

Regulacja aktywności proteolitycznej białka HtrA bakterii *Escherichia coli*: rola statusu redoks enzymu oraz projektowanie modulatorów allosterycznych

Tomasz Koper

Proteaza HtrA bakterii *Escherichia coli* jest kluczowym elementem pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek. Jej prawidłowe funkcjonowanie jest niezbędne do przetrwania komórek bakteryjnych w warunkach stresowych, a w przypadku szczepów patogennych często warunkuje ich wirulencję. W niskich temperaturach i przy braku odpowiednich substratów HtrA występuje w formie spoczynkowej o bardzo niskiej aktywności. Białko to tworzy wtedy struktury heksametryczne, w których centra aktywne znajdują się w niewłaściwej dla katalizy konformacji. Nieaktywna struktura jest stabilizowana między innymi poprzez oddziaływania z udziałem regulacyjnej pętli LA. W obrębie tego elementu znajduje się mostek disiarczkowy, łączący reszty Cys57 i Cys69. W układzie *in vivo* wykazano, że redukcja wiązania S-S stymuluje HtrA do bardzo wydajnej degradacji naturalnego substratu, alkalicznej fosfatazy. Jednakże mechanizm redukcyjnej aktywacji HtrA nie został wyjaśniony. W związku z tym jednym z zadań postawionych w ramach niniejszej pracy było zbadanie, jaki wpływ ma stan oksydoredukcyjny reszt cystein na parametry kinetyczne proteolizy i strukturę białka HtrA. Do badań wykorzystano zarówno białko HtrA zredukowane, jak i pozbawione mostka disiarczkowego na drodze mutagenyzy miejscowo-specyficznej (HtrA Δ Cys). Kontrolę stanowiło utlenione białko HtrA zawierające reszty Cys57 i Cys69. Stosując modelowy substrat, zawierający pojedyncze miejsce cięcia, przeprowadzono analizę parametrów kinetyki hydrolizy wiązania peptydowego. Zaobserwowano, iż HtrA Δ Cys wydajniej degradowało peptydowy substrat, a wartości V_{\max} były ponad dwukrotnie wyższe niż w przypadku białka kontrolnego. Ponadto, metodą plazmonowego rezonansu powierzchniowego pokazano, iż białko bez mostka S-S wiązało białkowy substrat z wyższym powinowactwem niż utlenione HtrA. Przeprowadzona analiza strukturalna metodami spektroskopowymi oraz chromatograficznymi sprzężonymi z sieciowaniem wykazały, iż HtrA pozbawione mostka disiarczkowego charakteryzuje się niższą stabilnością termiczną struktur drugorzędowych oraz mniejszą stabilnością heksametrów niż HtrA kontrolne. W obecności peptydowego substratu cząsteczki HtrA Δ Cys łatwiej ulegały rearanżacji do oligomerów wyższego rzędu, typowych dla aktywnej formy HtrA. Uzyskane wyniki świadczą, że zerwanie mostka S-S wywołuje stymulację aktywności

proteolitycznej, najprawdopodobniej poprzez zwiększenie powinowactwa HtrA do substratu i ułatwienie enzymowi konwersji do formy aktywnej katalitycznie.

W obecnej pracy pokazano także, że redukcja HtrA może być katalizowana na drodze enzymatycznej przez ludzką tioredoksynę 1. Ze względu na fakt, iż niektóre enteropatogenne szczepy, włączając *E. coli* (EPEC), mogą wydzielać pewną frakcję HtrA poza komórkę, enzymatyczna redukcja może mieć znaczenie fizjologiczne dla bakterii i stanowić dodatkowy sposób stymulacji HtrA podczas patogenezы.

Aktywność proteolityczna HtrA podlega regulacji na zasadzie indukcji termicznej lub allosterycznej. W tym drugim przypadku aktywatorem allosterycznym jest cząsteczka substratu o odpowiedniej sekwencji, wiążąca się równocześnie w rejonie centrum aktywnego i w domenie PDZ enzymu. Ponieważ HtrA jest czynnikiem warunkującym patogenezę wielu znanych szczepów chorobotwórczych bakterii, zostało uznane za obiecujący cel terapeutyczny do projektowania leków przeciwbakteryjnych. Istotną byłaby w tym przypadku możliwość kontrolowanego modulowania aktywności tej proteazy. Z tego względu w ramach niniejszej pracy podjęto próbę opracowania optymalnej sekwencji modulatora allosterycznego o wyższej specyficzności i powinowactwie względem HtrA niż dotychczas scharakteryzowane peptydowe substraty. W tym celu przeprowadzono szczegółową analizę oddziaływań, które teoretycznie mogą zachodzić pomiędzy cząsteczką substratu a HtrA, zarówno w obrębie centrum aktywnego, jak i w domenie PDZ1. Przeprowadzono serie eksperymentów *in silico* polegających na symulowanym dokowaniu krótkich peptydów do miejsc wiążących w HtrA. Biorąc pod uwagę teoretyczne wartości energii wiązania oraz zaproponowano następujące sekwencje peptydów: KLEPI-D-allo-Thr-FK i RFEL, specyficzne odpowiednio względem centrum aktywnego i domeny PDZ1. Uzyskane teoretycznie optymalne peptydy mogą stać się podstawą do opracowania specyficznych modulatorów aktywności HtrA, a w dalszej perspektywie wydajnych inhibitorów HtrA, mogących potencjalnie służyć jako leki wspomagające antybiotykoterapię.