

Lost and found: niskocząsteczkowe białkowe fosfatazy tyrozynowe a regulacja aktywności kopolimerazy egzopolisacharydu w rizobiach

Kamila Rusek^{1,2*}, 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



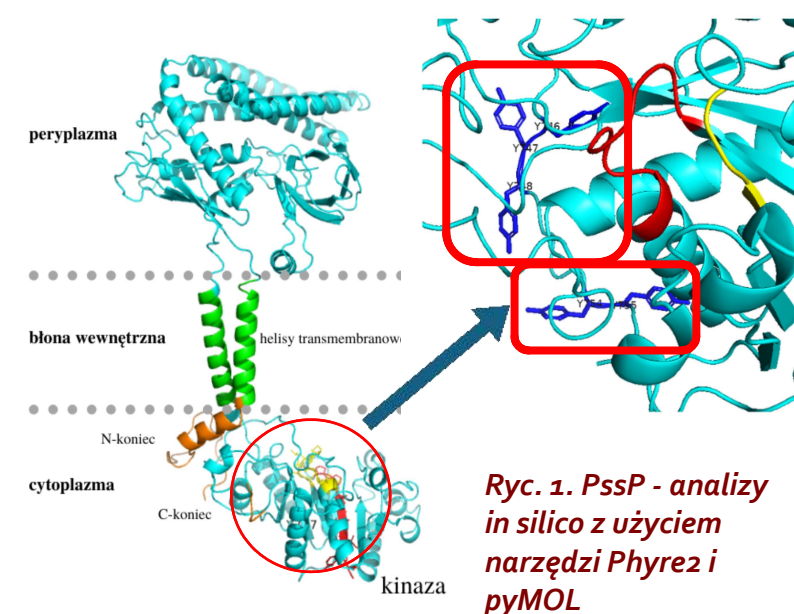
Wprowadzenie

- Rizobia to bakterie glebowe zdolne do symbiozy z roślinami bobowatymi - w brodawkach korzeniowych gospodarza redukują azot atmosferyczny do amoniaku.
- Przejście do formy symbiotycznej wymaga współdziałania wielu czynników, w tym zewnątrzkomórkowych egzopolisacharydów (EPS).
- Biosynteza EPS zachodzi z udziałem białka o aktywności **autokinazy tyrozynowej**, które m.in. **kontroluje długość** powstających łańcuchów polisacharydowych.

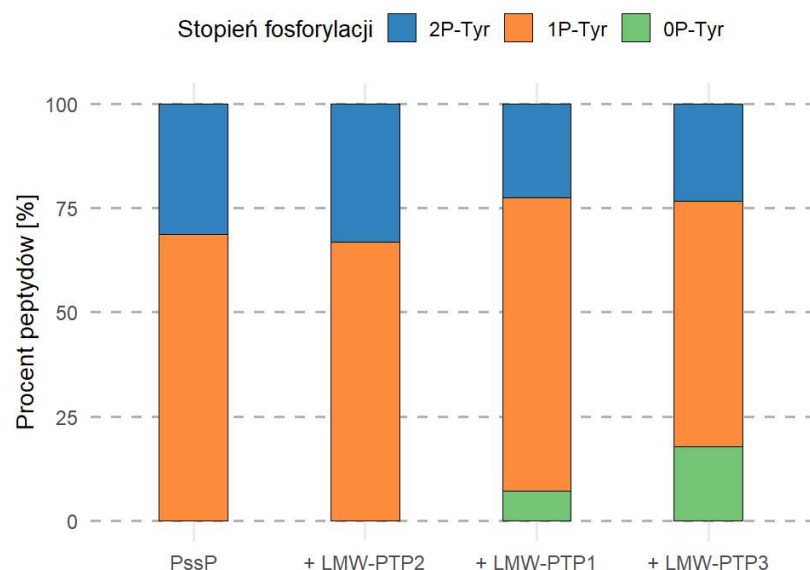
- Odwracalna fosforylacja reszt tyrozynowych zachodzi dzięki współdziałaniu **bakteryjnych kinaz tyrozynowych (BYK)** i **białkowych fosfataz tyrozynowych (PTP)**.
- U Proteobakterii fosfatazy te należą głównie do rodziny niskocząsteczkowych LMW-PTP, o masie około 18 kDa.
- Dotychczas **nie opisano LMW-PTP odpowiedzialnej za defosforylację kopolimerazy polisacharydu**, co sugerowało inny niż oparty na cyklicznej fosforylacji-defosforylacji mechanizm regulacji aktywności tego białka.

Cel badań

Celem pracy było **zweryfikowanie aktywności trzech białkowych fosfataz tyrozynowych (LMW-PTP) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (QJS26037, QJS29739 i QJS28269) wobec autokinazy PssP** – kluczowego regulatora biosyntezy egzopolisacharydu (EPS).



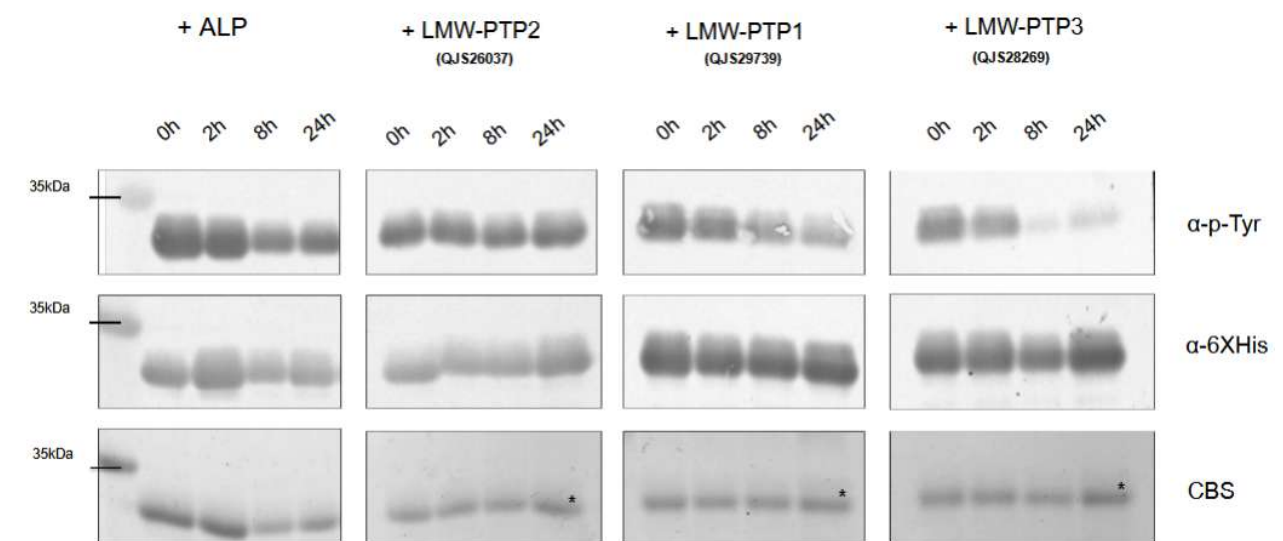
Ryc. 1. PssP - analizy in silico z użyciem narzędzi Phyre2 i pyMOL



Ryc. 3. Procentowy udział peptydów z odpowiednim profilem fosforylacji Tyr (0, 1, 2 miejsca fosforylacji w peptydzie) zidentyfikowanych metodą LC-MS, uzyskanych po trawieniu elektroforetycznego prążka SDS-PAGE, po 24-godzinnej inkubacji z odpowiednią fosfatazą (oznaczenia * na Ryc. 2).

Wyniki

Rekombinowany wariant białka PssP obejmujący cytoplazmatyczną kinazę (**Ryc. 1**) inkubowano *in vitro* z każdą fosfatazą. Produkty analizowano metodą Western blot z przeciwciałami anti-P-Tyr i anti-His (**Ryc. 2**), a miejsca fosforylacji identyfikowano metodą LC-MS peptydów uzyskanych z prążków po elektroforezie (**Ryc. 3**).



Ryc. 2. Analiza aktywności fosfatazowej rekombinowanych LMW-PTP względem autokinazy PssP. Oczyszczone fosfatazy z etykietą His6 dializowano do 100 mM buforu cytrynianowego, pH 6,5. W reakcji 200 µl inkubowano 20 µg domeny autokinazowej PssP (C-koniec, 32 kDa) z 20 µg testowanej fosfatazy.

Prowadzono również kontrolę bez PssP oraz z ALP (50 mM Tris pH 8,8, 1 mM MgCl₂). Inkubacja w 30 °C trwała 0, 2, 6 i 24 h - reakcję zatrzymywano 2× buforem Laemmli - próbki denaturowano 10 min/100 °C. Białka rozdzielano w 12 % SDS-PAGE (×3); jeden żel barwiono Coomassie, pozostałe analizowano przez immunobloting z przeciwciałami anti-P-Tyr i anti-His.

Wyniki defosforylacji PssP:

- LMW-PTP3 (**QJS28269**) usuwała reszty fosforanowe z Tyr najskuteczniej,
- LMW-PTP1 (**QJS29739**) wykazywała umiarkowaną aktywność,
- LMW-PTP2 (**QJS26037**) nie powodowała wykrywalnej defosforylacji reszt Tyr (**Ryc. 2-3**).

- Obecność fosfataz LMW-PTP (1-3) w różnym stopniu **wpływała** na obniżenie poziomu sygnału dla fosfotyrozyny w PssP.
- Wyniki analizy metodą LC-MS potwierdzają obserwacje uzyskane z zastosowaniem przeciwciał anti-P-Tyr.
- W próbach kontrolnych oraz po inkubacji z **LMW-PTP2** **nie wykryto** peptydów pozbawionych fosfotyrozyn w bogatym w te reszty fragmencie kinazy.
- W przypadku inkubacji z **LMW-PTP1** oraz **LMW-PTP3** zidentyfikowano odpowiednio 7,09% oraz 17,72% peptydów w formie nieufosforylowanej (**Ryc. 3**).

Wnioski

- LMW-PTP3** najskuteczniej usuwa reszty fosforanowe z domeny cytoplazmatycznej PssP, choć w teście z pNPP wykazywało umiarkowaną aktywność.
- LMW-PTP1** mniej skutecznie defosforyluje PssP, choć w teście z pNPP wykazywało największą aktywność.
- Obydwie fosfatazy mogą być zaangażowane w regulację aktywności PssP w szlaku biosyntezy egzopolisacharydu >>> **wątpliwości może rozwiązać mutageneza, w której wyłączone zostaną jednocześnie obydwa geny.**