

Zastosowanie metod obliczeniowych w badaniach bakteryjnych białek TraR i AiiO

DOMINIKA JANKOWSKA

Pracownia Symulacji Układów Biomolekularnych,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Bakterie wykształciły mechanizmy pozwalające im zaadoptowanie się do panujących warunków w zajmowanej przez nie niszy ekologicznej. Jednym z nich jest mechanizm sygnalizatora zagęszczenia (QS, ang. quorum sensing). Polega on na kontrolowanej ekspresji genów w komórkach bakterii zależnej od stężenia cząsteczek sygnałowych przez nie produkowanych. Cząsteczki te po związaniu ze swoim receptorem doprowadzają do aktywacji określonych genów prowadzących do pewnych zmian fenotypowych, takich jak produkcja czynników wirulencji lub synteza cząsteczek odpowiedzialnych za reakcję chemiluminescencji. Najpowszechniejszym mechanizmem sygnalizatora zagęszczenia jest system typu LuxI/LuxR, w którym cząsteczkami sygnałowymi są acylowane laktony homoseryny (AHL).

Istnieją procesy, doprowadzające do zablokowania działania mechanizmu sygnalizatora zagęszczenia i kontrolowanej przez niego ekspresji genów. Mogą się do tego przyczyniać inhibitory receptora, czyli cząsteczki o budowie pozwalającej im na silne oddziaływanie z miejscem wiązania receptora. Gdy inhibitor jest związany z receptorem cząsteczki AHL, nie mają możliwości doprowadzić do aktywacji genów. Takie właśnie zjawisko badałam w pierwszej części swojej pracy. Moim zadaniem było określenie, czy cząsteczki plumbaginy i 3-chloroplumbaginy mogą oddziaływać z miejscem wiążącym ligand receptora TraR bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Monomer białka TraR po związaniu cząsteczki sygnałowej OOHL dimeryzuje dzięki czemu jest w stanie związać się z DNA w miejscu określanym jako kaseta *tra* i akty-

wować w ten sposób transkrypcję genów odpowiedzialnych za transfer plazmidu Ti. Plazmid Ti może transfekować rośliny, zawiera DNA, które m.in. wywołuje chorobę guzowatość korzeni. W bakterii *A. tumefaciens* obecny jest system quorum sensing TraI/TraR będący systemem typu LuxI/LuxR. Stosując metodę dokowań molekularnych, wyliczyłam średnie energie wiązania plumbaginy i 3-chloroplumbaginy oraz zaproponowałam modele, według których cząsteczki te mogą wiązać się do białka TraR.

Drugim rozpatrywanym przeze mnie sposobem blokowania mechanizmu sygnalizatora zagęszczenia było jego wyciszenie (ang. quorum quenching). Polega ono na niszczeniu cząsteczek sygnałowych przez enzymy hydrolizujące ich wiązania. Enzymem przeze mnie badanym było białko AiiO pochodzące z bakterii *Ochrobactrum* sp., które hydrolizuje wiązanie w obrębie wiązania acylowego cząsteczek AHL i klasyfikowane jest jako acylaza. W momencie rozpoczęcia przeze mnie prac jego struktura nie była jeszcze znana, zatem zanim mogłam przystąpić do dalszych badań, musiałam określić jego strukturę. W oparciu o sekwencję aminokwasową z użyciem programu I-TASSER wymodelowałam je, a następnie scharakteryzowałam, rozpoznając je jako α/β hydrolazę posiadającą triadę katalityczną Ser-Glu-His. Stosując metodę MetaPocket, określiłam potencjalne miejsce aktywne enzymu. W międzyczasie została opublikowana struktura krystalograficzna tego białka, jej porównanie z moimi wynikami pokazało, że są one zgodne ze strukturą uzyskaną eksperymentalnie. W tej samej publikacji została potwierdzona innego rodzaju aktywność hydrolytyczna tego białka, która następowała w obrębie pierścienia laktonowego cząsteczek AHL, co klasyfikuje enzym jako laktonazę. Dysponując takimi informacjami oraz modelem enzymu, obliczeniowo zbadalam jego oddziaływanie z cząsteczkami AHL oraz typ hydrolizy. Stosując procedurę Water-Swap, określiłam swobodną energię wiązania w obrębie kompleksu białko AiiO-wybrane cząsteczki AHL oraz udział poszczególnych reszt aminokwasowych w ich wiązaniu. Wykorzystując dokowania molekularne, przebadalam szereg cząsteczek AHL różniących się między sobą budową (długość łańcucha oraz podstawnik w pozycji 3. tegoż łańcucha). Zaobserwowałam, że mogą one przyjmować dwie istotne konformacje względem triady katalitycznej

eksponując grupę acylową lub pierścień laktonowy. Te dwie konformacje teoretycznie pozwalają na zajście reakcji w tych dwóch różnych miejscach, doprowadzając do powstania różnych produktów obserwowanych w eksperymentach, charakterystycznych dla, odpowiednio, acylazy lub laktonazy. Wykorzystując cząsteczki HHL i OdDHL, które wg literatury są najefektywniej hydrolizowane przez ten enzym, przeprowadziłam długie symulacje dynamiki molekularnej przy użyciu pakietu AMBER12. Pokazały one dynamikę cząsteczek i ich oddziaływania z białkiem w miejscu aktywnym. W oparciu o nie przygotowałam układy badawcze do symulacji reakcji metodą QM/MM przebiegających według zaproponowanych przeze mnie mechanizmów działania laktonazy i acylazy obejmujących transfer protonu w obrębie triady katalitycznej oraz atak nukleofilowy na odpowiedni węgiel substratu. Metoda ta łączy symulacje metodą mechaniki molekularnej z obliczeniami kwantowymi wykonywanymi na wybranym zestawie atomów. Pozwala na symulowanie przesunięć atomów i obserwację tworzących się i zrywanych wiązań oraz wywołanych przez nie zmian energii potencjalnej. Dzięki temu byłam w stanie określić, że hydroliza w obrębie grupy acylowej jest mało prawdopodobna, ponieważ wymaga nieporównywalnie dużych nakładów energii w porównaniu z hydrolizą pierścienia laktonowego. Spowodowane jest to brakiem odpowiedniej stabilizacji tworzącego się w trakcie reakcji układu tetraedrycznego.