

Niskocząsteczkowe fosfatazy tyrozynowe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* – heterologiczna nadprodukcja, oczyszczanie i ocena aktywności *in vitro*

Kamila Rusek^{1,2*}, Aleksandra Drabik¹, Martyna Moryl¹, Małgorzata Marczak¹

¹ Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

² Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

* kamila.rusek@mail.umcs.pl



UMCS 80 LAT UMCS

VIII Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK” 2024

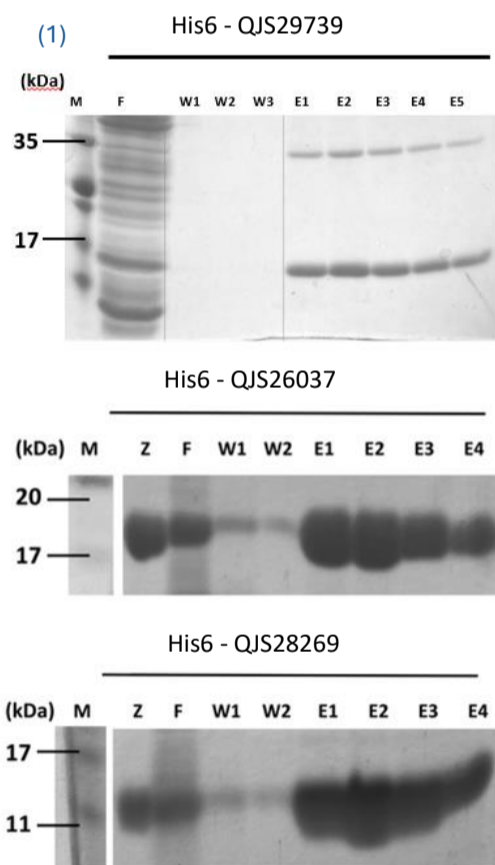
Wprowadzenie

Wiele procesów komórkowych, od kontroli ekspresji genów po aktywność enzymów w szlakach metabolicznych, jest regulowanych przez modyfikacje potranslacyjne białek (PTM), z których najważniejszą i najlepiej poznaną jest **fosforylacja**. Ta kluczowa modyfikacja reguluje odpowiedź na stres, podziały komórkowe, metabolizm DNA oraz biosyntezę polisacharydów otoczkowych i egzopolisacharydów. Fosforylacja tyrozyny to dynamiczny proces, w którym uczestniczą **bakteryjne kinazy tyrozynowe (BYK)** i **białkowe fosfatazy tyrozynowe (PTP)**. W proteobakteriach fosfatazy tyrozynowe należą głównie do rodziny fosfataz o **niskiej masie cząsteczkowej (LMW-PTP)**, o masie około 18 kDa. W genomie *RtTA1* zidentyfikowano geny kodujące trzy hipotetyczne LMW-PTP oraz jedną nietypową dla proteobakterii fosfatazę tyrozynową PTP.

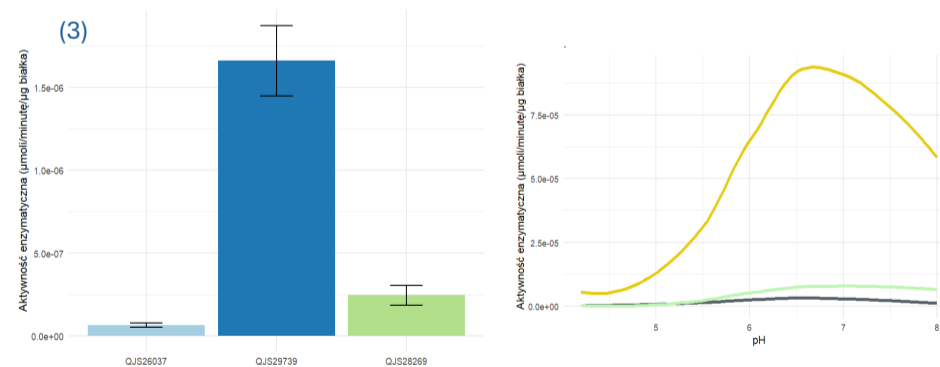
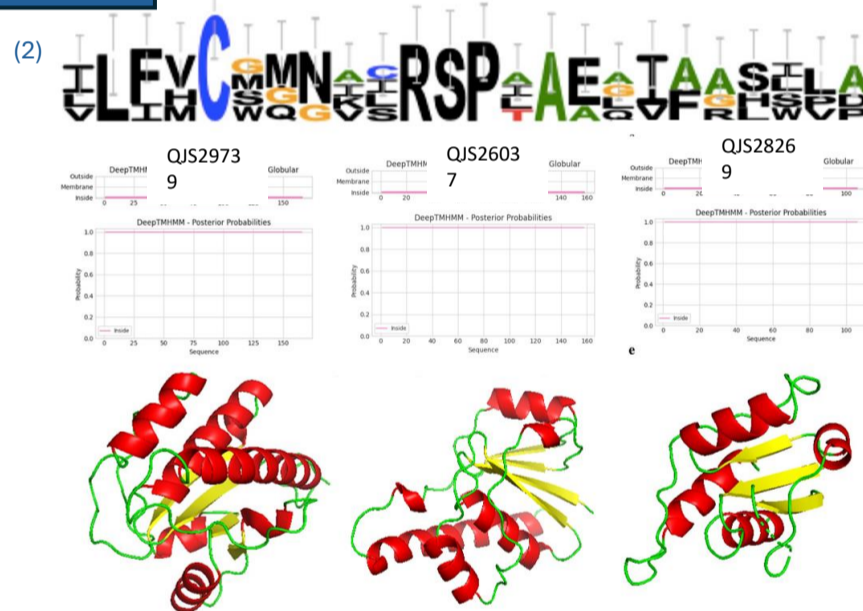
Metody

W celu zbadania aktywności fosfatazowej *in vitro* skonstruowano pochodne wektora ekspresyjnego pQE30 niosące geny hipotetycznych niskocząsteczkowych fosfataz. Otrzymane białka oczyszczono przez chromatografię powinowactwa, a następnie inkubowano z fosforanem 4-nitrofenylu (pNPP). Podobne eksperymenty przeprowadzono z dodatkiem jonów metali w celu identyfikacji potencjalnych inhibitorów/aktywatorów oraz w zakresie pH 4-8, aby określić optimum działania białek.

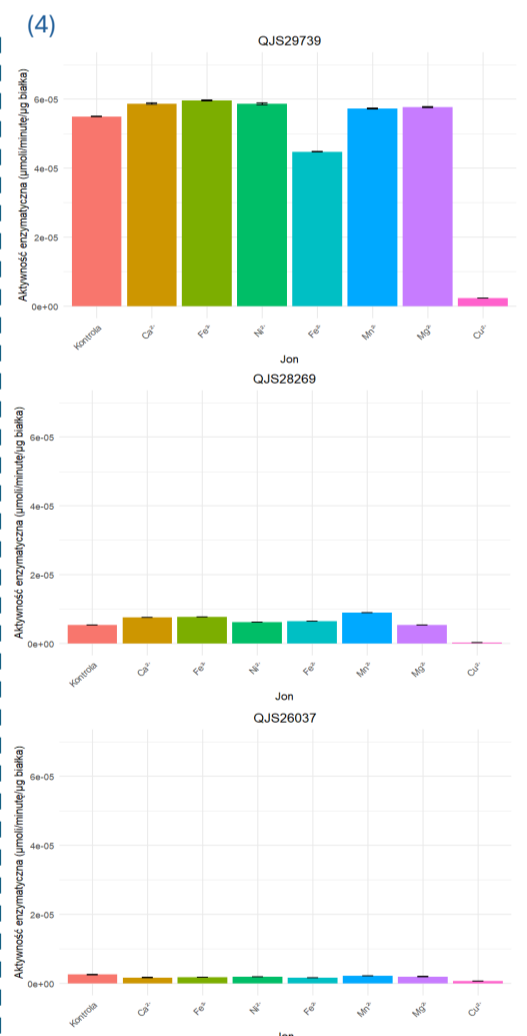
Wyniki



Wszystkie rekombinowane białka zostały oczyszczone na złożu Ni-NTA (1). W przypadku oczyszczania białka His6-QJS29739 obserwowano na żelu SDS-PAGE dwa prążki o masach ok. 17 i 35 kDa. Analiza LC-MS potwierdziła, że obydwa reprezentują to samo białko, co wskazuje na dimeryzację fosfatazy.



Białko QJS29739 wykazuje *in vitro* znaczącą aktywność fosfatazy wobec fosforanu 4-nitrofenylu, przewyższającą niemal sześciokrotnie aktywność białka QJS28269 (3). W przypadku białka QJS26037 zaobserwowano jedynie śladową aktywność. Ustalono optymalną wartość pH dla aktywności enzymatycznej badanych białek na poziomie 6,5.



Badanie wpływu jonów metali na aktywność enzymatyczną fosfataz wykazało **inhibycyjny efekt jonów Cu²⁺**. Żaden z badanych jonów **nie wykazywał działania aktywującego** na białko QJS26037 (4).

Wnioski

- Wszystkie trzy rekombinowane białka, QJS26037, QJS29739 i QJS28269, zostały skutecznie oczyszczone przy użyciu złoża Ni-NTA. Biosynteza białka QJS29739 w heterologicznym układzie w *E. coli* jest znacznie mniej wydajna, co może być związane z zaobserwowanym słabszym wzrostem po dodaniu induktora do hodowli, a jednocześnie negatywnym wpływem białka na metabolizm gospodarza. LMW-PTP QJS29739 może wykazywać niższą specyficzność w doborze substratów, co prowadzi do losowej defosforylacji białek. Natomiast białka QJS26037 i QJS28269 działają bardziej wybiórczo, co zostało potwierdzone w testach *in vitro* z fosforanem 4-nitrofenylu lub ich nadprodukowane formy nie są aktywne.
- Badanie wpływu jonów metali na aktywność enzymatyczną wykazało, że jony Cu²⁺ działają **inhibycyjnie na badane fosfatazy**. Inhibycyjny efekt jonów Cu²⁺ może wynikać z ich zdolności do wiązania się z grupami funkcyjnymi w białkach, co prowadzi do zmian konformacyjnych i utraty aktywności enzymatycznej. Żaden z badanych jonów metali, w tym Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ i Ca²⁺, **nie wykazywał działania aktywującego** na białko QJS26037.
- Otrzymane rekombinowane białka posłużą do dalszych testów, w tym do określenia, czy ich celami komórkowymi są wybrane autokinazy tyrozynowe zaangażowane w proces biosyntezy egzopolisacharydów.