

Streszczenie

Fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP) z *Escherichia coli* katalizuje odwracalną reakcję fosforolitycznego rozszczepienia nukleozydów purynowych na odpowiednią zasadę purynową i pentozo-1-fosforan. Białko jest homoheksamerem i w formie apo struktura wszystkich podjednostek jest taka sama. Dane literaturowe, dostępne w momencie rozpoczynania tej pracy, sugerowały, że strukturalnie białko jest trimerem dimerów, ponieważ miejsce aktywne każdej podjednostki w dimerze jest współtworzone przez dwa aminokwasy sąsiada z tego samego dimeru. To sugerowało również, że podstawową jednostką katalityczną białka jest dimer. Wyniki badań w roztworze, wydawały się potwierdzać tę hipotezę, ponieważ, zauważono niemichaelisowską kinetykę PNP wobec jonów fosforanowych ze współczynnikiem Hilla równym 0,5, wskazującym na silną negatywną kooperację [1]. Kilka, dostępnych w literaturze struktur krystalograficznych apo-enzymu i różnych kompleksów nie wyjaśniało mechanizmu, za pomocą którego informacja jest przekazywana między podjednostkami lub miejscami aktywnymi enzymu, ani też jaka jest rola kooperacji podjednostek w katalizie. W 2002 roku, została uzyskana struktura krystalograficzna, w której zaobserwowano zamkniętą konformację części miejsc aktywnych, po jednym w każdym dimerze, pozostałe podjednostki zachowały konformację otwartą miejsca aktywnego, jak w formie apo. Na podstawie tej struktury, został zaproponowany mechanizm katalizy, opisujący sekwencję zdarzeń w miejscu aktywnym [2], która polegałaby na zamknięciu miejsca aktywnego przy udziale Arg24. W tej konformacji miejsca aktywnego reszta Asp204, przy współpracy Arg217, może uprotonować nukleozyd, co zmienia rozkład ładunku na pierścieniu purynowym, prowadzi do destabilizacji i pęknięcia wiązania glikozydowego.

Celem pracy była weryfikacja zaproponowanego mechanizmu katalizy, poprzez badania mutantów miejsca aktywnego, oraz wyjaśnienie mechanizmu i znaczenia kooperacji między podjednostkami heksamerycznego białka.

Pierwszą przesłanką, że kooperacja zachodzi nie tylko wewnątrz dimeru, ale również pomiędzy nimi, były krzywe wiązania jonów fosforanowych, dla opisu których model wiązania z dwiema stałymi dysocjacji okazał się niewystarczający. Wiązanie opisywane trzema stałymi dysocjacji zostało potwierdzone przy pomocy kilku technik eksperymentalnych. Związanie pierwszego jonu fosforanowego prowadzi do powstania w białku trzech rodzajów miejsc aktywnych, jednego w konformacji zamkniętej i dwóch w konformacji otwartej, charakteryzujących się różnym powinowactwem do ligandu. Wobec tego fakt, że wiązanie nukleozydu okazało się być opisywane również trzema stałymi nie był zaskoczeniem. Istnienie trzech rodzajów miejsc wiążących zaobserwowano także w strukturach krystalograficznych.

Poprzez destabilizację kontaktów pomiędzy dimerami w heksamerze, uzyskano dimery, które okazały się nie być stabilne na tyle, aby prowadzić efektywną katalizę. Mutując Asp204, Arg217 i Arg24 na alaninę i prowadząc badania kinetyczne względem naturalnych, a także imitujących stan uprotonowany, substratów, wykazano, że, jak zaproponowano w 2002 roku, zmiana konformacyjna i protonacja nukleozydu są niezbędnymi etapami katalizy. Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano również mechanizm katalizy, uwzględniający kooperację pomiędzy podjednostkami białka w dimerze. W warunkach nasycenia substratami podjednostki otwarte i zamknięte w dimerach prowadzą katalizę w ścisłej współpracy. Gdy w zamkniętej podjednostce zachodzi reakcja fosforolizy, podjednostka otwarta właśnie ją zakończyła, następuje uwolnienie produktów i związanie kolejnej pary substratów, zamknięcie tej podjednostki i cykl zaczyna się od nowa. Jest to mechanizm zwany w literaturze anglojęzycznej flip-flop.

Poza istnieniem trzech typów miejsc aktywnych, podczas badań białka zaobserwowano także kilka

innych, niespodziewanych zjawisk, które nie dawały się wyjaśnić w ramach obowiązującego dla enzymów paradygmatu, że białko jest albo aktywne, albo nieaktywne. Spadek aktywności białka przechowywanego w -80°C ma wyraźnie dwufazowy charakter. Uwolnienie stężenia białka jako parametru dopasowania modelu wiązania do krzywej miareczkowania niezmiennie zwracało niefizycznie niskie wartości. W analizie miareczkowań kalorymetrycznych, gdzie parametrem dopasowania może być także stężenie frakcji nieaktywnej białka, rozumianej jako frakcja białka niezdolnego wiązać ligand, uwolnienie tego parametru, jako parametru dopasowania zawsze zwracało wartość stężenia białka wiążącego wyższą od stężenia białka aktywnego katalitycznie, wyznaczonego na podstawie pomiarów aktywności specyficznej wobec substratu naturalnego. Wszystkie te spostrzeżenia sugerowały konieczność zbadania procesu dezaktywacji białka. Badania takie przeprowadzono i wykryto przynajmniej dwa stany przejściowe, pomiędzy białkiem w pełni aktywnym i całkowicie nieaktywnym, niezdolnym do prowadzenia katalizy i do wiązania ligandów.

W pierwszym zidentyfikowanym stanie przejściowym, jeden z trzech dimerów staje się nieaktywny katalitycznie wobec naturalnych substratów, natomiast nadal jest w stanie wiązać ligandy i prowadzić fosforolizę substratów imitujących stan uprotonowany. Pozostałe dwa dimery są sprawne katalitycznie, każdy z nich zawiera podjednostkę, której miejsce aktywne przybiera konformację zamkniętą. Ta forma białka charakteryzuje się obniżoną aktywnością specyficzną w stosunku do enzymu, w którym w konformacji zamkniętej może być jedno miejsce aktywne w każdym z trzech dimerów. W kolejnym stanie przejściowym żadne z miejsc aktywnych nie może przejść do konformacji zamkniętej, zatem białko nie katalizuje fosforolizy substratów naturalnych, natomiast katalizuje fosforolizę substratów imitujących stan uprotonowany.

Zaproponowano model, który wyjaśnia wszystkie zaobserwowane fakty. Pokazano, że PNP z *E. coli* rzeczywiście jest heksamerem, a nie trimerem niezależnie funkcjonujących dimerów, ponieważ bez "wsparcia" strukturalnego, jakie zapewniają sąsiednie podjednostki, dimer nie jest w stanie prowadzić efektywnej katalizy.

Marta Małgorzata Narczyk

[1] K.F. Jensen, P. Nygaard: *Purine Nucleoside Phosphorylase from Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Purification and some properties.* Eur. J. Biochem. 1975, 51: 253-265

[2] G. Koellner, A. Bzowska, B. Wielgus-Kutrowska, M. Luić, T. Steiner, W. Saenger, J. Stępiński: *Open and closed conformation of the E. coli purine nucleoside phosphorylase active center and implications for the catalytic mechanism.* J. Mol. Biol. 2002, 315: 351-371

Abstract

Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) from *Escherichia coli* catalysis reversible reaction of phosphorolytic cleavage of purine nucleosides into corresponding purine base and pentose-1-phosphate. The protein is a hexamer, and in apo form all subunits are in the same conformation. Literature data available at the beginning of this work suggested, that structurally, the protein is in fact a trimer of dimers, because active site of particular subunit in a dimer is cocreated by two aminoacids from a neighbouring subunit of the dimer. This suggested, that the minimal catalytic unit in the protein is a dimer. Solution studies data seemed to confirm that hypothesis, as the kinetic towards phosphate ion in non-Michaelis, and is described by Hill coefficient equals 0,5, suggesting strong negative cooperation [1]. Several crystallographic structures of apo-enzyme and various complexes, available in the literature, did not explain the mechanism of cooperation signal transduction between subunits or active sites, neither what is the role of co-subunits in catalysis. In 2002, the crystallographic structure was obtained, in which a closed conformation of some active sites was observed, one in each dimer, and the remaining subunits maintained the open conformation of the active site, as in the apo form. Based on this structure, a catalysis mechanism describing the sequence of events in the active site was proposed [2], which would consist of closing the active site with the participation of Arg24. In this conformation of the active site Asp204 residue, in cooperation with Arg217, can protonate nucleoside substrate. This changes the distribution of charge on the purine ring, leads to the destabilization and breakage of the glycosidic bond.

The aim of the doctoral thesis was to verify the proposed mechanism of catalysis by investigating active site mutants, and to explain the mechanism and significance of cooperation between hexameric protein subunits.

First indication, that cooperation does not only takes place within a dimer, but also between them, were phosphate binding curves, for which a two binding sites model was not sufficient to describe the curves properly, and three binding sites model had to be applied. Three binding site model for phosphate binding was confirmed with several experimental methods. The proposed model assumes that binding of first phosphate ion leads to formation of three kinds of binding sites, one in closed conformation and two in open conformation, but characterised with different affinity to ligands. Thus, three binding constant describing binding of nucleoside should not be surprising. Existence of three kinds of binding sites was observed also in crystal structures.

Through destabilisation of contacts between dimers in hexameric ecPNP, free dimers were created, but they turned out to be not stable enough to catalyse effectively. Mechanism proposed in 2002 was confirmed by kinetic studies of active site mutants, Asp204Ala, Arg217Ala and Arg24Ala, towards natural and mimicking protonated state substrates. It was shown that conformational change and protonation of nucleoside are necessary steps of catalysis. On the basis of the conducted research, a mechanism of catalysis was proposed, taking into account the cooperation between the protein subunits in the dimer. Under conditions of substrate saturation, open and closed subunits in dimers catalyse in close cooperation. When a phosphorolysis reaction takes place in the closed subunit, the open subunit has just finished it, the products are released and the next pair of substrates are bound, the subunit is closed and the cycle begins again. This mechanism is known in the literature as flip-flop.

In addition to the existence of three types of active sites, several other unexpected phenomena were observed during protein studies, that could not be explained within the framework of the paradigm that the enzyme is either active or inactive. The decrease in the activity of protein stored at -80°C has a clearly two-phase nature. The optimisation of the protein concentration as a parameter of the binding model fit to the titration curve repeatedly returned non-physically low values. In the analysis of calorimetric titrations, where fraction of inactive protein, meaning a protein fraction incapable of binding ligand, can be an adjustable parameter, optimisation of this parameter as a fit parameter always returned the binding protein concentration higher than the concentration of catalytically active protein, determined from specific activity measurements vs. natural substrate. All these observations suggested the need to investigate the process of protein deactivation. Such research were performed and at least two intermediate states were detected between the fully active and completely inactive protein, unable to catalyse and to bind ligands.

In the first identified transition state, one of the three dimers becomes catalytically inactive towards natural substrates, while it is still able to bind ligands and carry out phosphorolysis of substrates imitating the protonated state. The other two dimers are catalytically functional and each of them contains a subunit whose active site adopts a closed conformation. This form of the protein is characterized by a reduced specific activity compared to an enzyme, in which one closed site can be present in each of three dimers. In the next transitional state, none of the active sites can adopt a closed conformation, therefore, the protein does not catalyse the phosphorolysis of natural substrates, but it still catalyses phosphorolysis of substrates mimicking protonated state.

A model that explains all observed facts was proposed. It was shown, that PNP from *E. coli* is indeed a hexamer, and not a trimer of independently functioning dimers, because without structural "support" provided by neighbouring subunits, the dimer is unable to catalyse effectively.

Marta Małgorzata Narczyk

[1] K.F. Jensen, P. Nygaard: *Purine Nucleoside Phosphorylase from Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Purification and some properties.* Eur. J. Biochem. 1975, 51: 253-265

[2] G. Koellner, A. Bzowska, B. Wielgus-Kutrowska, M. Luić, T. Steiner, W. Saenger, J. Stępiński: *Open and closed conformation of the E. coli purine nucleoside phosphorylase active center and implications for the catalytic mechanism.* J. Mol. Biol. 2002, 315: 351-371