

Unikalny mechanizm aktywacji proteiny SplB gronkowca złocistego

Michał Zdżalik

Streszczenie

Wirulencja gronkowca złocistego w dużej mierze oparta jest na zewnątrzwydzielniczych proteinazach. Szereg z nich stanowią znane od dawna enzymy, których charakterystyka jest w znacznym stopniu zaawansowana. Przedmiot opisanych w rozprawie badań stanowi grupa sześciu kodowanych w pojedynczym operonie proteinaz serynowych Spl (serie protease like; SplA-SplF), o istnieniu których wiadomo od niedawna, a dostępne na ich temat dane są jedynie fragmentaryczne i dotyczą tylko enzymów SplA-SplD. Proteiny Spl są interesującym przedmiotem badań, gdyż istnieją przesłanki co do ich potencjalnej roli w patogenezie gronkowca złocistego. Ponadto, wyniki dotychczasowej charakterystyki biochemicznej wykazują niespotykaną wąską specyficzność substratową SplA, SplB i SplD oraz potencjalnie SplC, choć w przypadku ostatniego z wymienionych enzymów aktywność proteolityczna nigdy nie została udowodniona. Pozostałe proteiny Spl pozostają całkowicie niescharakteryzowane. Oprócz wysokiej specyficzności SplA, SplB oraz SplD, testy biochemiczne ujawniły kluczową rolę N-końca dojrzałej proteiny SplB dla jej aktywności proteolitycznej. Jakkolwiek wydłużenie naturalnego N-końca dojrzałej SplB skutkuje zahamowaniem aktywności enzymatycznej. Obserwacja ta sugeruje obecność mechanizmu kontrolującego aktywność enzymatyczną SplB, w który zaangażowany byłby peptyd sygnałny. Biorąc pod uwagę nieobecność propeptydu w strukturze SplB, peptyd sygnałny mógłby pełnić podwójną rolę, polegającą na jednoczesnym kierowaniu białka na drogę sekrecji oraz zabezpieczaniu komórki bakteryjnej przed niepożądaną proteolizą. Przedstawione w niniejszej rozprawie badania strukturalne różnych form SplB oraz przeprowadzone przez współpracowników analizy biochemiczne ich aktywności zaowocowały wykazaniem podwójnej roli pełnionej przez peptyd sygnałny SplB, polegającej na jednoczesnym kierowaniu enzymu do sekrecji oraz regulacji jego aktywności, co stanowiło realizację pierwszego celu założonego w ramach podjętych prac.

Kolejną charakterystyczną i intrygującą cechą dotyczącą SplB, która udokumentowana została w pracy Dubin et al. (2008) dotyczy budowy centrum katalitycznego proteiny. Okazuje się, iż niezbędny do przebiegu reakcji proteolizy element – miejsce wiązania oksyanionu – występuje w konformacji nieaktywnej. Dane te w zestawieniu z wykazaną wcześniej aktywnością proteolityczną enzymu stanowią kwestię trudną do wyjaśnienia przy wykorzystaniu klasycznego modelu katalizy. Wyjaśnienie tej kwestii stanowiło kolejny cel badań przeprowadzonych w ramach doktoratu. Prace te polegały w pierwszej kolejności na potwierdzeniu obserwacji dotyczących deformacji struktury miejsca wiązania oksyanionu SplB. Następnie przeprowadzone zostały badania strukturalne mające na celu wyjaśnienie mechanizmu determinującego zdolność proteiny SplB do hydrolizy wiązania peptydowego pomimo nieobecności prawidłowo wykształconego miejsca wiązania oksyanionu. Prace polegały na kokryształizacji SplB z inhibitorem fosfonianowym, którego struktura odzwierciedlała tetraedyczny produkt przejściowy reakcji hydrolizy wiązania peptydowego. Otrzymano dwie struktury krystalograficzne kompleksu, które w zestawieniu ze strukturami apo-SplB doprowadziły do wyjaśnienia oryginalnego mechanizmu aktywacji SplB.

W efekcie opisanych w rozprawie prac otrzymano wyniki wykazujące w sposób przekonujący podwójną rolę pełnioną przez peptyd sygnałny SplB oraz dokumentujące unikatowy mechanizm aktywacji, polegający na wywołanej obecnością substratu rearanzacji strukturalnej centrum aktywnego SplB do formy aktywnej. Zestawienie otrzymanych wyników ukazuje złożony, oryginalny mechanizm aktywacji SplB. Otrzymane dane pozwoliły na zaproponowanie istnienia podobnych, specyficznych mechanizmów regulujących aktywność pozostałych członków grupy enzymów Spl, a prace mające na celu potwierdzenie tej hipotezy są obecnie kontynuowane.