

Bakterie przeżywają w wysoce heterogenicznym środowisku i są narażone na zmienne czynniki biotyczne i abiotyczne, które mogą generować stres oksydacyjny. Z tego powodu bakterie rozwinęły niezliczone mechanizmy wykrywania i reagowania na warunki stresowe. Najbardziej znaną strategią jest zmiana ekspresji genów w odpowiedzi na zmiany środowiskowe. Czynniki transkrypcyjne lub alternatywne czynniki sigma są aktywowane w warunkach stresu i wiążą się z genami docelowymi w celu aktywacji lub hamowania transkrypcji regulowanych genów. Modyfikacje potranslacyjne białek (PTM) również odgrywają ważną rolę w regulacji reakcji na stres, jednak ich dokładna funkcja w odporności na stres pozostaje w dużej mierze nieznaną. Jedną z potranslacyjnych modyfikacji białek, która ma istotny wpływ na mechanizm regulacyjny, jest AMPylacja. Proces ten obejmuje kowalencyjne dodanie adenozymonofosforanu (AMP) do białka, w wyniku czego powstaje białko o zmienionej aktywności biologicznej. Białka zdolne do przeprowadzania procesu AMPylacji, nazwane są AMPylatorami i często porównywane do kinaz. Nowo odkryta rodzina AMPylatorów – ewolucyjnie zachowane pseudokinazy z rodziny selenobiałek-O (SeO), które wydają się odgrywać kluczową rolę w regulacji odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz w utrzymaniu homeostazy redoks w komórkach. Ponieważ funkcja fizjologiczna SeO i jego mechanizm działania są tylko częściowo zrozumiane, projekt pozwoli poszerzyć wiedzę na temat biologicznej funkcji bakteryjnego homologa nowo odkrytej AMPylazy SeO czyli białka YdiU *E. coli*. Białko YdiU jest pseudokinazą powszechnie występującą w trzech królestwach życia i wysoce konserwatywną od *E. coli* do człowieka (identyczność sekwencji między SeO ludzkim a YdiU bakteryjnym wynosi 50% dla dopasowania pełnej długości). Ponad 15 000 białek zawiera przewidywaną wartość YdiU. Jednak funkcja YdiU *in vivo* i *in vitro* została scharakteryzowana dopiero po ostatnim odkryciu SeO AMPylazy, co czyni ją jedną z dziesięciu „most wanted unknown unknowns”. Białko YdiU występuje u większości gatunków bakterii a dostępne dane transkryptomyczne wykazały wzrost YdiU podczas ekspozycji na różne warunki stresowe, co sugeruje związek między YdiU a adaptacyjną odpowiedzią bakterii na stres. Ostatnie badania wykazały, że YdiU działa jako AMPylator i przenosi AMP z ATP na reszty Ser, Thr i Tyr w substratach białkowych. Oprócz auto-AMPylacji wskazano dwa potencjalne substraty AMPylowane przez YdiU. Są to białka zaangażowane w utrzymanie prawidłowej homeostazy redoks w komórce. Wśród potencjalnych substratów wskazano SucA, bakteryjny homolog składnika E1 kompleksu dehydrogenazy α -ketoglutaranu i glutaredoksynę (grx). Odkrycie, że YdiU działa jako enzym pośredniczący w modyfikacji białek, znacznie przybliżyła funkcje białek z rodziny SeO. Jednak wciąż nie wiadomo, w jaki sposób AMPylacja reguluje aktywność substratów i czy YdiU modyfikuje inne substraty białkowe, powodując tym samym zmiany ich funkcji w ramach innych ścieżek regulacyjnych i jak te molekularne zmiany przekładają się na warunkowo adaptacyjne lub upośledzone fenotypy.

Celem tego projektu jest poszerzenie wiedzy na temat powiązań funkcjonalnych AMPylaz rodziny SeO w *E. coli*. Wykorzystana zostanie niestabilność fenotypowa mutantów ydiU *E. coli*, wywołana pojawieniem się mutacji supresorowych jako efektu kompensującego brak funkcjonalnego białka YdiU w komórkach. Identyfikacja zmutowanych genów wskazuje na ich związek z metabolizmem energii komórkowej lub reakcją na stres lub z biogenezą błon. Te ostatnie mogą być związane z funkcjonalnymi mikrodomenami błonowymi (FMM), które przypominają eukariotyczne tratwy lipidowe i których rola w funkcjonowaniu błon u bakterii została niedawno rozpoznana.

W proponowanych pracach zastosowane zostaną dwa równoległe podejścia. (i) Identyfikacja i analiza fenotypowa supresorów mutacji ydiU. Wykrycie mutacji supresorowych u mutantów ydiU zapewnia wyjątkową okazję do identyfikacji białek innych niż Grx i SucA, które mogą być zaangażowane w zależny od YdiU szlak odpowiedzi na stres oksydacyjny lub znaleźć alternatywne ścieżki regulacyjne aktywowane w przypadku braku aktywności funkcjonalnego YdiU. Identyfikacja i charakterystyka takich białek jest celem tego zadania (ii) Identyfikacja możliwych składników szlaku sygnałowego YdiU i powiązanych białek we frakcji błon odpornych na detergenty. Celem tego zadania jest znalezienie, we frakcji membran odpornych na detergenty (DRM), białek, które mogłyby być bezpośrednio zaangażowane w szlak sygnalizacyjny YdiU lub związane z tym szlakiem przez połączenia regulacyjne.

Poznanie powiązań funkcjonalnych AMPylaz rodziny SeO może skutkować odkryciem i scharakteryzowaniem nowych białek uczestniczących w ewolucyjnie zachowanych szlakach regulacyjnych, które odgrywają znaczącą rolę w reakcji na stres oksydacyjny. Odporność na stres oksydacyjny jest jedną z głównych adaptacji, która pozwala bakteriom przetrwać w zmieniających się warunkach środowiskowych, wykorzystując energię z procesów oddechowych, i chroni patogeny bakteryjne przed szkodliwym działaniem komórek układu odpornościowego podczas wybuchu tlenowego. Dlatego wyniki tych badań będą ważne nie tylko dla zrozumienia mechanizmów podstawowych procesów adaptacyjnych w bakteriach ale powinny również przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów odpowiedzialnych za adaptację patogenów bakteryjnych do udanej infekcji ich gospodarzy.