

„Wewnątrzkomórkowe funkcje białka HtrA u bakterii *Helicobacter pylori*” mgr Małgorzata Bielecka

Utrzymanie homeostazy białek jest kluczowe dla funkcjonowania organizmu. Bakterie wykształciły zaawansowane systemy kontroli jakości białek (SKJB), które obejmują białka opiekuńcze, katalizatory zwijania białek i proteazy degradujące nieodwracalnie uszkodzone białka. Główną proteazą peryplazmatyczną u bakterii Gram-ujemnych jest HtrA (ang. *high temperature requirement A protein*). Funkcje tego białka zostały najlepiej poznane u Enterobacteriaceae, w szczególności u modelowej bakterii *Escherichia coli*. Natomiast rola homologu HtrA w komórce bakterii *Helicobacter pylori* (HtrA_{Hp}) nie była do tej pory przedmiotem szczegółowych badań, a zainteresowania badaczy skupiały się przede wszystkim na działaniu pozakomórkowej frakcji HtrA_{Hp} jako isotnego czynnika wirulencji tego patogenu człowieka. Wewnątrzkomórkowa rola HtrA_{Hp} u *H. pylori* wydaje się być wyjątkowo istotna, gdyż do tej pory udało się wprowadzić mutacje *htrA_{Hp}* tylko do jednego szczepu tego gatunku bakterii.

Nadrzędnym celem pracy było określenie funkcji białka HtrA_{Hp} w komórce *H. pylori*. Cele szczegółowe obejmowały identyfikację białek będących substratami i/lub partnerami HtrA_{Hp} w komórce bakteryjnej *H. pylori* oraz zbadanie wpływu braku HtrA_{Hp} na proteom komórek bakteryjnych.

W pierwszym etapie badań, wykorzystując przyżyciowe sieciowanie białek połączone z technikami „pull down” i spektrometrii mas, zidentyfikowano białka *H. pylori* zdolne do wiązania się z HtrA_{Hp}. Wśród nich znaczną frakcję stanowiły białka błony zewnętrznej (OMP), białka biorące udział w odpowiedzi na stres i elementy systemu kontroli jakości białek, białka zaangażowane w transport jonów metali, białka odpowiedzialne za chemotaksję i ruchliwość. Ponadto wykryto białka biorące udział w różnorodnych cytoplazmatycznych procesach metabolizmu podstawowego. Wydaje się, że ta ostatnia grupa stanowi białka związane z HtrA_{Hp} niespecyficznie.

W kolejnym kroku podjęto próbę weryfikacji potencjalnych interakcji HtrA_{Hp} z wybranymi białkami. Do badań wytypowano przypuszczalne elementy peryplazmatycznego systemu kontroli jakości białek, katalizator zwijania HP_0175 (białko SurA podobne), oraz proteazy HP_0657 (YmxG), HP_1012 (PqqE) i HP_1350. Immunoblotting frakcji elucyjnych po eksperymencie „pull down” z użyciem

przeciwciał anty-HP_0657, anty-HP_1012, anty-HP_1350 częściowo potwierdził interakcje między badanymi białkami.

W celu weryfikacji oddziaływań HtrA_{Hp} z wytypowanymi białkami, przeprowadzono doświadczenia w układzie *in vitro* z wykorzystaniem oczyszczonych preparatów białek HP_0175, HP_0657, HP_1012, HP_1350. Wyniki sączenia molekularnego nie pozwoliły na jednoznaczne wykazanie obecności kompleksów HtrA_{Hp}-badane białko, natomiast zmiana profili elucyjnych HtrA_{Hp} sugerowała występowanie przynajmniej przejściowych oddziaływań.

Analiza poziomu białek HP_0657, HP_1012, HP_1350 w bakteriach *H. pylori htrA* ($\Delta htrA$, *htrA* S221A) wykazała, że frakcja wzbogacona w błony szczepu pozbawionego HtrA_{Hp} zawiera podwyższony poziom białek HP_0657 i HP_1012. Ponieważ żadna z tych proteaz nie była trawiona przez HtrA_{Hp} *in vitro*, można przypuszczać, że nagromadzenie się PqqE i YmxG nie wynika z braku degradacji przez HtrA_{Hp}, lecz z konieczności zastąpienia funkcji HtrA_{Hp} i wiązania białek o nieprawidłowej strukturze.

Poszukując substratów dla aktywności proteolitycznej HtrA_{Hp}, wykryto, iż HtrA_{Hp} jest zdolne do degradacji ważnego czynnika wirulencji *H. pylori*, toksyny CagA. Innym potencjalnym substratem proteazy HtrA_{Hp} może być FrpB, białko związane z transportem jonów żelaza, a także innych białek błony zewnętrznej, Omp9 i Omp19, które także współoczystaczały się z HtrA_{Hp} w doświadczeniach „pull down”. Możliwość degradacji CagA i białek błonowych przez HtrA_{Hp} wymaga jednak dalszej weryfikacji.

Dla lepszego zrozumienia mechanizmów, w których bierze udział białko HtrA_{Hp}, przeprowadzono ilościowe analizy proteomiczne SWATH-MS z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Zbadano zmiany poziomu białek w lizatach oraz frakcjach wzbogaconych w błony uzyskanych ze szczepu pozbawionego genu *htrA_{Hp}* (*H. pylori* N6 $\Delta htrA$) względem proteomu szczepu komplementacyjnego (*H. pylori* N6 $\Delta htrA/htrA$). Wśród białek o znacząco zmienionej zawartości w szczepie $\Delta htrA_{Hp}$ znajdowały się białka błony zewnętrznej (OMP), białka biorące udział w odpowiedzi na stres i elementy systemu kontroli jakości białek, białka biorące udział w transporcie jonów metali, białka odpowiedzialne za chemotaksję i ruchliwość, białka biorące udział w metabolizmie i transporcie aminokwasów, nukleotydów, węglowodanów, lipidów i metabolizmie podstawowym. Wynik ten

świadczy o plejotropowym efekcie mutacji $\Delta htrA_{Hp}$, który może być związany z zaburzeniami w biogenezie błony zewnętrznej. Zmienione własności błony zewnętrznej w szczepie pozbawionym $htrA_{Hp}$, sugerujące obniżoną integralność tej struktury, potwierdził test wrażliwości na jonowy detergent SDS - komórki $\Delta htrA_{Hp}$ wykazywały większą podatność na lizę w obecności detergentu. Ponadto bakterie $\Delta htrA_{Hp}$ charakteryzowały się obniżoną hydrofobowością powierzchniową.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że funkcje pełnione przez HtrA_{Hp} w komórce *H. pylori* są bardzo istotne dla zapewnienia homeostazy komórkowej, niezbędnej w procesie zakażenia organizmu gospodarza. HtrA_{Hp} najprawdopodobniej współdziała z innymi elementami pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek, w tym z proteazami YmxG, PqqE, HP_1350 i PPIazą HP_0175. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wskazują na istotną rolę HtrA_{Hp} w biogenezie błony zewnętrznej, utrzymaniu homeostazy jonów metali i zapewnieniu odpowiedniego poziomu niektórych czynników wirulencji.