

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Structural and functional studies of selected enzymes from pathogenic bacteria

(Badania strukturalne i funkcjonalne wybranych enzymów z patogennych bakterii)



Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Joanna Lipowska

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Praca doktorska wykonana pod opieką promotorską

Prof. dr hab. Krzysztofa Lewińskiego

Kraków 2019

Antybiotykooporność jest jednym z ważniejszych problemów z jakimi zmagają się medycyna w ostatnich latach. Jako odpowiedź na niesprzyjające warunki środowiska, mikroorganizmy wykształciły zdolność do szybkiego przystosowywania się i rozprzestrzeniania nabytych cech pozwalającym im przetrwać. Umiejętność ta sprawia, że znane antybiotykoterapie stają się coraz mniej skuteczne. Poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych stało się więc jednym z priorytetów badaczy na całym świecie. Etapem limitującym walkę z antybiotykoopornością jest wciąż słabe zrozumienie procesów zachodzących w organizmach i molekularne mechanizmy działania stosowanych leków. Aby zwrócić uwagę naukowców na ten problem, Światowa Organizacja Zdrowia w 2017 roku ogłosiła listę patogenów, dla których opracowanie nowych strategii terapeutycznych wydaje się najpilniejsze. Na szczycie tej listy znalazły się bakterie odporne na działanie antybiotyków z grupy karbapenemów, cefalosporyn, fluorokinolonów i ampicylin.

Głównym celem tej pracy było otrzymanie i scharakteryzowanie struktur przestrzennych białek pochodzących z patogennych bakterii, wyselekcjonowanych przez Centrum Genomiki Strukturalnej CSGID jako potencjalne cele nowych strategii terapeutycznych. Wybrane do badań białka pochodzą z bakterii *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Coxiella burnetii* i *Staphylococcus aureus*, groźnych ludzkich patogenów, których część znalazła się na szczytowych pozycjach listy priorytetów badawczych opublikowanej przez WHO. Ponieważ większość z wybranych do badań enzymów nie została wcześniej scharakteryzowana, poznanie ich struktury przestrzennej przyczyni się również do zwiększenia dostępności modeli strukturalnych w kontekście rozwiązywania struktur białek homologicznych. Każde z białek na początkowym etapie krystalizacji poddano procedurze opracowanej w CSGID w celu usprawnienia i automatyzacji procesu otrzymania struktury przestrzennej, jednak we wszystkich przypadkach nie przyniosło to oczekiwanych efektów. Jednym z celów tej pracy było więc opracowanie indywidualnej strategii eksperymentalnej dla każdego z wyselekcjonowanych białek. Zaplanowane badania strukturalne wzbogacają o analizę homologii białek, architektury miejsca aktywnego a także ocenę ich potencjalnego znaczenia w kontekście walki z antybiotykoopornością.

Badania prowadzono na rekombinowanych białkach, otrzymanych w wyniku produkcji w bakteryjnych systemach ekspresyjnych. Białka oczyszczano metodami chromatograficznymi z użyciem złoża Ni-NTA oraz Superdex i krystalizowano metodą dyfuzji przez fazę gazową, techniką wiszącej lub siedzącej kropli. Przy optymalizacji procesu krystalizacji korzystano z tradycyjnych metod, takich jak zmiana stężenia białka i precypitantów. Stosowano również mniej popularne metody, w tym zarodkowanie, alternatywny rezerwuuar, dodatek proteaz do

kropki krystalizacyjnych oraz badania denaturacji termicznej w celu wyłonienia substancji stabilizujących białka. Pomiar dyfrakcji wykonano przy użyciu promieniowania synchrotronowego w Argonne National Laboratory (USA) lub przy użyciu dyfraktometrów Supernova i Synergy (Rigaku Oxford Diffraction). W celu określenia specyficzności substratowej wybranych białek skonstruowano bibliotekę potencjalnych metabolitów, w obecności których przeprowadzono reakcję, monitorując zużycie kofaktora metodami spektrofotometrycznymi.

Pierwszą grupę białek stanowiły dihydroorotazy z bakterii *Yersinia pestis* (pałeczka dżumy) i *Vibrio cholerae* (przecinkowiec cholery). Dihydroorotazy to enzymy szlaku syntezy pirymidyn *de novo*, którego prawidłowe funkcjonowanie jest niezbędne do przetrwania bakterii, ponieważ nie posiadają alternatywnych szlaków, w których mogłyby wytworzyć nukleotydy. W obu przypadkach wykorzystano porównanie temperatury denaturacji termicznej tych białek w celu znalezienia substancji, które pomogą zwiększyć stabilność badanych preparatów w procesie krystalizacji. Dla obu białek otrzymane kryształy poddano badaniom dyfrakcji przy użyciu promieniowania synchrotronowego i otrzymano ich struktury przestrzenne.

Dla dihydroorotazy z *Yersinia pestis* dane dyfrakcyjne zebrane zostały przy trzech długościach fali. W efekcie pozwoliło to na zidentyfikowanie jonów metali cynku związanych przez białko a także określenie ich dokładnej lokalizacji w miejscu aktywnym enzymu. Poza cynkiem, w pięciu na sześć podjednostek białkowych zidentyfikowano jon jabłczanowy w kieszeni wiążącej. Obecność jonu jabłczanowego, składnika roztworu krystalizacyjnego, dzięki podobieństwu do fizjologicznego substratu dihydroorotaz jakim jest N-karbamoilo-L-asparaginian, spowodowała zamknięcie kieszeni wiążącej przez stabilizację ruchomej pętli. Pętla ta ma kluczowe znaczenie w reakcji enzymatycznej prowadzonej przez dihydroorotazy. W szóstej podjednostce, w której nie zaobserwowano jabłczanu, ruchoma pętla pozostała nieuporządkowana. Struktura dihydroorotazy z *Vibrio cholerae*, krystalizowana w innych warunkach potwierdziła obserwacje dotyczące nieuporządkowania pętli w przypadku braku ligandu. W strukturze tej zidentyfikowano również jony cynku, które w przypadku obu białek koordynowane były przez te same reszty aminokwasowe. Porównanie sekwencji i otrzymanych struktur z przedstawicielami innych poznanych już dihydroorotaz pozwoliło zaproponować klasyfikację nowo scharakteryzowanych enzymów jako bakteryjny typ II. Typ ten jest najbardziej odległy ewolucyjnie od ich ludzkiego odpowiednika, dzięki czemu różnice w ich budowie i sposobie działania mogą zostać wykorzystane do projektowania terapii

ukierunkowanych na walkę z patogenami, minimalizując niekorzystny wpływ na działanie enzymu ludzkiego.

Kolejnym badanym białkiem była peptydaza B z *Y. pestis*. Peptydazy B to metaloenzymy rozcinające wiązania peptydowe w wielu substratach. Białko to wybrano ze względu na jego przypuszczalne znaczenie w patogenezie, ponieważ odkryto, że może wiązać się do ludzkich czynników transkrypcyjnych. W procesie uzyskania struktury przestrzennej peptydazy B z *Y. pestis* największą trudnością było otrzymanie kryształów dobrej jakości oraz fakt, że nie zostały dotąd określone struktury dla podobnych białek, które mogłyby posłużyć jako matryce do podstawienia molekularnego. Po przebadaniu ponad 60 kryształów oraz skonstruowaniu kilku modeli, udało się rozwiązać strukturę przestrzenną tego białka. W strukturze tej enzym zawierał nieuporządkowany fragment łańcucha peptydowego w obrębie miejsca wiązania metalu, co prawdopodobnie odpowiada nieaktywnej formie enzymu. Otrzymana struktura przestrzenna białka została zdeponowana w bazie PDB jako pierwszy scharakteryzowany strukturalnie enzym klasy EC 3.4.11.23. W celu scharakteryzowania enzymu w formie aktywnej, wygenerowano model homologiczny w którym zaproponowano pozycję metalu oraz reszt zaangażowanych w jego koordynację i porównano obie struktury.

Kolejnym celem badań było otrzymanie struktury przestrzennej dla kasety wiążącej ATP, będącej częścią ABC transportera, wchodzącego w skład proteomu bakterii *Coxiella burnetii*. Transportery ABC wykorzystują energię z hydrolizy ATP do transportu przez błony. Z tego powodu uważane są za istotne czynniki wirulencji, ponieważ mogą transportować toksyny. W eksperymentach krystalizacyjnych uzyskano dużą liczbę kryształów białkowych, z których 155 zostało poddanych badaniom dyfrakcji przy użyciu promieniowania synchrotronowego. Ze względu na niski poziom sygnału anomalnego, strukturę rozwiązano stosując podstawienie molekularne. Poza jonami magnezu, sodu i wapnia, a także cząsteczkami ATP związanymi przez białko, otrzymana struktura zawierała acetylowaną lizynę w pozycji 139. Acetylacja tej reszty była opisana w literaturze, natomiast nie zostało to wcześniej zaobserwowane w żadnych strukturach kaset wiążących ATP ABC transportera zdeponowanych w bazie PDB.

Badania aldo-keto reduktazy z *Klebsiella pneumoniae* (pałeczka zapalenia płuc) skupiały się na przybliżeniu funkcji fizjologicznej tego białka, ponieważ jego struktura przestrzenna została wcześniej określona. Aldo-keto reduktazy to białka o bardzo szerokiej specyficzności substratowej, które używają NADPH jako kofaktora. W badaniach aktywności enzymatycznej przy użyciu skonstruowanej dla aldo-keto reduktaz biblioteki metabolitów wyłoniono substraty tego enzymu: izatynę oraz jej metylową i fenylową pochodną,

benzaldehyd oraz jego pochodne, a także pirogronian sodu i jego pochodne. Informacje te przybliżają ustalenie fizjologicznej funkcji tego białka a także jego roli w procesie patogenezы.

W toku prowadzonych badań podjęto również próby otrzymania struktury przestrzennej aldo-keto reduktazy z *Klebsiella pneumoniae* w formie apo oraz w kompleksach z substratami lub ich analogami. Dla białka krystalizowanego przy nieobecności kofaktora nie udało się otrzymać kryształów, których jakość pozwoliłaby na przeprowadzenie testów dyfrakcyjnych. Dla białka krystalizowanego w obecności substratów otrzymano kilka struktur, jednak w żadnej z nich nie udało się jednoznacznie stwierdzić obecności substratu w miejscu aktywnym. Pojawiły się jednak zmiany w konformacji aminokwasów tworzących miejsce wiążące sugerujące, że białko w kryształach pozostaje aktywne i katalizuje reakcję a następnie uwalnia produkt reakcji. Wyznaczono również struktury białka, którego kryształy rosły w innych warunkach niż te, dostępne w bazie PDB. Porównanie tych struktur pozwoliło na stwierdzenie, że pomimo różnych grup przestrzennych i różnego składu roztworów krystalizacyjnych obie struktury są praktycznie identyczne.

Ostatnim z badanych białek było hipotetyczne białko SAOUHSC_01256 z bakterii *Staphylococcus aureus*. W przypadku tego białka limitującym etapem okazała się jakość otrzymanych kryształów. Optymalizacja pozwoliła na uzyskanie dużej liczby kryształów, z których 95 zostało poddane testom dyfrakcji. Pomimo znaczącej poprawy morfologii kryształów nie rozpaszały one promieniowania X tak, aby można było wyznaczyć strukturę przestrzenną. W celu przybliżenia funkcji fizjologicznej tego białka wygenerowano model homologiczny. Analiza wyników oraz porównanie z sekwencjami białek homologicznych wykazała że prawdopodobnie jest to członek nadrodziny białek podobnych do LuxS/M16 peptydaz.

Podsumowując, otrzymane w tej pracy trójwymiarowe modele wybranych białek z organizmów patogennych a także przybliżyły funkcji tych enzymów, które wcześniej nie zostały scharakteryzowane. Znacząco zwiększa to dostępność modeli strukturalnych w bazie PDB i może przyczynić się do określenia struktury przestrzennej innych, homologicznych białek. Trójwymiarowe struktury otrzymane w tej pracy mogą pomóc zrozumieć mechanizmy działania bakteryjnych enzymów a także określić ich rolę w patogenezы, a co za tym idzie przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych do walki z opornymi na antybiotykoterapię patogenami.