Ramachandrana jedynie 6,7 % aminokwasów występuje w regionie dodatkowo uprzywilejowanym) i statystycznymi: $R = 15,4 \%$, $R_{\text{free}} = 17,8 \%$.



Ilustracja 10. Struktura AAA FtsH (**H4**).

3.5. Struktura AAA FtsH

AAA FtsH z *E. coli* posiada strukturę dwudomenową: aminokwasy 144-323 tworzą domenę α/β (tj. podklasę otwartego arkusza β) zawierającą klasyczny motyw wiążący nukleotyd, a aminokwasy 327-398 tworzą wiązkę czterech helis (Ilustracja 10).

Rdzeń motywu wiążącego nukleotyd stanowi 6-łańcuchowy, mieszany arkusz β otoczony z każdej ze stron dwiema helisami α . Schemat wiązań wodorowych łańcucha głównego helisy α -1 jest zaburzony w związku z czym jest ona znacząco zgięta. Może to być spowodowane oddziaływaniami odpychającymi pomiędzy 6 resztami kwasu glutaminowego, zgrupowanymi po jej zewnętrznej stronie.

Zachowawcze motywy modułu AAA zgrupowane są w pobliżu C-końca łańcuchów β . Pętla P łączy łańcuch β 2 z helisą α 2 (Ilustracja 10) podczas gdy motyw Walker B tworzy łańcuch β 4 i część pętli łączącej go z helisą α 4. Motyw SRH zaczyna się pod koniec łańcucha β 5 i obejmuje meandrującą pętlę zawierającą dwa quasi-helikalne segmenty, które łączą łańcuchy β 5 z β 6, Ilustracja 10.

AAA FtsH z *E. coli*, jak i inne domeny AAA^+ zdeponowane w bazie PDB są odmianami na wspólny strukturalny temat podobnego do RecA zwoju wiążącego nukleotydy, połączonego przy C-końcu ze strukturalnie mniej zachowawczą, różnej wielkości domeną helikalną. Najbardziej oczywistą różnicą pomiędzy AAA FtsH a innymi domenami AAA^+ jest powiększenie wspólnego im, równoległego, 5-łańcuchowego arkusza β do 6-łańcuchowego w wyniku upakowania się aminokwasów 145-149 w sposób antyrównoległy wzdłuż krawędzi arkusza β .

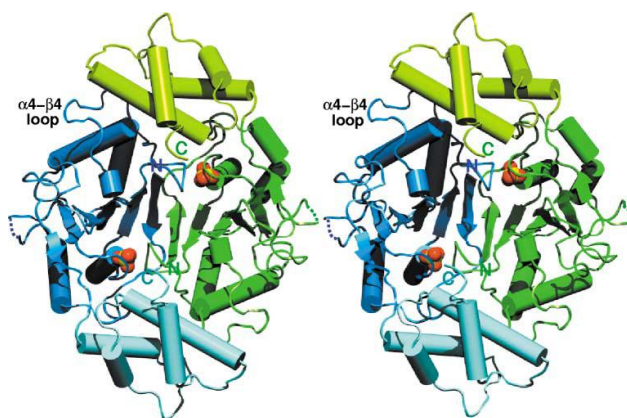
Sekwencja domeny AAA FtsH wykazuje największe podobieństwo do domen ATP-azowych białek p97 i NSF. Nałożenie atomów C_α pętli P tych białek daje ciekawy rezultat – pomimo, że białka te występują w trzech różnych formach tj. bez liganda (AAA FtsH), ze związanymi ADP (jedynie tu – adenozyno-5'-difosforan, p97-D1) i ATP (NSF-D2) struktury te wykazują spore podobieństwo strukturalne, które rozpościera się nawet poprzez łącznik do domeny helikalnej (Ilustracja 4, **H4**). Struktury są rozbieżne w dwóch miejscach: N-końcach, które wiodą do różnych domen tych wielodomenowych białek i pętlach odpowiadających pętli łączącej łańcuch β 4 z helisą α 4 w AAA FtsH. Konformacje wszystkich trzech pętli są różne. W przypadku AAA FtsH obecność 5 glicyn w szeregu 7 aminokwasów sugeruje, że pętla ta jest z natury rzeczy elastyczna. W kryształach, na konformację tej pętli wpływają oddziaływania międzycząsteczkowe. C-terminalna domena helikalna okazała się również podobna strukturalnie do domen helikalnych białek należących do rodziny AAA^+ . Co ciekawe, największe podobieństwo wykazuje ona do struktury domeny białka p97.

Kieszka wiążąca ligand w strukturze AAA FtsH nie zawiera nukleotydu. Jest to zgodne z obserwacją, że tę samą formę krystaliczną otrzymano przy krystalizacji AAA FtsH z czy też bez ATP lub niehydrolizowalnego jego analogu AMP-PNP. Oczywiście poszukując warunków krystalizacji AAA FtsH dodawałem do roztworu białka ATP czy też AMP-PNP. Nie otrzymałem jednak innych form krystalicznych AAA FtsH. W kieszeni rybozowo-adeninowej znajduje się za to jon siarczanowy. Co ciekawe, jego oddziaływanie z białkiem przypomina oddziaływanie atomów tlenu β -fosforanu cząsteczki ATP. (Ilustracja 5A, **H4**). Kluczową rolę w wiązaniu przez ATP Lys201 FtsH potwierdziła mutageneza punktowa tego aminokwasu – mutacja czyniła enzym nieaktywnym (Karata *et al.*, 1999). Jon siarczanowy tworzy oddziaływania polarne z atomami pętli P za pośred-

nictwem cząsteczek wody. Co ciekawe, jedna z nich tworzy wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową Thr202 identycznie jak jon magnezowy koordynujący atomy tlenu β - i γ -fosforanów w strukturze NSF-D2, zawierającego AMP-PNP. Struktury innych domen AAA⁺ przeważnie zawierają nukleotydy adeniny. Jednym z nielicznych wyjątków jest heksamer HslU w którym dwie, spośród sześciu podjednostek, nie zawierają nukleotydu a jon siarczanowy (Bochtler, *et al.*, 2000) i to w miejscu odpowiadającym jonowi siarczanowemu w omawianej strukturze AAA FtsH (Ilustracja 5B, H4)

Badania porównawcze sekwencji ATPaz zidentyfikowały zawierający około 19 aminokwasów zachowawczy motyw SRH. Motyw ten odróżnia rodzinę AAA od nadrodziny ATPaz typu Walker'a. Sekwencyjno-strukturalne badania porównawcze doprowadziły do zdefiniowania rodziny AAA⁺. Obejmuje ona podrodzinę AAA i dodatkowo zawiera białka posiadające zwój AAA lecz bez motywu SRH.

Przeszukiwawcze badania mutacyjne alaniną motywu SRH FtsH, obejmujące aminokwasy 299-317 wykazały znaczenie tego motywu dla funkcji FtsH. Aminokwasy Asn301, Asp307, Arg312 i Arg315 są istotne dla degradacji *in vivo* σ^{32} (Karata *et al.*, 1999, Karata *et al.*, 2001). Próbką wyjaśnienia powyższych wyników do struktury FtsH było zbudowanie przez nas modelu AAA FtsH w oparciu o strukturę domeny Nsf-D2 (Karata *et al.*, 2001). Wymodelowany motyw SRH zawiera krótki odcinek α -helikalny otoczony przez fragmenty w konformacji rozciągniętej. Łańcuchy boczne Asn301 i Arg315 znajdują się w odległości wiązania wodorowego od γ -fosforanu cząsteczki ATP (w przypadku Arg315 z γ -fosforanem cząsteczki ATP sąsiedniej podjednostki). Dlatego też w/w aminokwasom przypisano rolę sensora grupy fosforanowej.



Ilustracja 11. Kryystalograficzny dimer domeny AAA FtsH(144-398). Przedstawiliśmy dwa protomery związane osią dwukrotną. Jeden protomer zaznaczyliśmy odcieniami koloru niebieskiego a drugi odcieniami koloru zielonego. Widoczny jest 12-łańcuchowy arkusz biegnący przez środek dimeru z lewej do prawej. Związany jon siarczanowy zaznaczyliśmy żółtoczerwonymi sferami van der Waals'a. Aminokwasy niewidoczne w mapach gęstości elektronowej (181-185) zaznaczyliśmy linią kropkowaną. Ilustracja stereograficzna.

3.5.1. Oddziaływania międzycząsteczkowe

Analizując upakowanie AAA FtsH w sieci kryształu stwierdziłem, że tworzy on ścisły dimer (ukryta powierzchnia po jego utworzeniu wynosi 1502 Å²). Jak przedstawiłem na Ilustracji 11, dwa protomery, połączone poprzez dwukrotną oś kryystalograficzną, łącząc się tworząc sporą liczbę oddzia-

ływań międzycząsteczkowych. Przede wszystkim aminokwasy 145-149 każdego protomeru układają się w sposób antyrównoległy w centrum dimeru, tworząc oddziaływania typu arkusza β . W konsekwencji 6-łańcuchowy arkusz β każdego monomeru jest powiększony do 12-łańcuchowego arkusza β w dimerze. Dodatkowo siódma helisa α każdej podjednostki tworzy rozległe oddziaływania z pętlami β - α 3 i β 4- α 4 swojego sąsiada. Aminokwasy Asp223 i Phe224 zamykają natomiast kieszeń rybozowo-adeninową sąsiedniej cząsteczki dimeru wyjaśniając nieudane próby nasączenia kryształów AAA FtsH ligandami nukleotydowymi.

Struktury domen AAA⁺ krystalizowane jako odrębne fragmenty, czy też całe białka występowały jako pierścienie homoheksameryczne, heteropentamery lub monomery. Dimer domeny AAA⁺ w strukturze pojawił się po raz pierwszy.

Brak formy heksametrycznej struktury AAA FtsH(144-398) nie jest niespodzianką, gdyż badania Akiyamy i Ito (Akiyama *et al.*, 2000) wskazały, że najważniejsze czynniki oligomeryzacji FtsH znajdują się w jego części transmembranowej i periplazmatycznej.

Usunięcie z FtsH 123 N-terminalnych aminokwasów prowadzące do otrzymania FtsH(Δ TM) powoduje utratę 1) aktywności zarówno wobec substratów membranowych jak i cytoplazmatycznych oraz 2) zdolności tworzenia homooligomerów; FtsH(Δ TM) jest monomerem (Akiyama *et al.*, 2000). Co ciekawe, fuzja FtsH(Δ TM) z zamkiem leucynowym białka GCN4, generująca dimer *in vivo*, przywraca aktywność FtsH wobec substratów cytoplazmatycznych lecz nie membranowych. Fuzja FtsH(Δ TM) z pierwszym i drugim elementem trans-membranowym białka LacY przywraca aktywność FtsH wobec dwóch w/w grup substratów.

Trudno mi dowieść znaczenia obserwowanego tu dimeru FtsH(144-398). Jego prekursor tj. FstH(126-398) w eksperymentach jakie przeprowadziłem tj. filtracji żelowej i DLS zachowuje się jak monomer. Wydaje się więc prawdopodobne, że powstanie dimeru spowodowane jest dalszym skróceniem AAA FtsH o 18 aminokwasów co umożliwił aminokwasom 145-149 utworzenie arkusza β i wpływa na utworzenie dimeru. Powyższe rozważania oraz fakt zamknięcia miejsca wiążącego nukleotyd przez aminokwasy z sąsiedniej cząsteczki dimeru przemawia za tym, że dimer nie ma znaczenia fizjologicznego.

3.5.2. Modelowanie

Na podstawie posiadającego symetrię osi sześciokrotnej kompleksu NSF-D2 zbudowaliśmy model heksameru FtsH(144-398). Wybór podyktowany był podobieństwem sekwencji jak i wysoką rozdzielczością tego kompleksu. Aby otrzymać zadowalające upakowanie musieliśmy zmienić jedynie konformację pętli β 4- α 4, która jak wyżej wspomniałem pośredniczy w tworzeniu dimeru FtsH(144-398). Koniec C-terminalny znajduje się po stronie dystalnej (tj. zwrócony jest ku domenie peptydazowej) a koniec N-terminalny po proksymalnej stronie (tj. zwrócony jest ku błonie komórkowej) heksameru względem błony komórkowej. Umieszczenie kompleksu Mg-ATP w międzycząsteczkowych kieszeniach rybozowo-adeninowych heksameru FtsH(144-398) wymagało jedynie niewielkich zmian konformacyjnych łańcuchów bocznych. Mg-ATP tworzy z FtsH(144-398) typowe dla modułów AAA oddziaływania opisane w H4. Centralny otwór kompleksu ma wybitnie kwaśny charakter po jego stronie proksymalnej. Biorąc pod uwagę, że proteoliza substratów FtsH tj. YccA

i SecY zachodzi od ich N-końca (Kihara *et al.*, 1999) w/w ładunek może ułatwić początkowy etap proteolizy.

4. Wysokorozdzielcza, 1,6 Å, struktura monomeru peptydazy retrowirusa M-PMV

4.1. Peptydaza wirusa M-PMV

Małpi wirus Masona-Pfizera (ang. *Mason-Pfizer Money Virus*, M-PMV) jest retrowirusem wywołującym zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *Simian Acquired Immunodeficiency Syndrome*, SAIDS) u małpy, makaka królewskiego (Fine *et al.*, 1975; Fine & Schochetman, 1978). M-PMV wywołuje u tej małpy objawy podobne do tych wywoływanych przez wirusa HIV-1 u ludzi tj. AIDS. Ze względu na podobieństwo do człowieka makak królewski jest wykorzystywany jako zwierzę doświadczalne, np. w badaniach nad infekcjami wirusowymi, w tym HIV-1. Kluczową rolę w cyklu wirusa pełni kodowana przez M-PMV peptydaza (ang. *Protease*, PR) (Bauerova-Zabranska *et al.*, 2005; Svec *et al.*, 2004). PR jest niewielkim białkiem o masie 13 kDa. Forma aktywna PR jest homodimerem o typie struktury pepsyny (tj. retropepsyną). Centrum aktywne zawiera dwie pętle DTG (po jednej z każdego protomeru) z których każda wnosi po cząsteczce asparagianu wiążącej nukleofil jakim jest cząsteczka wody (Wlodawer *et al.*, 1989). Integralność retropepsynowego homodimeru zapewnia przede wszystkim utkanie z naprzemiennych N- i C-końców każdego z protomeru arkusz β .

Od czasu określenia struktury PR z wirusa HIV-1 białko to stało się przedmiotem intensywnych badań w celu racjonalnego projektowania leków. Kilkanaście inhibitorów PR HIV-1 stosuje się w leczeniu AIDS. Pojawianie się lekoopornych form HIV-1 wymaga zastosowania alternatywnych strategii. Zniszczenie lub niedopuszczenie do utworzenia homodimeru jest jedną z takich możliwości (Koh *et al.*, 2007) tym ciekawszą, że nie zakłócałyby działania natywnych peptydaz serynowych, które są monomerami.

Badania biofizyczne PR M-PMV wskazywały, że monomer PR występuje w stanie równowagi z dimerem. Forma monomeryczna przeważa a dodanie substratu lub inhibitora przesuwa równowagę w stronę dimeru. W/w badania były spójne z monomeryczną strukturą formy 12 kDa PR (ulegającej *in vitro* dodatkowemu procesowaniu) określoną za pomocą rezonansu magnetycznego NMR (Veverka *et al.*, 2003).

W eksperymencie użyliśmy formy 13PR (właściwie przeprocesowanej tj. Trp1–Ala114) z trzema mutacjami Cys7Ala/Cys106Ala/Asp26Asn. Mutacje cystein uniemożliwiają niekontrolowaną agregację S–S i naśladują aktywowaną Cys PR *in vivo*. Mutacja Asp26Asn zmienia miejsce aktywne PR tripletu DTG aby uniemożliwić samotrawienie.

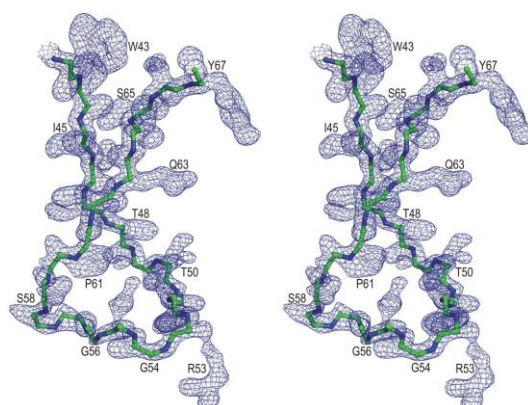
Powyższe białko krystalizowało stosunkowo łatwo w wielu formach krystalicznych z lub bez inhibitora zastosowanego jako "wabika" dimeryzacji. Kryształy rozpraszały promieniowanie rentgenowskie dając wiele, wysokiej jakości zestawów danych. Sam wraz z kolegami byłem zaangażowany w krystalizację, rejestrację i procesowanie danych dyfrakcyjnych. Jednakże wiele podjętych prób rozwiązania struktury metodą MR na przestrzeni ponad dziesięciu lat nie przyniosło żadnego efektu. Było to zastanawiające, gdyż teoretycznie był to niemalże idealny przypadek zastosowania

MR: niewielkie białko, wiele znanych struktur retropepsyn, znany nawet model monomeryczny (NMR) oraz wysokorozdzielcze i dobrej jakości dane dyfrakcyjne (**H5, H6**).

W rozwiązaniu problemu pomogli gracze komputerowi (przypuszczalnie nie posiadający związków z nauką) grający w grę internetową *Foldit* (Cooper *et al.*, 2010), która oparta jest na funkcji szacowania energii konformacyjnej pakietu *Rosetta* (Rohl *et al.*, 2004). Wiele tysięcy graczy próbuje rozwikłać problemy związane z przewidywaniem struktur białek. Do zadań dostępnych dla graczy w 2011 roku dodaliśmy nowe – stworzenie modelu peptydazy M-PMV, który pozwoliłby rozwiązać strukturę krystaliczną metodą MR (**H5, H6**). Jako model startowy użyliśmy jednego z modeli NMR'owskich 1NSO (Veverka *et al.*, 2003). W ciągu trzech tygodni gracze wygenerowali ponad milion różnych modeli PR. Jeden z nich, pozwolił rozwiązać strukturę krystaliczną metodą MR przy użyciu modułu *mr-rosetta* pakietu *Rosetta* (DiMaio *et al.*, 2011) (**H5**).

Do rozwiązania struktury użyliśmy danych otrzymanych dla formy krystalicznej $P2_1$ (**H6**). Kryształy tej formy rozpraszały z maksymalną rozdzielczością 1,6 Å. Parametry zarejestrowanych danych dyfrakcyjnych, jak i ich procesowania, zamieściliśmy w Tabeli 1, **H6**. Szczegóły rozwiązania i udokładnienia struktury znajdują się w **H6** a parametry charakteryzujące ten proces w Tabeli 1, **H6**. Udokładniony, wysokorozdzielczy model peptydazy M-PMV charakteryzuje się wysoką jakością i wiarygodnością, co pozwala na analizę aspektów strukturalnych tej struktury.

Asymetryczna część komórki elementarnej zawiera dwie monomeryczne cząsteczki PR. Obie są praktycznie identyczne (C_α r.m.s.d 0,18 Å) i posiadają topologię łańcucha polipeptydowego charakterystyczną dla retropepsyn (Miller *et al.*, 1989; Wlodawer *et al.*, 1989). Model zawiera także 154 cząsteczki wody. W strukturze brak jest inhibitora. Łańcuch polipeptydowy posiada znakomitą gęstość elektronową dla wszystkich elementów strukturalnych z wyjątkiem aminokwasów na N-(1-8) i C-końcu (104-114). Aminokwasy tworzące lotki (ang. *flaps*) tj. jedną z najważniejszych części struktury wykazują zwiększoną mobilność wyrażoną w większych wartościach ADP (zwłaszcza ich wierzchołków tj. Gln57-Ser58), lecz ich interpretacja w mapie gęstości elektronowej jest jednoznaczna (Ilustracja 12).



Ilustracja 12. Ilustracja stereograficzna łańcucha głównego pętli lotek i otaczających ją aminokwasów (Trp43-Tyr67) cząsteczki A peptydazy M-PMV. Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ o konturze 1σ . Łańcuchy boczne zostały pominięte dla przejrzystości ilustracji. Ilustracja stereograficzna.

4.2. Lotki

Lotka PR M-PMV (aminokwasy Ile45-Ser64, Ilustracja 12) posiada osobliwy kształt. Nie jest regularną spinką β , jak w innych strukturach retropepsyn, lecz posiada szerszą strukturę z krótką helisą 3_{10} (Gln57-Asn59). Lotka upakuje się w inny sposób nad miejscem aktywnym białka aniżeli jej „obniżona” konformacja w strukturach PR zawierających inhibitor lub substrat (Ilustracja 2a, **H6**). Ramię lotki jest krótsze z powodu obecności helisy 3_{10} i jej „tępego” zakończenia. Pierwszy łańcuch lotki przyjmuje konformację „obniżoną”, natomiast drugi łańcuch konformację „otwartą” (tj. taką jak bez substratu czy inhibitora).

4.3. Centrum aktywne

Pętla centrum aktywnego zawierająca triadę DTG (tutaj NTG) posiada konformację spotykaną u innych retropepsyn. Jednakże z powodu braku pary asparaginianów (pochodzących z homodimeru) brak jest kluczowych oddziaływań tj. $O^{\delta 1} \cdots Wat \cdots O^{\delta 1}$ i „uchwyty strażaka”. Ścisłejsze porównanie ujawnia, że pętla PR M-PMV znacznie odbiega od pętli w PR HIV-1 (Ilustracja 3, **H6**). Wskazuje to, że dopasowanie geometrii centrum aktywnego retropepsyn jest możliwe jedynie po utworzeniu dimeru.

4.4. Porównanie M-PMV PR z innymi strukturami retropepsyn

Nałożenie atomów C_{α} struktury PR M-PMV na struktury innych retropepsyn wskazuje na znaczne odstępstwa PR M-PMV od zwoju podjednostek w homodimerach innych retropepsyn (Tabela 2 w **H6**). Największe różnice dotyczą lotek. Rdzenie struktur posiadają odstępstwa $\sim 2\text{\AA}$ lecz gdy wziąć pod uwagę wszystkie atomy C_{α} sięgają one wartości $\geq 3,5\text{\AA}$. Co ciekawe dwa modele struktury NMR'owskiej (INSO) wykazują największe odchylenia spośród wszystkich struktur retropepsyn. Powyższe wyjaśnia nieudane próby rozwiązania struktury PR M-PMV za pomocą podstawienia cząsteczkowego (**H5**, **H6**).

4.5. Znaczenie monomerycznej struktury M-PMV PR

Nie ulega wątpliwości, że struktura M-PMV PR nie tworzy dimeru o znaczeniu biologicznym ponieważ N- i C-końce są kompletnie nieuporządkowane. Są one wymagane do jego utworzenia a w utworzonym już dimerze, tworząc naprzemienny arkusz β (N(A)-C(B)-C(A)-N(B)), wykazują duży stopień uporządkowania.

Powierzchnia monomeru, która normalnie tworzyłaby powierzchnię styku z drugą cząsteczką homodimeru, wykazuje równomiernie rozmieszczone ładunki pozytywne. Jest ona zupełnie różna od powierzchni styku protomeru PR HIV-1 – występują na niej zarówno ładunki pozytywne jak i negatywne, a przede wszystkim fragmenty hydrofobowe (Ilustracja 4, **H6**). Może to, choć częściowo, wyjaśniać dlaczego bez inhibitora lub substratu PR M-PMV może występować jak monomer, przynajmniej w formie D26N. Powyższa ilustracja przedstawia także, że poskręcana lotka w strukturze PR M-PMV zakrywa szczelinę w jakiej znajduje się miejsce aktywne, podczas gdy w „wyekstrahowanej” monomerycznej „strukturze” PR HIV-1 szczelina ta byłaby odkryta.

5. Projektowanie inhibitorów peptydaz serynowych opartych na strukturze SFTI-1 zawierających reszty peptoidowe w pozycji P1 – wysokorozdzielcza, 1,29 Å, struktura kompleksu trypsyny z NLys

5.1. Trypsyna i NLys

Struktura trypsyny z trzustki wołowej została określona już w 1974 roku i od tego czasu służy jako model serynowych endopeptydaz rodziny S1. Enzym specyficznie tnie substraty po karboksylowej stronie lizyny lub argininy (za wyjątkiem gdy występuje po nich prolina). Na uwagę zasługuje fakt, że trypsyna została wykryta już w roku 1931, wtedy jako sposób jej oczyszczania. Dostępna jest komercyjnie w formie liofilizowanej.

Inhibitor trypsyny z nasion słonecznika 1 (ang. *sunflower trypsin inhibitor*, SFTI-1) jest jednym z najmniejszych inhibitorów rodziny Bowman-Birka. Zawiera jedynie 14 aminokwasów tworzących cykliczny peptyd, który dodatkowo stabilizowany jest mostkiem dwusiarczkowym pomiędzy Cys3 i Cys11. Jego trwała, przypominająca β -spinkę do włosów, struktura wynika ze stabilizacji mostkami dwusiarczkowymi, siecią wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych oraz wiązaniem cis-peptydowym pomiędzy Ile7 a Pro8.

(NLys)⁵SFTI-1 (NLys) jest syntetycznym, monocyklicznym, peptydo-peptoidowym hybrydowym analogiem inhibitora trypsyny SFTI-1. W pozycję P1, zajmowaną w SFTI-1 przez lizynę, wprowadzono peptoid - N-(4-aminobutylo)glicynę. W konsekwencji łańcuch główny jest w tym miejscu achiralny, atom N nie może tworzyć wiązania wodorowego, a NLys jest odporny na proteolizę. Ta ostatnia cecha jest o tyle ciekawa, że cięte wiązanie pozostaje wiązaniem peptydowym podczas gdy wiązanie pomiędzy pozycją P1-P2 jest wiązaniem imidowym. Tak więc cięcie powinno nastąpić po karboksylowej stronie peptoidu ale najwyraźniej nie następuje.

5.2. Krystalizacja i rejestracja danych dyfrakcyjnych kompleksu trypsyna-NLys

Próby otrzymania kryształów kompleksu trypsyna-NLys metodą współkrystalizacji nie powiodły się. Trypsyna ulega autolizie. Podczas liofilizacji, a taką formę białka użyłem w eksperymencie, 10% trypsyny ulega w ten sposób degradacji, uwalniając peptydy, które mogą kompetencyjnie inhibować enzym (Vestling *et al.*, 1990). Jednym z takich peptydów jest S⁶¹GIQVR⁶⁶, który wiąże się z kieszenią enzymatyczną resztą argininy. Aminokwas ten ma większe powinowactwo do kieszeni wiążącej aniżeli lizyna występująca w NLys. Blokowanie miejsca wiązania enzymu przez fragment autokatalityczny był prawdopodobnie przyczyną niepowodzenia metody współkrystalizacji.

Jedną z metod otrzymania kompleksów białko-inhibitor jest nasączenie kryształów białka w roztworze zawierającym inhibitor. Warunkiem podstawowym jest otrzymanie odpowiedniej formy krystalicznej białka, która umożliwi wniknięcie i związanie się inhibitora z białkiem. Tak więc, kryształ powinien zawierać odpowiednio duże kanały roztworu i odpowiednio zorientowane cząsteczki białka. Zaletą tej metody w przypadku autolitycznego enzymu jest „unieruchomienie” jego cząsteczek w sieci krystalicznej co uniemożliwia autolizę, odmycie inhibitora zapobiegającego autolizie w czasie krystalizacji (w tym przypadku małowcząsteczkowej benzamidyny) i nasączenie kryształu odpowiednim inhibitorem.

Odpowiednie do metody nasączenia kryształy formy „otwartej” ($P2_12_12_1$, $a \sim 60$, $b \sim 64$, $c \sim 70$ Å) można otrzymać metodą dyfuzji par, techniką wiszącej kropli z roztworu 2,3 M siarczanu amonu jako związku wytrącającego. Niestety w identycznych warunkach powstają, i to o wiele częściej, kryształy formy „zamkniętej” ($P2_12_12_1$, $a \sim 55$, $b \sim 58$, $c \sim 66$ Å) nie nadające się do nasączenia NLys (Bartunik *et al.*, 1989). Kryształy obu form choć podobne morfologicznie, różniły się wielkością. Na tej podstawie udało mi się wyselekcjonować kryształy odpowiedniej do nasączenia inhibitora formy. Nasączenie prowadziłem przez kilka godzin używając liofilizowanego NLys, dodając go do momentu gdy liofilizat przestał się rozpuszczać.

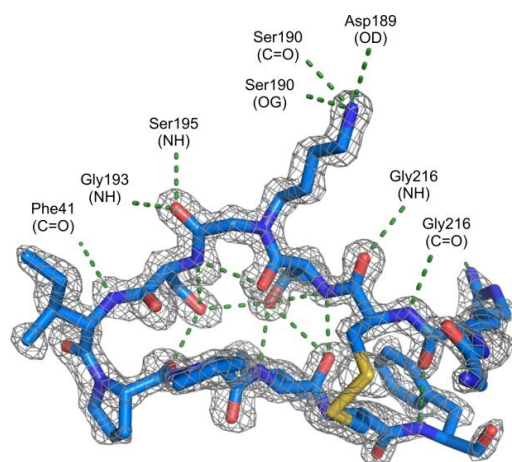
Kryształy witrifikowałem w temperaturze 100 K stosując jako krioprotektant roztwór do nasączenia z dodatkiem 25% glicerolu. Zarejestrowałem synchrotronowe dane dyfrakcyjne (EMBL c/o DESY, Hamburg) charakteryzujące się wysoką rozdzielczością 1.29 Å, kompletnością 99,4%, krotkością 7.2 i niskim wskaźnikiem $R_{\text{int}} = 5.7\%$.

5.3. Wysokorozdzielcza struktura kompleksu trypsyna-NLys

Strukturę kompleksu rozwiązałem metodą podstawienia cząsteczkowego (modelem 1SFI, Luckett *et al.*, 1999). Niskie wskaźniki $R = 12,6\%$ i $R_{\text{free}} = 15,7\%$ oraz pozostałe kryteria udokładnionej struktury kompleksu świadczą o wysokiej jakości udokładnionej i zdeponowanej w PDB (4HGC) struktury kompleksu.

Struktura kompleksu (NLys)⁵SFTI-1-trypsyna jest, jak można się było spodziewać, bardzo podobna do struktury kompleksu trypsyny z SFTI-1. Różnice strukturalne wyrażone jako r.m.s.d od nałożonych na siebie atomów C_{α} obu kompleksów wynoszą jedynie 0.155 Å.

NLys wiąże się z trypsyną w identyczny sposób jak natywny SFTI-1 czy też inne inhibitory rodziny Bowman-Birka. Mapa gęstości elektronowej NLys wyraźnie wskazuje, że wiązanie P1-P1' nie nosi nawet śladów częściowej hydrolizy (Ilustracja 13). Końcowe grupy ε-aminowe grup P1 nałożonych kompleksów znajdują się jedynie 0,2 Å od siebie a dwie cząsteczki wody wiążące się z w/w grupą w kieszeni wiążącej idealnie się nakładają.



Ilustracja 13. Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$, o konturze 1σ , wokół modelu inhibitora (NLys)⁵SFTI-1. Zaznaczyliśmy (linią przerywaną) między- jak i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe.

5.4. Rola trypsynowej Gln192

Struktura centrum katalitycznego trypsyny w obu kompleksach jest niemalże identyczna. Jedynym wyjątkiem jest Gln192. W kompleksie trypsyna-NLys posiada zupełnie inną konformację a jej cztery terminalne atomy charakteryzują się częściowym obsadzeniem (0,65). W takiej konformacji, łańcuch boczny Gln192 nie tworzy wiązań wodorowych. W strukturze 1SFI łańcuch boczny Gln192 tworzy wiązanie wodorowe z grupą karbonylową Thr4, znajdującą się w pozycji P2. Niemożliwa jest weryfikacja konformacji Gln192 poprzez inspekcję mapy gęstości elektronowej, ponieważ czynniki struktury dla 1SFI nie zostały zdeponowane w PDB. Niemniej jednak wartości ADP atomów łańcucha bocznego i ich całkowite obsadzenie wskazują, że jest on uporządkowany. Przyjmuje się, że jednocześnie wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchem bocznym Gln192 a grupą karbonylową reszty P2 i Ser214 a grupą amidową –NH grupy P1 „unieruchamiają” aminokwas P1 w pozycji umożliwiającej nukleofilowy atak atomu O^γ Ser195 na grupę karbonylową reszty P1 (Ilustracja 6, H7). W przeanalizowanych strukturach wielu kompleksów trypsyny z inhibitorami rodziny Bowman-Birka, Squash, Kunitza, Antistasin i Kazala w/w wiązanie pomiędzy Gln192 a P2 istnieje (Ilustracja 6, H7).

5.5 Znaczenie trypsynowej Ser214 w katalizie

Spośród około 200 ssaczych i bakteryjnych peptydaz serynowych typu trypsyny wszystkie, z wyjątkiem trzech, w pozycji 214 posiadają serynę (Gráf *et al.*, 2012). Mimo, że aminokwas ten nie należy do triady katalitycznej enzymu, jego wpływ na aktywność katalityczną jest znaczny (McGrath *et al.*, 1992). Ser214 znajduje się wewnątrz cząsteczki enzymu a jej atom łańcucha bocznego O^γ tworzy wiązanie wodorowe z Asp102 triady katalitycznej. Znaczenie łańcucha bocznego Ser214 w katalizie zostało solidnie ugruntowane (McGrath *et al.*, 1992). Zwrócono również uwagę na grupę karbonylową tego aminokwasu. Derewenda i współpracownicy zaproponowali na przykład, udział grupy C_{ε1}-H reszty His57 w wiązaniu wodorowym typu C-H...O=C z Ser214 i wskazali jak takie wiązanie mogłoby wpływać na obrót pierścienia imidazolowego o 180°, ułatwiając katalizę (Derewenda *et al.*, 1994). Sporządzili listę odległości (His57)C_{ε1}-H...O=C(Ser214) wśród 22 podobnych do trypsyny natywnych struktur i stwierdzili, że znajdują się one w zakresie 2,04–2,59 Å, ze średnią 2,3 Å. Zaproponowali także sposób w jaki takie wiązanie wodorowe stabilizuje strukturę rezonansową pierścienia imidazolowego (Derewenda *et al.*, 1994). Badania NMR jak i obliczenia kwantowo mechaniczne potwierdziły, że rotacja pierścienia His57 najprawdopodobniej jest ważnym etapem procesu katalitycznego (Ash *et al.*, 2000; Schneider, 2008).

Punktowa mutageneza nie umożliwia badania roli grupy karbonylowej Ser214 w wiązaniu substratu tak jak umożliwiła np. poznanie roli jej łańcucha bocznego (McGrath *et al.*, 1992). Struktura kompleksu enzymu z NLys ilustruje sposób w jaki peptoidowa reszta NLys selektywnie „wyłącza” oddziaływanie Ser214 z łańcuchem głównym reszty P1; oddziaływanie, które normalnie obecne jest w strukturze kompleksu trypsyny z natywnym SFTI-1. Struktura enzymu z NLys dostarcza ponadto dowodów na ważną rolę grupy karbonylowej Ser214 w wiązaniu substratu/inhibitora i katalizie.

6. Atomowa struktura *GmSPI-2*

6.1. Chemiczne odcinanie znaczników powinowactwa

Pomimo metodologicznych postępów, badania strukturalne białek nadal wymagają sporych ilości ich czystych preparatów. Trudno jest oszacować dokładną ilość i czystość potrzebną do tego typu badań choć przyjąć można, że rozpoczęcie eksperymentów krystalizacyjnych wymaga kilku miligramów białka o czystości co najmniej 95%. Ogromna większość badań strukturalnych dotyczy białek nadeksprymowanych w innych organizmach np. bakteriach czy też drożdżach. Sporym ułatwieniem ich oczyszczania jest zastosowanie znaczników powinowactwa (np. znacznika histydynowego, ang. *His-tag*) umożliwiających selektywne oczyszczenie białek je posiadających metodą chromatografii powinowactwa. Nieodcięte znaczniki powinowactwa mogą jednak wpływać na aktywność, czy też krystalizację białek fuzyjnych. Enzymatyczne ich usuwanie może prowadzić jednak do niespecyficznego trawienia oczyszczanego białka, jest dość kosztowne oraz niesie konieczność inaktywacji i usunięcia peptydazy odcinającej znacznik w dodatkowym etapie oczyszczania. Metody chemicznego odcinania znaczników powinowactwa są tańszą alternatywą ich proteolitycznego usuwania. Niestety wykazują one małą specyficzność i wymagają surowych warunków reakcji (np. wysokiej temperatury), co zazwyczaj uniemożliwia ich powszechne stosowanie w oczyszczaniu białek. W 2012 r. wykazano, że jony Ni(II) hydrolizują wiązanie peptydowe poprzedzające resztę seryny lub treoniny w sekwencji (S/T)THZ (Krężel *et al.* 2010). Potwierdzono również specyficzność cięcia dla szeregu peptydów i zaproponowano mechanizm tej reakcji (Kopera *et al.* 2010). Co więcej, cięcia można dokonać gdy oczyszczane białko immobilizowane jest w kolumnie chromatografii powinowactwa co eliminuje dodatkowy etap oczyszczania. Najważniejszy jednak jest fakt, że jony niklu hydrolizują jedynie wiązania peptydowe w sekwencjach (S/T)THZ znajdujących się na zewnątrz struktury białka znacznikach (Kopera *et al.* 2012).

6.2 *GmSPI-2*

Inhibitor peptydazy z ćmy *Galleria mellonella* (barciaka większego lub mola woskowego) *GmSPI-2* (ang. *Silk Proteinase Inhibitor 2*) zapewnia ochronę nici jedwabiu przed degradacją. *GmSPI-2* jest pierwszym białkiem dla którego wykazaliśmy możliwość jego na skalę preparatywną metodą chemicznego odcinania znacznika powinowactwa.

GmSPI-2 jest najmniejszym zwierzęcym inhibitorem należącym do rodziny serynowych inhibitorów Kazala (formalnie, jej nieklasycznej grupy 1) – posiada jedynie 36 aminokwasów.

Rekombinowany *GmSPI-2* w wyniku procedur klonowania i ekspresji w drożdżach *Pichia pastoris* został wydłużony o trzy aminokwasy (EAA) na N-końcu i leucynę na C-końcu. Znacznik histydynowy wraz z sekwencją rozpoznawalną przez jony Ni(II) –SRHWAPHHHHH znajdował się na C-końcu (**H8**).

6.3. Krystalizacja i rejestracja danych rentgenowskich

Krystalizację oraz rejestrację danych dyfrakcyjnych opisałem w **H8**. Mimo, że kryształy miały pokrój cienkich igieł o wymiarach 0.6 x 0.05 x 0.05 mm, to rozpraszały synchrotronowe promieniowanie rentgenowskie z rozdzielczością 0.95 Å. Jak przekonałem się po rozwiązaniu i udokład-

nieniu struktury, wynikało to z relatywnie małej zawartości rozpuszczalnika w kryształach (30.2%) oraz znacznego uporządkowania struktury (**H8**). Z powodu usterki oprogramowania musiałem przerwać rejestrację najlepiej rozpraszanego kryształu i dane połączyć z danymi zarejestrowanymi dla drugiego kryształu. Ostateczna rozdzielczość wyniosła 0.98 Å. Dane dyfrakcyjne charakteryzowały się znakomitymi parametrami m.in. wartości $R_{\text{int}} = 7.2\%$ (46.0%)¹, $I/\sigma I = 22.52$ (2.04), mozaikowości 0.13°, kompletności 94.8% (84.5%), krotności 12.9 (2.3). Ponadto nie wykazywały śladu zniszczenia radiacyjnego oraz charakteryzowały się brakiem anizotropii (**H8**). Jakość danych znalazła swoje odzwierciedlenie w jakości udokładnionego modelu *GmSPI-2*.

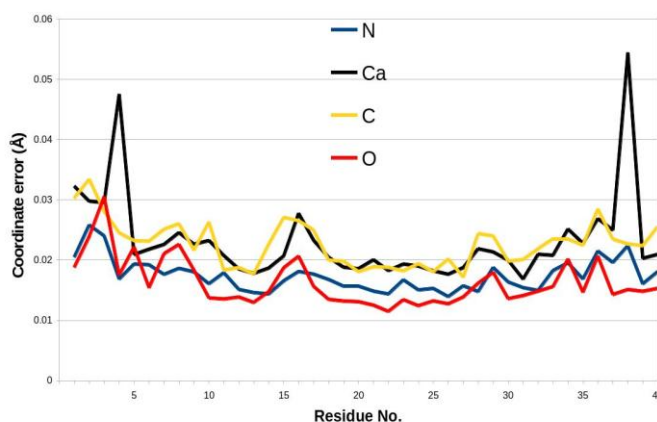
6.4 Rozwiązanie struktury i udokładnienie

Strukturę rozwiązałem metodą podstawienia cząsteczkowego. Jako modelu użyłem struktury pochodzącego z pijawki inhibitora tryptazy (ang. *lech-derived trypsin inhibitor*, LDTI; kod PDB 1AN1) posiadającego 40% identyczności i 60% podobieństwa sekwencji z *GmSPI-2*. Struktura ta okazała się zresztą najbardziej podobna do struktury *GmSPI-2* (**H8**).

Udokładnianie modelu opisałem w **H8**. Oprócz programów przeznaczonych dla cząsteczek białek z pakietu *CCP4* (Vagin *et al.*, 1997; Winn *et al.*, 2011) i *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004) użyłem także, z racji „niewielkiego” rozmiaru *GmSPI-2*, programu *SHELX97* (Sheldrick, 2008) oryginalnie przeznaczonego do udokładniania „małych cząsteczek”.

Sześciu łańcuchom bocznym *GmSPI-2* (Glu1, 8 i 38, Val 4, Asp10 i Leu23) oraz dwóm atomom C_{α} (Val4 i Glu38) przypisałem alternatywne konformacje. Dodatkowo atomom C_{γ} , C_{δ} , $O_{\epsilon 1}$ i $O_{\epsilon 2}$ Glu36 oraz C_{ϵ} i N_{ζ} Lys 15 i Lys18 przypisałem częściowe obsadzenie.

Liczba refleksów na udokładniany parametr wynosiła 4.5, dostatecznie dużo aby uzasadnić udokładnianie programem z więzami stereochemicznymi jedynie dla w/w atomów. W udokładnianiu makromolekuł jest to wyjątkowe. Pomimo tak radykalnego podejścia, 90.6% aminokwasów znalazło się na wykresie Ramachandrana w obszarze najbardziej uprzywilejowanym a pozostałe 9.4% w obszarze dodatkowo dozwolonym (**H8**).



Ilustracja 14. Odchylenia standardowe współrzędnych atomów łańcucha głównego oszacowane na podstawie udokładniania pełnomacierzowego.

¹ Wartości w nawiasach dotyczą najwyższego przedziału rozdzielczości tj. 1.01-0.98 Å.

Na końcu procesu udokładnienia przeprowadziłem cykl udokładnienia pełnomacierzowego metodą najmniejszych kwadratów, co dostarczyło precyzyjnych danych strukturalnych wraz z ich odchyleniami standardowymi – procedura wyjątkowo stosowana w udokładnianiu makromolekuł.

6.5. Jakość struktury

Oszacowane wartości odchylen standardowych współrzędnych atomów wahają się od 0,012 Å do 0,033 Å (Ilustracja 14). Na Ilustracji 15 widoczne jest, że błędy współrzędnych atomów posiadają mniejsze wartości dla atomów „cięższych” tj. tlenu a nieco większe dla „lżejszych” atomów azotu i węgla. Wartości odchylen standardowych dla głównej konformacji atomów łańcucha głównego, udokładnionych w podwójnych konformacjach, posiadają znacznie większe wartości (0,048 Å dla C_α Ala4 i 0,054 Å dla Glu38). Słuszność zastosowania tej procedury potwierdza podobny schemat wartości błędów współrzędnych atomów oszacowanych dla dwóch struktur udokładnionych z subatomową rozdzielczością: lizozymu udokładnionego z rozdzielczością 0,65 Å (Wang *et al.* 2007) i BPTI udokładnionego z rozdzielczością 0,86 Å (H2). Należy podkreślić, że takie dane pozwalają w statystycznie poprawny sposób dyskutować niuanse geometrii makromolekuł.

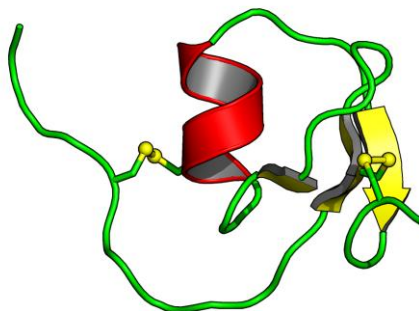
Średnia wartość ADP dla struktury *GmSPI-2* wynosi jedynie 6.5 Å². Co więcej, wartości ADP dla atomów łańcucha głównego wskazują, że jest on uporządkowany. Jest to raczej wyjątek niż reguła, gdyż często oba końce struktur białek są nieuporządkowane. W czasie deponowania struktury *GmSPI-2* w PDB istniały w PDB jedynie dwie struktury inhibitorów Kazala udokładnione z podobną rozdzielczością: 1ROR (1.10 Å) i 2GKR (1.17 Å). Podczas gdy wartości ADP dla atomów łańcucha głównego, atomów łańcuchów bocznych i atomów roztworu dla *GmSPI-2* wynoszą odpowiednio 4,8, 8,2 i 12,1 Å² dla w/w struktur są znacznie wyższe i wynoszą 16,7, 19,3 i 38,2 Å² dla 1ROR i 14,4, 17,0 i 32,6 Å² dla 2GKR. Tak małe wartości ADP świadczą o znacznym uporządkowaniu struktury *GmSPI-2* i są spójne ze znaczną siłą rozpraszania promieni rentgenowskich przez „cienkie” kryształy *GmSPI-2* i doskonałymi parametrami opisującymi udokładniony model struktury *GmSPI-2*.

Wartości wskaźników $R = 8.62\%$ dla 14133 refleksów z $F_o > 4 \sigma(F_o)$ i 10.57% dla wszystkich 17179 refleksów w ostatnim cyklu udokładnienia oraz pozostałe kryteria udokładnionej struktury kompleksu świadczą o wysokiej jakości udokładnionej i zdeponowanej w PDB (4HGC) struktury kompleksu.

6.6. Opis struktury

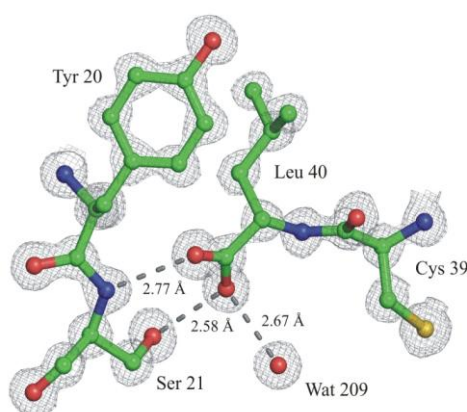
Struktura *GmSPI-2* podobna jest do innych struktur inhibitorów peptydaz należących do rodziny Kazala (Ilustracja 15). Aminokwasy Val12-Gly14, Thr19-Tyr20 i Leu33-Glu36 tworzą antyrównoległy arkusz β podczas gdy aminokwasy Leu23-Ala29 tworzą centralną α-helisę tworząc typowy dla tej rodziny zwój β₂αβ. Wykazuje ona jednak cechy nieklasycznych inhibitorów Kazala należących do grupy 1 (Shenoy, 2011). Posiada jedynie 2, zamiast 3, mostki dwusiarczkowe pomiędzy cysteinami 5 i 24 oraz 13 i 39. Nałożenie struktury *GmSPI-2* na strukturę należącą do (1) klasycznej rodziny Kazala – 3 domeny owomukoidu z indyka (OMTKY3, 2GRK), (2) nieklasycznej rodziny Kazala grupy 1 – domeny D1 inhibitora SPI-1 ze skrzyploczka (*CrSPI-1-D1*, 3PIS), (3) nieklasycznej rodziny Kazala grupy 2 – LDTI (1AN1) wykazało, że *GmSPI-2* strukturalnie najbliższa jest LDTI.

Średnie kwadratowe odchylenie od pozycji 37 nałożonych atomów C_{α} obu struktur wynosi 0.92 Å. Struktura *GmSPI-2* jest prawie identyczna z należącą do tej samej rodziny co ona struktury *CrSPI-1*, lecz jedynie do Asp34. Aminokwasy Trp34-Cys37 *CrSPI-1-D1* tworzą helisę 3_{10} której brak w strukturze *GmSPI-2*.



Ilustracja 15. Struktura *GmSPI-2*. Łańcuchy β i mostki dwusiarczkowe zaznaczyłem kolorem żółtym, helisę α - czerwonym, pętle - zielonym.

Najważniejszym miejscem struktury *GmSPI-2* jest w pełni eksponowana pętla wiążąca (ang. *Reactive Site Loop*, RSL) zawierająca w miejscu P1 Thr7. Jej wielkość jest typowa dla inhibitorów Kazala – siedem aminokwasów pomiędzy Cys5 i Cys13. Przyjmuje się, że jej „sztywność” wraz ze specyficzną sekwencją nadaje wysoką aktywność inhibitorom tej rodziny. Pętlę stabilizuje zazwyczaj 8 wiązań wodorowych. *GmSPI-2* posiada dodatkowe, silne (2.86 Å) wiązanie pomiędzy tlenem Thr6 a N_{ϵ} Trp25. Co ciekawe, w sekwencjach inhibitorów Kazala tryptofan w pozycji 25 występuje jedynie w *GmSPI-2* (Rimphanitchayakit & Tassanakajon, 2010).



Ilustracja 16. C-terminalny koniec struktury *GmSPI-2*. Na ilustracji przedstawiłem dwa końcowe aminokwasy, Cys39 oraz Leu40 oraz dwa aminokwasy, Tyr20 i Ser21 z cząsteczką symetrycznie równoważnej. Kontur mapy gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ wynosi 1.4 σ .

Miejsce cięcia znacznika His-tag znajduje się pomiędzy Leu40 a Ser41 białka fuzyjnego. Mapa gęstości elektronowej $2F_o - F_c$ dla końcowej reszty Leu40 „dojrzałego” inhibitora jest doskonała zarówno dla atomów łańcucha głównego, jak i łańcucha bocznego, włączając C-końcowe atomy grupy karboksylowej (Ilustracja 16). C-koniec jest „zakotwiczony” poprzez trzy silne wiązania wodorowe włączając oba atomu końcowej grupy karboksylowej (Ilustracja 16). Tak więc przedstawiona struktura dostarcza ostatecznego dowodu na specyficzność zastosowanej po raz pierwszy metody chemicznego odcinania znacznika wykorzystującej jony Ni(II) do hydrolizy wiązania peptydowego poprzedzającego sekwencję (S/T)XHZ).

Identyfikacja jonów metali w strukturach makromolekuł nastręcza problemy, często z powodu niedostatecznej rozdzielczości danych, lub jest zaniechana – automatycznie umieszcza się w gęstości elektronowej nie należącej do makromolekuły cząsteczki wody. W strukturze GmSPI-2 zidentyfikowałem cztery jony Na^{2+} – na podstawie długości tworzących przez nie wiązań, sfery koordynacyjnej oraz zgodnego w powyższymi wysokiego ich stężenia w roztworze krystalizacyjnym. Dwa jony Na^{2+} znajdują się w odległości jedynie 3.14 Å i dzielą w sferze koordynacyjnej dwie cząsteczki wody. Powyższy układ jest często spotykany w strukturach małych cząsteczek np. catena-(hexakis(μ_2 -Aqua)-di-sodium 2,5-dibenzoylterephthalate tetrahydrate) (Wang *et al.*, 2005). Można więc zaryzykować stwierdzenie, że powyższy układ jest substrukturą „małych cząsteczek” w strukturze makrocząsteczki.

7. Podsumowanie

W autoreferacie opisałem osiągnięcie naukowe pt. „Wysokorozdzielcze rentgenograficzne struktury peptydaz i ich inhibitorów” przedstawione w cyklu 8 (**H1-H8**) oryginalnych publikacji naukowych. Powyższe prace zostały zrecenzowane przez niezależnych recenzentów zaproponowanych przez edytorów czasopism. Powiązane tematycznie publikacje **H1-H8** zawierające szczegółową analizę nowych struktur peptydaz, ich inhibitorów oraz kompleksu peptydazy z inhibitorem wnoszą, mam nadzieję, duży wkład do wiedzy o budowie przestrzennej białek. Struktury te umożliwiają np. poznanie mechanizmów inhibicji enzymów tak istotnych w projektowaniu leków. Pomimo, że prowadzone przeze mnie badania należą do badań podstawowych, to struktury zdeponowaliśmy w publicznie dostępnej bazie danych PDB aby umożliwić swobodny dostęp do nich społeczności naukowej.

Do najważniejszych osiągnięć zaliczam:

1. Wysoko- i ultra-rozdzielczą strukturę 11,13Ala15Arg52Leu BPTI. Pomimo drastycznych, pod względem strukturalnym, mutacji konformacja kluczowego elementu struktury tj. pętla wiążąca jest identyczna jak w inhibitorze natywnym. Poza tym, po raz pierwszy w strukturze BPTI oba końce są doskonale określone i znajdują się blisko siebie tworząc silne oddziaływanie tj. mostek solny. W oparciu o tę strukturę, Botos i współpracownicy (Botos *et al.*, 2001) przeprowadzili reakcję cyklizacji 11,13Ala15Arg52Leu BPTI *in vitro*. Otrzymane kryształy okazały się być izomorficzne z kryształami otrzymanymi przeze mnie. Potwierdza to, wraz z określoną przez nich strukturą, poprawność określonej przez nas struktury.

2. Niezwykłe stabilne w wiązce rentgenowskiej kryształy (posiadające wysoką symetrię) 11,13Ala15Arg52Leu BPTI rosną bardzo szybko. Umożliwiło mi to otrzymanie kryształów bezpośrednio przed pomiarem synchrotronowym. Ta forma krystaliczna może stać się standardem w metodologicznych badaniach krystalograficznych w sposób analogiczny do kryształów lizozymu z białka jaja kurzego.
3. Doświadczenie jakie zdobyliśmy podczas udokładniania ultrarozdzielczej struktury 11,13Ala15Arg52Leu BPTI pozwala na sformułowanie kilku ogólnych uwag i wniosków:
 - a) Przy rozdzielczości 0,9 Å, lub lepszej i typowej dla kryształu białka gęstości kryształu, stosunek obserwacji do udokładnianego parametru wynosi 7 lub więcej.
 - b) Przy tak dużej liczbie refleksów całkowicie uprawnione jest w procesie udokładniania usunięcie wszystkich więzów geometrycznych z uporządkowanych fragmentów łańcucha głównego makrocząsteczki.
 - c) Standardowe wartości docelowe i ich odchylenia stosowane do stereochemicznego kontrolowania procesu udokładniania wydają się wymagać weryfikacji. Uwaga ta dotyczy zarówno przejawionej rygorystyczności w stosunku do planarności wiązania peptydowego jak i innych wielkości np. kąta N-C_α-C.
 - d) Struktury białek udokładniane z tak wysoką rozdzielczością mogą prowadzić do wysokiej jakości modeli. Można więc oczekiwać oszacowanych wartości odchyień standardowych w zakresie 0,005-0,010 Å.
 - e) W wyniku precyzyjniejszych i wysokiej jakości map elektronowych można oczekiwać większej proporcji (około 20%) alternatywnych konformacji w tak udokładnionych strukturach.
 - f) Precyzyjne udokładnienie umożliwia lepsze określenie oddziaływań cząsteczkowych obejmujących atomy wodoru a w licznych przypadkach nawet bezpośrednią ich wizualizację w mapach gęstości elektronowej.
4. Chociaż peptydazy zależne od ATP mogą posiadać wspólny mechanizm działania, to w przypadku FtsH występuje dodatkowa złożoność – błonowe substraty muszą zostać wyekstrahowane z błony lipidowej. Określona przez nas wysokorozdzielcza struktura domeny AAA białka FtsH z *E. coli* jest krokiem naprzód w zrozumieniu tego procesu.
5. Określiliśmy pierwszą monomeryczną strukturę peptydazy retrowirusowej. Dodatkowo, model jakim rozwiązaliśmy tę strukturę został zbudowany przez graczy gry komputerowej *Foldit*. Jest to pierwszy przypadek, co najmniej w biologii strukturalnej, wykorzystania potencjału tysięcy graczy do rozwiązania rzeczywistego, trudnego i ważnego problemu naukowego. Mam nadzieję, że struktura ta będzie podstawą do projektowania nowych leków antywirusowych.
6. Określiłem wysokorozdzielczą strukturę kompleksu inhibitora zawierającego resztę N-(4-aminobutylo)glicynę (peptoid) w pozycji P1, analogu SFTI-1, z trypsyną wołu. Określona z rozdzielczością 1,29 Å struktura wykazała, iż (1) wprowadzona modyfikacja nie zmieniła struktury modyfikowanego inhibitora; (2) badany analog (NLys)⁵-SFTI-1 wiąże się z enzymem w identyczny sposób jak naturalny peptydowy inhibitor SFTI-1; (3) Reszta trypsyny Ser214

wydaje się odgrywać kluczową rolę w mechanizmie hydrolizy enzymatycznej, gdyż jej blokada przez NLys powoduje brak hydrolizy wiązania P1-P1' inhibitora.

W wielu przypadkach, zawierające peptoidy inhibitory nie są rozpoznawane przez odpowiednie enzymy (Miller *et al.*, 1994). Peptydazy serynowe są pod tym względem wyjątkiem – tolerują peptoidy w pozycji P1 inhibitorów, ale ich nie trawią. Określona struktura kompleksu wyjaśnia mechanizm odporności proteolitycznej tych inhibitorów.

7. Dodana do C-końca inhibitora GmSPI-2 sekwencja SRHWAP-H6 zawiera wrażliwy na cięcie jonami Ni(II) tetrapeptyd. Oczyszczony w ten sposób GmSPI-2 został przeze mnie wykryty. W określonej przeze mnie strukturze krystalicznej z rozdzielczością 0,98 Å ostatni aminokwas, tj. Leu40, włącznie z C-terminalnymi atomami O i OXT, jest znakomicie określony, co potwierdza poprawność odcięcia znacznika. W czasie deponowania w PDB była to określona z najwyższą rozdzielczością struktura inhibitora z rodziny Kazala.

Duża liczba refleksów przypadająca na udokładniany parametr umożliwiła mi udokładnienie struktury GmSPI-2, bez więzów stereochemicznych, dla dobrze określonych części białka. Cykl udokładnienia pełnomacierzowego umożliwił mi określenie standardowych odchyleń dla wszystkich parametrów pozycyjnych, które dla posiadających pełne obsadzenie atomów łańcucha głównego wynoszą od 0,012 Å do 0,033 Å.

8. Bibliografia

- Akiyama, Y., Kihara, A. & Ito, K. (1996). *FEBS Lett.*, **399**, 26–28.
- Allen, F. H., Baalham, C. A., Lommers, J. P. M. & Raithby, P. R. (1998). *Acta Cryst.*, **B54**, 320–329.
- Apostoluk, W. & Otlewski, J. (1998). *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **32**, 459–474.
- Ash, E. L., Sudmeier, J. L., Day, R. M., Vincent, M., Torchilin, E. V., Haddad, K. C., Bradshaw, E. M., Sanford, D. G. & Bachovchin, W. W. (2000). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 10371–10376.
- Bartunik, H. D., Summers, L. J. & Bartsch, H. H. (1989). *J. Mol. Biol.* **210**, 813–828.
- Barrett, A. J. & McDonald, J. K. (1985). *Biochemical Journal*, **237**, 935.
- Bauerova-Zabranska, H., Stokrova, J., Strisovsky, K., Hunter, E., Ruml, T. & Pichova, I. (2005). *J. Biol. Chem.*, **280**, 42106–42112.
- Berndt, K. D., Güntert, P., Orbons, L. P. & Wüthrich, K. (1992). *J. Mol. Biol.*, **227**, 757–775.
- Bochtler, M., Hartman, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. & Huber, R. (2000). *Nature*, **403**, 800–805.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433–451.
- Botos, I., Wu, Z., Lu, W. & Wlodawer, A. (2001). *FEBS Letters*, **509**, 90–94.
- Brzozowski, A. M. & Walton, J. (2001). *J. Appl. Cryst.*, **34**, 97–101.

- Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Cocozza, S., Marconi, R., Dürr, A., Fontaine, B. & Ballabio, A. (1998), *Cell*, **93**, 973-983.
- Chen, Z. & Bode, W. (1983). *J. Mol. Biol.*, **164**, 283-311.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.*, **D50**, 760-763.
- Cooper, S., Khatib, F., Treuille, A., Barbero, J., Lee, J., Beenen, M., Leaver-Fay, A., Baker, D. & Popović, Z. (2010). *Nature*, **466**, 756-760.
- Cowtan, K. (1994). *Joint CCP4 and ESF/EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **31**, 34-38.
- Deisenhofer, J. & Steigemann, W. (1975). *Acta Cryst.*, **B31**, 238-250.
- Derewenda, Z. S., Derewenda, U. & Kobos, P. M. (1994). *J. Mol. Biol.*, **241**, 83-93.
- Derewenda, Z. S., Lee, L. & Derewenda, U. (1995). *J. Mol. Biol.*, **252**, 248-262.
- Di Cera, E. (2009). *IUBMB Life*, **61**, 510-515.
- DiMaio, F., Terwilliger, T. C., Read, R. J., Wlodawer, A., Oberdorfer, G., Wagner, U., Valkov, E., Alon, A., Fass, D., Axelrod, H. L., Das, D., Vorobiev, S. M., Iwai, H., Pokkuluri, P. R. & Baker, D. (2011). *Nature*, **473**, 540-543.
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.*, **D60**, 2126-2132.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.
- Epp, O., Eaton, E. L., Schiffer, M., Huber, R. & Palm, W. (1975). *Biochemistry*, **14**, 4943-4952.
- Esposito, L., Vitagliano, L., Sica, F., Sorrentino, G., Zagari, A. & Mazzarella, L. (2000). *J. Mol. Biol.*, **297**, 713-732.
- Fabiola, G. F., Krishnaswamy, S., Nagarjan, V. & Pattabhi, V. (1997). *Acta Cryst.*, **D53**, 316-320.
- Fine, D. L., Landon, J. C., Pienta, R. J., Kubicek, M. T., Valerio, M. J., Loeb, W. F. & Chopra, H. C. (1975). *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 651-658.
- Fine, D. L. & Schochetman, G. (1978). *Cancer Res.*, **38**, 3123-3139.
- Fritz, H. & Wunderer, G. (1983). *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **33**, 479-494.
- Gráf, L., Szilágyi, L. & Venekei, I. (2012). Rozdział 512, Chymotrypsin w "Handbook of proteolytic enzymes", Academic Press., 2626-2632.
- Hamiaux, C., Prange, T., Ries-Kautt, M., Ducruix, A., Lafont, S., Astier, J. P. & Veisler, S. (1999). *Acta Cryst.*, **D55**, 103-113.
- Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R. & Bouloc, P. (1997). *J. Bacteriol.*, **179**, 358-363.
- Herman, C., The'venet, D., Bouloc, P., Walker, G. C. & D'Ari, R. (1998). *Genes Dev.*, **12**, 1348-1355.
- Housset, D., Kim, K.-S., Fuchs, J., Woodward, C. & Wlodawer, A. (1991). *J. Mol. Biol.*, **220**, 757-770.

- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J. & Steigemann, W. (1974). *J. Mol. Biol.*, **89**, 73-101.
- Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M.R. & Steven, A.C. (2001). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 4328–4333.
- Ishikawa, T., Maurizi, M. R., Belnap, D. & Steven, A. (2000). *Nature*, **408**, 667-668.
- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991). *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jeffrey, G. A. & Saenger, W. (1991). *Hydrogen Bonding in Biological Structures*. New York: Springer-Verlag.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). *Acta Cryst. A*, **47**, 110-119.
- Jones, T. A. & Kjeldgaard, M. (1994). *O-The Manual*, Uppsala University Press, Uppsala.
- Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A. J., Tatsuta, T. & Ogura, T. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 26225-26232.
- Karata, K., Verma, C. S., Wilkinson, A. J. & Ogura, T. (2001). *Mol. Microbio.*, **39**, 890-903.
- Koh, Y., Matsumi, S., Das, D., Amano, M., Davis, D. A., Li, J., Leschenko, S., Baldridge, A., Shioda, T., Yarchoan, R., Ghosh, A. K. & Mitsuya, H. (2007). *J. Biol. Chem.*, **282**, 28709–28720.
- Kopera, E., Belczyk-Ciesielska, A. & Bal, W. (2012). *PLoS ONE*, **7**, e36350.
- Kopera, E., Krężel, A., Protas, A. M., Belczyk, A., Bonna, A., Wyślouch-Cieszyńska, A., Poznański, J. & Bal, W. (2010). *Inorg. Chem.*, **49**, 6636-6645.
- Krężel, A., Kopera, E., Protas, A. M., Poznański, J., Wyślouch-Cieszyńska, A. & Bal, W. (2010). *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3355-3366.
- Leffers, G. G., Jr. & Gottesman, S. (1998). *J. Bacteriol.*, **180**, 1573–1577.
- Lubkowski, J. & Wlodawer, A. (1999). *Acta Cryst.*, **D55**, 335-337.
- Luckett, S., Garcia, R. S., Barker, J. J., Konarev, A. V., Shewry, P. R., Clarke, A. R. & Brady, R. L. (1999). *J. Mol. Biol.*, **290**, 525–533.
- Marshudov, G. N., Lebedev, A., Vagin, A. A., Wilson, K. S. & Dodson, E. J. (1999). *Acta Cryst.*, **D55**, 247-255.
- McGrath, M. E., Va'squez, J. R., Craik, C. S., Yang, A. S., Honig, B. & Fletterick, R. J. (1992). *Biochemistry*, **31**, 3059–3064.
- Miller, S. M., Simon, R. J., Ng, S., Zuckermann, R. N., Kerr, J. M. & Moos, W. H. (1994). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 2657–2662.
- Mowbray, S. L., Helgstrand, C., Sigrell, J. A., Cameron, A. D. & Jones, A. T. (1999). *Acta Cryst.*, **D55**, 1309-1319.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. & Koonin, E. V. (1999). *Genome Res.*, **9**, 27–43.

- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, L.-H., Fierke, C. A., Jackman, J. E., Raetz, C. R. H., Coleman, J., Tomoyasu, T. & Matsuzawa, H. (1999). *Mol. Microbiol.*, **31**, 833-844.
- Ogura, T. & Wilkinson, A. J. (2001). *Genes Cells*, **6**, 575-597.
- Otwinowski, Z. (1991). In *Daresbury Study Weekend Proceedings* (Warrington, UK; SERC Daresbury Laboratory), 80-85.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.
- Ortega, J., Singh, S. K., Ishikawa, T., Maurizi, M. R. & Steven, A. C. (2000). *Mol. Cell*, **6**, 1515-1521.
- Parkin, S., Rupp, B. & Hope, H. (1996). *Acta Cryst.*, **D52**, 19-29.
- Perrakis, A., Sixma, T.K., Wilson, K.S. & Lamzin, V.S. (1997). *Acta Cryst.*, **D53**, 448-455.
- Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K.M. & Baker, D. (2004). *Methods Enzymol.*, **383**, 66-93.
- Rawlings N. D., Tolle D. P. & Barrett A. J. (2004). *Biochem. J.*, **378**, 705-16.
- Ridder, I. S., Rozeboom, H. J. & Dijkstra, B. W. (1999). *Acta Cryst.*, **D55**, 1273-1290.
- Rimphanitchayakit, V. & Tassanakajon, A. (2010). *Dev. Comp. Immunol.*, **34**, 377-386.
- Satow, Y., Cohen, G. H., Padlan, E. A. & Davies, D. R. (1986). *J. Mol. Biol.*, **190**, 593-604.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157-162.
- Scheidig, A. J., Hynes, T. R., Pelletier, L. A., Wells, J. A. & Kossiakoff, A. A. (1997). *Protein Sci.*, **6**, 1806-1824.
- Schmidt, M., Lupas, A. N. & Finley, D. (1999). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 584-591.
- Schneider, S. (2008). *J. Phys. Chem.*, **B112**, 6837-6846.
- Shotland, Y., Koby, S., Teff, D., Mansur, N., Oren, D. A., Tatematsu, K., Tomayasu, T., Kessel, M., Bukau, B., Ogura, T. & Oppenheim, A. B. (1997). *Mol. Microbiol.*, **24**, 1303-1310.
- Simon, R. J., Kania, R. S., Zuckermann, R. N., Huebner, V. D., Jewell, D. A. Banville, S., Ng, S., Wang, L., Rosenberg, S. & Marlowe C. K. (1992). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 9367-9371.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.*, **A64**, 112-122.
- Sheldrick, G. M. & Schneider, T. R. (1997). *Methods Enzymol.*, **277**, 319-343.
- Shenoy, R. T., Thangamani, S., Velazquez-Campoy, A., Ho, B. & Ding, J. L. (2011). *PLoS ONE*, **6**, e188838.
- Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S. & McKay, D. B. (2000). *Cell*, **103**, 633-643.
- Svec, M., Bauerova, H., Pichova, I., Konvalinka, J. & Strisovsky, K. (2004). *FEBS Lett.*, **576**, 271-276.
- Terwillinger, T. C. & Berendzen, J. (1999). *Acta Cryst.*, **D55**, 849-861.

- Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K. & Niki, H. (1995). *EMBO J.*, **14**, 2551–2560.
- Vagin, A. & Tepyakov, A. (1997). *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025.
- van de Locht, A., Bode, W., Huber, R., Le Bonniec, B. F., Stone, S. R., Esmon, C. T. & Stubbs, M. T. (1997). *EMBO J.*, **16**, 2977-2984.
- Vestling, M. M., Murphy, C. M. & Fenselau, C. (1990). *Anal. Chem.*, **62**, 2391-2394.
- Veverka, V., Bauerova, H., Zabransky, A., Lang, J., Ruml, T., Pichova, I. & Hrabal, R. (2003). *J. Mol. Biol.*, **333**, 771–780.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). *EMBO J.*, **1**, 945–951.
- Wang, J., Song, J. J., Franklin, M. C., Kamtekar, S., Im, Y. J., Rho, S. H., Seong, I. S., Lee, C. S., Chung, C. H. & Eom, S.H. (2001). *Structure*, **9**, 177–184.
- Wang, D-D., Zhu, H-J., Song, G-L. & Wang, J-T. (2005). *Acta Cryst.*, **E61**, m2610-m2612.
- Wang, J., Dauter, M., Alkire, R., Joachimiak, A. & Dauter, Z. (2007). *Acta Cryst.*, **D63**, 1254–1268.
- Walsh, M. A., Schneider, T. R., Sieker, L. C., Dauter, Z., Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1998). *Acta Cryst.*, **D54**, 522-546.
- Winn, M. D., Ballarg, C. C., Cowtan, K. D. Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, A. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, W. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. & Wilson, K. S. (2011). *Acta Cryst.*, **D67**, 235-242.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J. & Kent, S. B. (1989). *Science*, **245**, 616–621.
- Wlodawer, A., Nachman, J., Gilliland, G. L., Gallagher, W. & Woodward, C. (1987). *J. Mol. Biol.*, **198**, 469-480.
- Wlodawer, A., Walter, J., Huber, R. & Sjolín, L. (1984). *J. Mol. Biol.*, **180**, 301-329.
- Zhang, E., St Charles, R. & Tulinsky, A. (1999). *J. Mol. Biol.*, **285**, 2089-2104.
- Zhang X., Shaw A., Bates P. A., Newman R. H., Gowen B., Orlova E., Gorman M. A., Kondo H., Dokurno P., Lally J., Leonard G., Meyer H., van Heel M. & Freemont P. S. (2000). *Mol Cell.*, **6**, 1473-84.

