

HtrA *E. coli* jest modelowym przedstawicielem rodziny proteaz HtrA. Bakteryjne białka HtrA pełnią w komórkach funkcje ochronne przed szkodliwym działaniem czynników stresowych i są ważnym aspektem wirulencji wielu szczepów patogennych. Z tego względu uważane są za potencjalny cel w terapiach przeciwdrobnoustrojowych. Jednakże opracowanie specyficznych cząsteczek inhibitorowych o działaniu terapeutycznym wymaga dokładnego poznania struktury i mechanizmu funkcjonowania docelowego czynnika wirulencji.

Struktura białka HtrA została opisana relatywnie dobrze i zostały rozwiązane struktury krystaliczne tego białka. Jednakże jest to enzym o bardzo skomplikowanym mechanizmie regulacji aktywności, ciągle nie w pełni poznany. Aktywacja HtrA może zachodzić na drodze allosterycznej i/lub termicznej. W warunkach fizjologicznych HtrA tworzy proteolitycznie nieaktywny heksamer. Uważa się, że istotną rolę w utrzymywaniu tej nieaktywnej struktury pełnią regulatorowe pętle LA. Aktywacja proteazy zachodzi po związaniu cząsteczek substratów. Dochodzi wtedy do przekazania sygnału allosterycznego, prowadzącego do reorganizacji struktury całej cząsteczki enzymu i w konsekwencji do uzyskania struktury aktywnej katalitycznie. W proces ten są zaangażowane pętle regulatorowe L1, L2, L3 i LD. Ze względu na dużą ruchliwość pętli LA, jej fragment obejmujący reszty 55-79 nie został uwidoczniiony w strukturze krystalicznej HtrA, stąd nie znane są konkretne oddziaływania w które zaangażowana jest pętla LA. Nie wiadomo również, które elementy pętli LD odpowiedzialne są za przekazanie sygnału allosterycznego.

Celem tej pracy było poznanie mechanizmu działania dwóch pętli regulatorowych o przeciwstawnych rolach: inhibitorowej pętli LA oraz aktywatorowej pętli LD. W tym celu, stosując technikę mutagenyzy miejscowo-specyficznej, dokonano substytucji reszt aminokwasowych, potencjalnie istotnych dla stabilizacji formy nieaktywnej (LA) bądź aktywnej proteolitycznie (LD). Analizowano wyłącznie te warianty HtrA, w których wprowadzone mutacje nie spowodowały zmian w strukturze II-rzędowej białka, określanej przy wykorzystaniu techniki dichroizmu kołowego w dalekim UV.

Ze względu na brak informacji o strukturze pętli LA, w kooperacji z dr. A. Giędoniem z Wydziału Chemii UG opracowano teoretyczny model struktury pętli LA (htrA_unress, suplement w Figaj i wsp., 2014). Moja rola polegała na (1) dostarczaniu danych eksperymentalnych, obejmujących wyniki aktywności proteolitycznej mutein HtrA, służących do udoskonalania tego modelu oraz (2) ostatecznej weryfikacji poprawności modelu metodą sieciowania Cys–Cys. W trakcie pracy nad modelem zidentyfikowano oddziaływania kluczowe dla stabilizacji nieaktywnej struktury HtrA. Wykazano, że pętla LA w heksamerze oddziałują ze sobą poprzez reszty o charakterze hydrofobowym. Szczególnie istotną rolę przypisano

resztom F46, F49, F50, F63, F68, które razem z P62 i P67 tworzą tzw. „klaster” hydrofobowy zlokalizowany w centralnej części heksamery. Scharakteryzowano także sieć wiązań wodorowych tworzoną z udziałem reszt aminokwasowych pętli LA, L1 i L2. Wskazano oddziaływania inhibitorowe pętli LA (reszty Q47 i F68) z pozostałymi pętlami regulatorowymi. Ponadto przy zastosowaniu metody gaszenia fluorescencji reszt tryptofanu i sączenia molekularnego wykazano istotną rolę N-końcowego fragmentu pętli LA (rejon reszty 44) w zachowaniu sztywności pętli. Lokalne zwiększenie ruchliwości pętli LA prowadziło do destabilizacji heksamery, ułatwiało tworzenie struktur oligomerycznych wyższego rzędu, ale także prowadziło do autodegradacji białka.

W kolejnej części pracy scharakteryzowano rolę pętli LD w procesie aktywacji HtrA. Wykazano, że zachowanie struktury i sztywności pętli jest kluczowe dla aktywności proteolitycznej. Pokazano także, że reszty F171 i L173 są odpowiedzialne za oddziaływania z pętlą L2 przeciwległej podjednostki. Ponadto pętla LD jest częścią tzw. „klastra” aktywacyjnego – sieci wiązań wodorowych stabilizujących aktywną formę białka. Zaobserwowano, że wzmocnienie tej sieci oddziaływań prowadzi do hiperaktywności HtrA, przesunięcia równowagi allosterycznej w stronę aktywnej formy enzymu niezależnie od obecności substratu. Obecność HtrA o podwyższonej, niekontrolowanej aktywności proteolitycznej wpływała negatywnie na przeżywalność bakterii w fizjologicznej temperaturze 37°C.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy przyczyniły się do pełniejszego zrozumienia roli pętli LA i LD w procesie aktywacji proteolitycznej oraz stały się podstawą do opracowania teoretycznego modelu struktury pętli LA.