

## **Badanie skoordynowanej regulacji ilości lipopolisacharydów (LPS) i fosfolipidów przez niezbędne białka składania LPS LapB/LapC oraz przez udział nowej tioesterazy**

Najbardziej definiującą i wyróżniającą cechą bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli*, jest obecność asymetrycznej błony zewnętrznej (OM), która jest niezbędna dla ich żywotności. Asymetria ta wynika z występowania lipopolisacharydu (LPS) w zewnętrznej warstwie OM i fosfolipidów w części wewnętrznej. LPS należy do najważniejszych czynników wirulencji bakterii chorobotwórczych i jest przyczyną sepsy bakteryjnej. Na całym świecie sepsa jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności, z ponad 1500 zgonów dziennie. LPS pokrywa blisko 70% powierzchni komórki, a jego synteza i translokacja do OM wymaga ponad 50 genów, z których około 30 jest niezbędnych do życia, stanowiąc 10% wszystkich koniecznych do życia genów u *E. coli*. Ponieważ wiele z nich jest kluczowych i unikalnych dla bakterii, są one atrakcyjnymi celami do odkrywania nowych antybiotyków i szczepionek. Aby u bakterii występował zrównoważony wzrost, musi istnieć ścisła równowaga między fosfolipidami a LPS, posiadającymi wspólny prekursor metaboliczny. Jakikolwiek zaburzenie stosunku ilości LPS do fosfolipidów powoduje śmierć bakterii. Omawiana równowaga jest osiągana poprzez regulację ilości białka LpxC, które katalizuje pierwszy nieodwracalny etap biosyntezy LPS, oraz przez enzym FabZ, który inicjuje syntezę fosfolipidów. LpxC jest niestabilnym białkiem, którego stabilność jest kontrolowana przez wiele czynników. W ciągu ostatnich kilku lat wykazaliśmy, że białka FtsH i LapB pośredniczą w proteolizie LpxC, a nowo odkryte, niezbędne do życia białko LapC hamuje aktywność LapB i zapobiega niepożądanemu usuwaniu LpxC. Ponieważ nie wiadomo, w jaki sposób jest regulowana aktywność LapB i LapC w odpowiedzi na zapotrzebowanie na LPS i które aminokwasy w LapB i LapC pośredniczą w interakcji z LPS, aspekty te są przedmiotem badań niniejszego projektu. LPS szczepu dzikiego *E. coli* zawiera wysoce konserwowalny heksaacylowany lipid A, będący fundamentalną endotoksyną, rozpoznawany przez kluczowy i niezbędny do życia transporter LPS - MsbA odpowiedzialny za translokację LPS przez błonę wewnętrzną (IM). Nasze ostatnie badania wykazały, że gdy bakterie syntetyzują LPS z niedoacylowanym lipidem A, to wymagają kardiolipiny dla swojej żywotności. Podobnie jest w przypadku braku białka LapD lub gdy LapC jest niefunkcjonalne. Wtedy również synteza kardiolipiny jest niezbędna, aczkolwiek molekularne podstawy tego wymagania nie są poznane. Aby wyjaśnić kluczowe, nieznanne elementy, zastosowaliśmy kilka strategii. Po pierwsze, została zainicjowana mutageniza LapB i LapC, a zmutowane białka, które prawdopodobnie utraciły zdolność do oddziaływania, na podstawie doświadczeń typu „pull-down”, sugerują, że transmembranowe zakotwiczenia białka LapC oraz N-końcowy, membranowy region LapB pośredniczą w ich oddziaływaniach. Planujemy kontynuować powyższe badania i zidentyfikować specyficzne aminokwasy, które są niezbędne do wiązania LPS oraz do oddziaływań białko-białko. W tym celu zostaną zmierzone powinowactwa wiązania i ich wpływ na proteolizę LpxC. Aby jeszcze bardziej poszerzyć naszą wiedzę na temat regulacji LpxC i tego, jak bakterie utrzymują symetrię OM, wykorzystano to, że szczepy z defektywnym LapC mają poważne zaburzenia w strukturze LPS i związane z tym nieprawidłowości we wzroście oraz to, że szczepy jednocześnie pozbawione syntazy kardiolipiny oraz ostatniego enzymu, który wytwarza heksaacylowany lipid A, wykazują warunkowo letalny fenotyp, i wyizolowano supresory, które przewyciężają powyższą letalność. Wstępne wyniki naszych badań zidentyfikowały jeszcze jedno, nowe białko TesD o przewidywanej aktywności tioesterazy. Na podstawie wprowadzających doświadczeń biochemicznych stwierdzono, że TesD oddziałuje z kilkoma enzymami zaangażowanymi w syntezę LPS i fosfolipidów, w tym z centralnym białkowym nośnikiem grup acylowych. Wobec powyższego proponowane w projekcie doświadczenia będą określać ilościowo wcześniej wymienione oddziaływania, a także zbadają, w jaki sposób nieobecność, jak również nadprodukcja TesD wpływają na stabilność LpxC oraz na skład LPS. Ponadto chcemy ustalić, czy TesD jest selektywne w stosunku do konkretnej długości łańcucha acylowego kwasów tłuszczowych, co może wpływać na równowagę między nasyconymi a nienasyconymi kwasami tłuszczowymi i tym samym zmieniać stabilność LpxC. Supresory przywracające wzrost bakterii, które posiadają defektywne białko LapC, zostaną wyizolowane i przetestowane celem stwierdzenia, czy przewyciężają nieprawidłowości w asymetrii i przepuszczalności OM. Będą przeprowadzone eksperymenty w celu ustalenia czy wspomniana nadekspresja zapobiega nadmiernej degradacji LpxC w mutantach *lapC* czy też działa jako induktor do sygnału stabilizacji LpxC. Wszystkie powyżej opisanne doświadczenia naukowe pozwolą zidentyfikować nowe, regulacyjne kontrole biosyntezy LPS i fosfolipidów. Ponadto peptydy oparte na sekwencji białek LapB i LapC mogą w przyszłości służyć jako nowe środki przeciwdrobnoustrojowe. Inhibitory LpxC, takie jak CHIR090, są już znanymi, nowymi antybiotykami, a peptyd z LapC wykazał się również skutecznością przeciwko określonym bakteriom, stąd nasze badania będą miały szersze znaczenie.