

## Streszczenie

*Staphylococcus aureus* jest szeroko rozpowszechnionym drobnoustrojem, który w sposób bezobjawowy, stale lub przejściowo, kolonizuje blisko 60% populacji ludzkiej. Gronkowiec złocisty odpowiedzialny jest za szerokie spektrum zakażeń, rozciągające się od niegroźnych dolegliwości skórnych, aż do poważnych stanów zagrażających życiu i zdrowiu, takich jak zapalenie opon mózgowych czy zapalenie płuc. W ostatnich latach zaobserwowano alarmujący wzrost oporności gronkowca na dostępne antybiotyki, który doprowadził do wzrostu liczby ciężkich do wyleczenia zakażeń. Powstała sytuacja spowodowała, że fizjologia i patogeneza *S. aureus* jest przedmiotem intensywnych badań naukowych, zwłaszcza w kontekście poszukiwania nowych strategii terapeutycznych.

Gronkowiec złocisty posiada zdolność oddziaływania na organizm gospodarza dzięki wytwarzaniu wielu czynników wirulencji, wśród których ważną rolę odgrywają proteazy sekrecyjne. Bakterie te wydzielają do dziewięciu proteaz serynowych (proteaza V8, toksyna epidermolityczna A, toksyna epidermolityczna B, SplA, SplB, SplC, SplD, SplE, SplF), dwie proteazy cysteinowe (stafopaina A, stafopaina B) i jedną metaloproteazę (aureolizyna). Proteazy modulują przebiegający procesu infekcji poprzez inaktywację inhibitorów proteaz gospodarza oraz peptydów antybakteryjnych, degradację immunoglobulin, białek kaskady dopełniacza, modyfikację powierzchni bakterii czy też interakcję z komponentami szlaku krzepnięcia lub fibrynolizy. Mimo to, dostępna w literaturze charakterystyka składników gronkowcowego systemu proteolitycznego jest nadal daleka od pełnego zrozumienia. Jedną z proponowanych strategii zwalczania gronkowca zakłada skierowanie terapii na proteazy zewnątrzwydzielnicze. Podejście to wymaga jednak dalszych badań, szerszego zrozumienia i wyjaśnienia wkładu proteaz sekrecyjnych w patogenezę gronkowca.

Celem niniejszej pracy, jest charakterystyka biochemiczna i strukturalna wybranych proteaz serynowych, których geny zgrupowane są w obrębie operonu *spl*. Białka te są najmniej poznaną grupą proteaz gronkowcowych. Proteazy Spl wykazują duży stopień podobieństwa sekwencji do proteazy V8 oraz toksyn epidermolitycznych, które są ważnymi czynnikami wirulencji produkowanymi przez *S. aureus*. Pozwala to sądzić, że białka Spl są interesującym przedmiotem badań w kontekście zjadliwości patogenu. W chwili rozpoczęcia prac scharakteryzowano cztery z sześciu białek znajdujących się w tej grupie, a mianowicie: SplA, SplB, SplC oraz SplD. Pozostałe dwie proteazy SplE i SplF są przedmiotem badań opisanych w pracy doktorskiej.

Prace rozpoczęto od uzyskania różnych konstruktów ekspresyjnych białka SplF, a następnie opracowano wydajną metodę produkcji i oczyszczania otrzymanych białek rekombinowanych. Uzyskane preparaty białkowe były wykorzystywane do dalszych badań. Otrzymano kryształy muteiny His39Ala białka SplF, które posłużyły do rozwiązania struktury krystalograficznej, która pomogła w wytłumaczeniu aktywności enzymatycznej analizowanej proteazy. Używając metody kombinatorycznych bibliotek syntetycznych substratów tetrapeptydowych LSTS (ang. Libraries of Synthetic Tetrapeptide Substrates), określono wstępnie specyficzność substratową proteazy SplF. Specyficzność ta została potwierdzona w dalszych badaniach polegających na trawieniu biblioteki białek, oraz analizie uzyskanych fragmentów przy pomocy spektrometrii mas. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że proteaza SplF preferencyjnie rozpoznaje substraty zawierające leucynę lub metioninę w pozycji P1. Ponadto przeprowadzona została szczegółowa analiza kinetyczna, która pozwoliła wyjaśnić udział N-końca białka w kontroli jego aktywności. Druga część pracy obejmuje strukturalną analizę porównawczą dwóch białek rodziny Spl -białka SplB oraz SplE, która umożliwiła stworzenie modelu oddziaływania enzym-substrat. Wstępnie wytypowano reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wąską specyficzność substratową obu białek, które zostały potwierdzone w szczegółowej analizie mutacyjnej. Przy użyciu techniki PS-SCL (ang. Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries) określono specyficzność substratową uzyskanych mutein. Potwierdzono, że na drodze ukierunkowanej mutagenezy muteina SplB uzyskała specyficzność substratową charakterystyczną dla proteazy SplE – tym samym zweryfikowano model rozpoznawania substratu. Każda z proteaz Spl charakteryzuje się indywidualną specyficznością substratową, która ma ścisłe powiązanie z ich swoistą budową przestrzenną, a tym samym czyni je ciekawym modelem do badań zależności pomiędzy specyficznością substratową, a strukturą przestrzenną enzymu. Wykazano, że subtelne zmiany kilku reszt aminokwasowych dają możliwość programowania potencjału proteolitycznego enzymu, co może znaleźć zastosowanie aplikacyjne. Ponadto, aktywność proteolityczna jest ściśle kontrolowana przez wewnętrzne mechanizmy zabezpieczając bakterie przed efektem niepożądanego aktywności wewnątrz komórki *S. aureus*. Przedstawione w pracy doktorskiej badania pozwoliły na stworzenie spójnego obrazu mechanizmu działania proteaz Spl, oraz możliwości manipulacji ich specyficznością.

*Ulatia Stroh*

11 -06- 2019