

**"Charakterystyka homologów HtrA bakteryjnych patogenów człowieka,
Helicobacter pylori i *Stenotrophomonas maltophilia*"
mgr Urszula Zarzecka**

Białka HtrA (High Temperature Requirement A) są to zachowane w ewolucji proteazy serynowe należące do subklanu proteaz PA(S) i stanowiące część rodziny S1 (podrodziny S1C), zgodne z danymi z bazy MEROPS. Niektóre HtrA wykazują dodatkowo aktywność opiekuńczą. Homologi białka HtrA zidentyfikowano zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych, w tym u człowieka. Modelowy organizm, *Escherichia coli*, posiada trzy homologi HtrA: HtrA_{Ec} (DegP), DegQ_{Ec} (HhoA) i DegS_{Ec} (HhoB). U wielu gatunków bakterii znaleziono tylko jeden homolog białka HtrA, np. *H. pylori*. W komórce bakteryjnej HtrA jest związane z osłonami komórkowymi i tam bierze udział w kontroli jakości białek, głównie przez usunięcie nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów. Ta funkcja jest niezwykle istotna w warunkach stresowych, takich jak stres termiczny, oksydacyjny i osmotyczny, które wpływają na fałdowanie białek i mogą prowadzić do ich denaturacji. Białka HtrA biorą udział w dojrzewaniu i zwijaniu niektórych białek zewnątrzkomórkowych. Znane substraty dla białka HtrA obejmują powierzchniowe białka OspA i B, RseA, białko aktywujące neutrofile (NapA), białko wiciowe związane z ciałem podstawowym (FliL) i inne [1].

Ostatnio opublikowane badania wskazują, że u niektórych gatunków bakterii HtrA może być transportowane na zewnątrz komórki, gdzie może pełnić istotną rolę w patogenezie zakażeń bakteryjnych poprzez ułatwienie rozprzestrzeniania się bakterii. Kluczowym etapem w procesie wirulencji jest destrukcja połączeń międzykomórkowych i/lub uszkodzenie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Niektóre HtrA są zdolne do degradacji białek połączeń adherentnych (E-kadheryna) i ścisłych (klaudyna-8 i okludyna), jak również białek ECM (fibronektyna i agrekan) [1,3].

HtrA są białkami homooligomerycznymi, których funkcjonalną jednostką budulcową jest trimer. Trimery mogą budować wyższe formy oligomeryczne, a w przypadku niektórych homologów HtrA w roztworze mogą znajdować się różne formy oligomerów. Przejścia pomiędzy formami oligomerycznymi są często zależne od obecności substratu i związane ze zmianą aktywności enzymu, przez co uważane są za formę regulacji aktywności. Typowy monomer HtrA składa się z domeny proteazowej typu chymotrypsyny i co najmniej jednej domeny PDZ (ang. Postsynaptic density of 95 kDa- PSD-95, discs large- DLG1, and zonula

occludens- ZO1) na końcu C. Część N-końcowa jest najmniej zachowana w ewolucji i może pełnić różnorodne funkcje [1,3].

Wiadomo, że białko HtrA wykazuje aktywność proteolityczną i często dodatkową, niezależną aktywność opiekuńczą, która może być zaangażowana w utrzymaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek w formie rozpuszczalnej i w konsekwencji zapobiega ich agregacji. W niektórych przypadkach aktywność opiekuńcza jest niezbędna do prawidłowego składania i eksportowania różnych czynników wirulencji. Aktywność proteolityczna jest kluczowa w wirulencji wielu patogennych bakterii, np. *Escherichia coli* (EHEC, UPEC), *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia sp.* i *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium; w wielu przypadkach brak *htrA* powoduje utratę zdolności bakterii do infekowania.

HtrA *E. coli* wymaga aktywacji, aby strawić substrat. W formie spoczynkowej, układ reszt aminokwasowych budujących centrum aktywne tej proteazy uniemożliwia katalizę reakcji hydrolizy wiązania peptydowego. W związku z tym do aktywacji niezbędne jest wystąpienie zmian konformacyjnych w cząsteczce HtrA. Proces ten jest regulowany przede wszystkim allosterycznie przez wiązanie substratów lub peptydów do domeny proteolitycznej i domeny PDZ1, czemu towarzyszą zmiany form oligomerycznych. W rezultacie, Heksamery (forma spoczynkowa) są przekształcane w cząsteczki zbudowane z 12 lub 24 podjednostek (formy aktywne). Po zakończeniu trawienia substratu, duże oligomery rozpadają się i białko wraca do formy nieaktywnej [1,3].

Ta rozprawa doktorska prezentuje wyniki badań nad homologami białka HtrA pochodzącymi z dwóch patogennych gatunków bakterii: *Helicobacter pylori* i *Stenotrophomonas maltophilia*. Biochemiczne właściwości tych białek zostały porównane do modelowego bakteryjnego HtrA z bakterii *Escherichia coli*. Bakterie *H. pylori*, *S. maltophilia* i *E. coli* są wykazują szereg podobieństw i wszystkie należą do bakterii Gram-ujemnych zdolnych do kolonizacji organizmu człowieka. Jednakże docelowa lokalizacja w ciele człowieka i ekologia każdego z tych gatunków jest inna. *H. pylori* jest wyspecjalizowanym patogenem człowieka, który zasiedla żołądek i dwunastnicę. Do tej pory żywe bakterie nie zostały wykryte w warunkach środowiska zewnętrznego. *S. maltophilia* najczęściej infekuje układ oddechowy, ale przede wszystkim jest bakterią środowiskową występującą w wodzie i glebie¹. *E. coli* występuje w układzie pokarmowym (lub moczowym w przypadku UPEC) i obejmuje gatunki komensalne i patogenne. Może przetrwać przez dłuższy czas w wodzie (ścieki), rzekach, jeziorach i pożywieniu.²

Do przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki biochemicznej białek HtrA niezbędne było uzyskanie znacznej ilości czystych preparatów białkowych. W tym celu zostało skonstruowanych kilka plazmidów na bazie wektora pET26b, zawierających odpowiedni wariant genu *htrA*. Uzyskiwane białka HtrA zawierały N-kończącą sekwencję sygnałową PelB (z bakterii *E. coli*), która jest odpowiedzialna za kierowanie białka do peryplazmy, jak również C-kończący znacznik His-Tag (ułatwiający oczyszczanie białka). Plazmidy pozwoliły na uzyskanie następujących homologów HtrA: trzy warianty HtrA *H. pylori*, pochodzące ze szczepów 26695, J99 i N6, i HtrA *S. maltophilia* ze szczepu K279a. HtrA *E. coli* uzyskano wykorzystując plazmid z kolekcji Katedry. Aby otrzymać nieaktywne warianty białek HtrA kodon seryny miejsca aktywnego *htrA* (S229 dla *S. maltophilia* i S221 dla *H. pylori*) został zamieniony na kodon alaniny (substytucja S/A) przy użyciu ukierunkowanej mutagenyzy. Białka HtrA zostały oczyszczone za pomocą chromatografii powinowactwa z zastosowaniem złoża niklowego w warunkach natywnych lub denaturujących. Druga metoda została użyta w celu uzyskania czystszej preparatu pozbawionego peptydów oczyszczanych razem z białkiem HtrA [2,3].

HtrA, jako element systemu kontroli jakości białek preferuje białka niesfałdowane jako substraty. Aby sprawdzić, czy HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm} wykazują podobną specyficzność substratową, zbadano aktywność proteolityczną tych białek względem β -kazeiny i dwóch form lizozymu: natywnej i chemicznie zdenaturowanej przez redukcję. β -kazeina jest białkiem o dużej zawartości rejonów nieuporządkowanych, które jest znane jako uniwersalny substrat dla proteaz, również dla HtrA. Lizozym zawiera cztery mostki disiarczkowe, które są niezbędne dla utrzymania natywnej konformacji. Redukcja cząsteczki lizozymu powoduje utratę właściwej struktury i aktywności tego białka. Białko HtrA_{Ec} zostało użyte jako kontrola. Wszystkie homologu HtrA wykazały aktywność proteolityczną względem β -kazeiny i zdenaturowanego lizozymu, a natywny lizozym nie podlegał degradacji. To oznacza, że HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm} są zdolne do degradacji nieprawidłowo sfaldowanych białek, a białka o prawidłowej konformacji pozostają niestrawione [2,3].

Następnie sprawdzono, przy jakich wartościach czynników fizycznych (pH roztworu, temperatura) homologu HtrA trawią najwydajniej β -kazeinę. HtrA_{Hp} wykazywał najwyższą aktywność w pH pomiędzy 5.5- 7.0 (maksimum pH 6.0- 6.5), HtrA_{Sm} działał najefektywniej w wąskim zakresie pH 6.0- 6.5, a HtrA_{Ec} w pH pomiędzy 5.5- 6.5 (maksimum pH 5.5). Następnie, określono zależność aktywności badanych proteaz od temperatury otoczenia. Okazało się w temperaturze 37 °C (temperatura ludzkiego ciała) tempo trawienia substratu

było porównywalne dla badanych HtrA. Natomiast w wyższych lub niższych temperaturach zostały zaobserwowane istotne różnice. Temperatury, w których badane HtrA wykazywały najwyższą aktywność to: 35-37 °C (HtrA_{Sm}), 70-75 °C (HtrA_{Hp}) lub 55 °C (HtrA_{Ec}). Efektywność trawienia substratu przez HtrA_{Sm} dramatycznie spadała powyżej temperatury 37°C, ale warto zaznaczyć, że w niższych temperaturach (25 °C) enzym ten wykazywał wyższą aktywność proteolityczną w porównaniu do HtrA_{Hp} and HtrA_{Ec} [2,3].

Wyjątkowo wysoka aktywność HtrA_{Hp} w podwyższonych temperaturach sugeruje dużą stabilność cząsteczki tego enzymu (w szerokim zakresie pH i temperatury). Z drugiej strony, zanik aktywności HtrA_{Sm} w temperaturach powyżej 37 °C wskazuje na niską stabilność termiczną cząsteczek tego białka. Aby zweryfikować te przypuszczenia, wyznaczyliśmy temperaturę topnienia (T_m) wszystkich badanych HtrA przy użyciu dichroizmu kołowego. W optymalnym pH (pH 6.5) T_m dla HtrA_{Hp} wynosiła 87,5 °C, pozostałe badane homologi HtrA utraciły drugorzędową strukturę w niższych temperaturach: HtrA_{Ec} (73,3 °C) i HtrA_{Sm} (57,91 °C). Wyniki z tego doświadczenia wyjaśniają dużą aktywność proteolityczną HtrA_{Hp} w wysokich temperaturach i niską maksymalną aktywność HtrA_{Sm} (maksimum w 37°C)[2,3].

Właściwości badanych homologów HtrA wydają się odzwierciedlać ich adaptacje do warunków spotykanych w siedliskach typowych dla tych bakterii. Preferowanie umiarkowanych temperatur w przypadku HtrA_{Sm} sugeruje, że funkcja tej proteazy jest ważna dla bakterii zasiedlających środowiska zewnętrzne (wodne i glebowe), jak również tych kolonizujących ludzkie ciało. Wysoka odporność na warunki denaturujące obserwowana dla HtrA_{Hp} koreluje z potrzebą działania zarówno w komórce bakteryjnej, jak i w skrajnie niekorzystnym środowisku żołądka (w przypadku frakcji wydzielanej na zewnątrz komórki).

Aby poszerzyć charakterystykę bakteryjnych HtrA, określono ich specyficzność względem miejsc trawienia substratu. Według dostępnej wiedzy HtrA_{Hp} preferencyjnie tnie naturalny substrat E- kadherynę w obrębie motywu [VITA] ↓ [VITA] -x-x-D- [DN] [3]. Specyficzność substratowa HtrA_{Sm} nie była wcześniej określana. W celu porównania specyficzności wszystkich badanych w tej pracy HtrA zastosowaliśmy β-kazeinę i zredukowany lizozym jako modelowe substraty. Uzyskane produkty cięcia zidentyfikowano stosując technikę spektrometrii mas (LC-MS). Ta metoda umożliwiła nam określenie preferencji enzymów w stosunku do aminokwasów sąsiadujących z miejscem rozcięcia wiązania peptydowego. HtrA_{Hp} i HtrA_{Ec} wykazały bardzo podobną specyficzność względem aminokwasów znajdujących się bezpośrednio przed i po ciętym wiązaniu peptydowym. Obie proteazy preferencyjnie cięły wiązania za niepolarnymi aminokwasami w pozycji P1, takimi jak

walina, leucyna i izoleucyna. Co ciekawe, pomimo wyżej wymienionych podobieństw, enzymy te wytwarzały różne peptydy, a lokalizacja miejsc cięcia w obrębie substratu była odmienna. Sugerowało to, iż HtrA_{Hp} and HtrA_{Ec} wykazują odmienną specyficzność względem drugorzędowych miejsc w substratowych białkach. W przypadku HtrA_{Sm} stosunek polarnych i niepolarnych aminokwasów w pozycji P1 był podobny; enzym preferował walinę, serynę i leucynę w pozycji P1, ale nie izoleucynę. W przypadku pozycji P1' (za miejscem cięcia wiązania peptydowego), HtrA_{Sm} wykazywał zwiększoną preferencję do aminokwasów naładowanych, w porównaniu z HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm}. Ta różnica w specyficzności jest przypuszczalnie zawiązana z pojedynczą substytucją aminokwasową w kieszeni specyficzności substratu S1, która jest odpowiedzialna za selektywne wiązanie łańcucha bocznego aminokwasu w pozycji P1. Dla HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm} ten region jest zachowany w ewolucji, a kieszenie specyficzności S1 dla HtrA_{Hp}/ HtrA_{Ec} zawierają aminokwasy: I205/I216, A227/238 i I228/I239 [2,3].

W przypadku HtrA_{Sm}, została także zbadana aktywność opiekuńcza tego białka i porównana do analogicznej aktywności modelowego HtrA_{Ec}. Wiadomo jest, że HtrA_{Ec} przeciwdziała agregacji cząsteczek chemicznie zdenaturowanego lizozymu. Okazało się, że HtrA_{Sm} wykazuje podobne własności i wydajnie obniża ilość powstających agregatów, co zostało wykazane metodą pomiaru rozpraszania światła i oznaczaniem ilości precypitujących cząsteczek lizozymu [2].

W następnych etapach została zbadana czwartorzędowa struktura białek HtrA. W tym celu wykorzystano dwie metody: sączenie molekularne (SEC) i ultrawierowanie analityczne. Używając tej pierwszej metody porównano profile elucji białek HtrA, pochodzących z *H. pylori* 26695, *S. maltophilia* i *E. coli*. Najlepiej poznane HtrA (HtrA_{Ec}) jest eluowane ze złoża w formie pojedynczego szczytu w pozycji odpowiadającej heksamerowi. Wyniki dla HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm} były inne. Proteolitycznie nieaktywny wariant HtrA_{Sm} (HtrA_{Sm}S229A) był eluowany w trzech frakcjach (prawdopodobnie trimery, heksamery i oligomery wyższego rzędu). Jednak, gdy użyto aktywnego wariantu HtrA_{Sm} zaobserwowano dwa wyraźnie określone szczyty (prawdopodobnie trimery i heksamery, z dominacją mniejszych form). HtrA_{Hp} wymywano jako mieszaninę trimerów i heksamerów z silną dominacją trimerów [2, 3]. Wyniki eksperymentu SEC zostały zweryfikowane dokładniejszą metodą, a mianowicie ultrawierowaniem z analizą szybkości sedymentacji. Eksperyment ten został przeprowadzony przez Dr Annę Modrak- Wójcik z Uniwersytetu Warszawskiego (Wydział Biofizyki). W tym przypadku przeanalizowaliśmy dwa nieaktywne warianty HtrA_{Hp}

(pochodzące ze szczepów 26695 i N6) oraz aktywny i nieaktywny wariant HtrA_{Sm}. Doświadczenia potwierdziły, że oba homologii: HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm} są obecne jako mieszanina oligomerów o różnej wielkości. Proteolitycznie nieaktywny wariant HtrA_{Sm} tworzył trimery i heksamery, ale wykryto również większe cząsteczki. Te rozbieżności wynikają prawdopodobnie z obecności ligandów peptydowych, które są bardzo trudne do usunięcia z preparatu proteolitycznie nieaktywnego białka. W przypadku HtrA_{Hp} dominowały trimery, ale występowały również inne formy oligomeryczne. Co interesujące, zawartości poszczególnych form oligomerycznych w dwóch analizowanych wariantach HtrA_{Hp} znacznie się różniły. W przypadku HtrA_{Hp} ze szczepu 26695 występowały trzy główne frakcje, odpowiadające trimerom, heksamerom i nanomerom, z dominacją trimerów. Dla HtrA_{Hp} ze szczepu N6 uzyskaliśmy inny wynik. Zaobserwowaliśmy dwa główne szczyty odpowiadające trimerom i 18-merom. Zależne od szczepu *H. pylori* różnice w zawartości form oligomerycznych zostały również zaobserwowane w kazeinowych zymogramach. Duża zawartość form oligomerycznych była obserwowana dla HtrA_{Hp} z N6 i J99, podczas gdy HtrA_{Hp} ze szczepu 26695 migrowało w żelu głównie w formie monomerycznej. Ta obserwacja sugeruje, że oligomery HtrA_{Hp} 26695 i J99 są nadzwyczaj stabilne, ponieważ są w stanie utrzymać się w denaturujących warunkach elektroforezy żelowej. Porównanie sekwencji aminokwasowych wariantów HtrA_{Hp} ze szczepów 26695, J99 i N6 ujawniło, że białka te są identyczne w 99% i różnią się tylko pięcioma aminokwasami, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za obserwowane różnice w stabilności oligomerów HtrA_{Hp} [2,3].

W przypadku kilku dobrze scharakteryzowanych homologów HtrA obecność substratów prowadzi do reorganizacji oligomerów i tworzenia dużych cząsteczek wyglądem przypominających klatkę. Zjawisko to można łatwo zaobserwować za pomocą SEC. Na przykład profil elucji HtrA_{Ec} inkubowanego z β -kazeiną zawiera dodatkową frakcję, która odpowiada 24-merom. W naszych doświadczeniach obecność substratów powodowała również tworzenie oligomerów wyższego rzędu w przypadku wszystkich badanych nieaktywnych proteolitycznie wariantów HtrA (S/A). Analizy aktywnych HtrA_{Sm} i HtrA_{Hp} nie wykazały obecności większych form oligomerycznych (z substratem lub bez). Najprawdopodobniej oligomery wyższego rzędu w tym przypadku rozpadają się po degradacji cząsteczki substratu, podobnie jak w przypadku HtrA_{Ec}. Porównanie teoretycznego modelu HtrA_{Sm} ze znaną strukturą HtrA_{Ec} potwierdziło założenie, że interakcje pomiędzy trymerami HtrA_{Sm} są labilne. W obecności substratu HtrA_{Hp} (S/A) tworzył stabilne oligomery

podobne do HtrA_{Ec}, co sugeruje, że zależne od substratu reorganizacje struktury są podobne dla tych dwóch enzymów. Wynik ten był niezależny od badanej temperatury i pH roztworu [2,3].

Ustalenie fizjologicznej funkcji białka HtrA_{Hp} w komórce bakteryjnej było dotychczas znacznie utrudnione z powodu braku szczepu pozbawionego genu *htrA*_{Hp}. Poprzednie próby jego uzyskania okazały się nieskuteczne, pomimo wykorzystania ponad 100 szczepów *H. pylori* pochodzących z różnych źródeł. We współpracy z dr hab. Anną Zawilak-Pawlik z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu podjęta została jeszcze jedna próba usunięcia *htrA* z genomu *H. pylori*. W przypadku pojedynczego szczepu *H. pylori* N6 nasze wysiłki zakończyły się sukcesem i udało się skonstruować szczep N6Δ*htrA*_{Hp}. Dla kontroli otrzymano szczep komplementacyjny z ponownie wprowadzonym funkcjonalnym genem *htrA*_{Hp} (N6Δ*htrA*/*htrA*_{N6})[dane nieopublikowane]. Dzięki stażowi w laboratorium Prof. Dr Steffena Backerta z Uniwersytetu Fryderyka i Aleksandra w Erlangen i Norymberdze możliwe było przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki fenotypu mutantu N6Δ*htrA*_{Hp}. Gdy bakterie hodowano w standardowych warunkach dla *H. pylori*, nie zaobserwowano istotnych różnic we wzroście badanych szczepów. Następnie przetestowano efekty różnych warunków stresowych, w tym stresu temperaturowego, oksydacyjnego, osmotycznego i pH, a także działania puromycyny. Komórki *H. pylori* pozbawione *htrA* były bardziej wrażliwe na większość użytych warunków stresowych w porównaniu z bakteriami niezmutowanymi lub szczepem komplementacyjnym. Jedynym wyjątkiem był stres oksydacyjny wywołany przez H₂O₂ i wodoronadtlenek kumylu; w tym przypadku testowane szczepy reagowały podobnie. Wszystkie czynniki stresowe stosowane w naszych doświadczeniach wpływają na strukturę białka, prowadząc do ich denaturacji i ostatecznie do agregacji. Dlatego można założyć, że HtrA_{Hp} podobnie jak inne bakteryjne homologii HtrA, jest ważnym elementem w systemie kontroli jakości białek [3].

Podsumowując, do największych osiągnięć mojej pracy można zaliczyć:

- (1) przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki aktywności proteolitycznej dwóch homologów HtrA z bakterii patogennych *H. pylori* i *S. maltophilia* i porównania ich z modelową proteazą HtrA bakterii *E. coli*,
- (2) charakterystykę aktywności opiekuńczej HtrA_{Sm},
- (3) określenie struktur czwartorzędowych HtrA_{Hp} i HtrA_{Sm},

(4) określenie wpływu delecji genu *htrA_{Hp}* na wzrost i przeżywalność *H. pylori* w warunkach stresowych *in vitro*.

Literatura:

[1] Skórko- Glonek J., Figaj D., **Zarzecka U.**, Przepióra T., Renke J., Lipińska B. (2017) "The extracellular bacterial HtrA proteins as potential therapeutic targets and vaccine candidates". *Curr. Med. Chem.* Vol. 24, iss. 20, page: 2174-2204.

[2] **Zarzecka U.**, Modrak- Wójcik A., Bayassi M., Szewczyk M., Giełdoń A., Lesner A., Koper T., Bzowska A., Sanguinetti M., Backert S., Lipińska B., Skórko- Glonek J. (2018) „Biochemical properties of the HtrA homolog from bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*". *Int. J. Biol. Macromol.* Vol. 109, page: 992-1005.

[3] **Zarzecka U.**, Modrak-Wójcik A., Figaj D., Apanowicz M., Lesner A., Bzowska A., Lipińska B., Zawilak-Pawlik A., Backert S., Skórko- Glonek J. (2019) „Properties of the HtrA protease from bacterium *Helicobacter pylori* whose activity is indispensable for growth under stress conditions". *Front Microbiol.* 10:961.

¹ Brooke J.S. (2012) „*Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen". *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1):2-41.

² Price R.G.; Wildeboer, D.: *E. coli* as an Indicator of Contamination and Health Risk in Environmental Waters, In *Escherichia coli* - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications, Ed. A. Samie: InTech Open, Croatia, 2017.