

**mgr Marta Nieckarz**  
Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Instytut Mikrobiologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski

## AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### **Function of the regulator OmpR in the modulation of the outer membrane proteome of *Yersinia enterocolitica***

Promotor: prof. dr hab. Katarzyna Brzostek

Promotor pomocniczy: dr hab. Adrianna Raczkowska

Recenzenci: dr hab. Monika Janczarek, prof. UMCS  
*Zakład Genetyki i Mikrobiologii*  
*Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii*  
*Wydział Biologii i Biotechnologii*  
*Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej*

prof. dr hab. Ewa Łojkowska  
*Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin*  
*Instytut Biotechnologii*  
*Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii*  
*Uniwersytetu Gdańskiego*  
*i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego*

*Yersinia enterocolitica* to gramujemna bakteria wywołująca jersinozę – ostrą lub przewlekłą, odzwierzęcą chorobę zakaźną, która może przyjmować różne postaci kliniczne, najczęściej żołądkowo-jelitowe. Pałeczki *Y. enterocolitica* są zdolne do kolonizacji wielu różnorodnych nisz w obrębie organizmu gospodarza, a także w środowisku naturalnym (w wodzie i glebie). Kluczową rolę w procesie patogenezy oraz adaptacji do zmiennych warunków środowiska pełnią białka błony zewnętrznej (OM), a wśród nich czynniki wirulencji, m.in. adhezyny YadA, Ail, Inv, Myf, białka systemu sekrecji III typu Ysc-Yop, a także poryny dyfuzji ogólnej i specyficznej, receptory związane z transportem substancji odżywczych oraz jonów czy systemy wyrzutu *efflux*.

Synteza czynników wirulencji, jak i odpowiedź adaptacyjna bakterii patogennych na zmienne warunki środowiska, tj. temperaturę, pH, osmolarność, dostępność składników odżywczych/jonów, a także na obecność substancji toksycznych, pozwalają przeżyć w określonej niszy ekologicznej oraz skutecznie konkurować z naturalnym mikrobiomem.

Dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału (TCS) to szlaki regulacyjne, które umożliwiają bakteriom odbieranie oraz reagowanie na liczne zewnętrzne sygnały poprzez modulację ekspresji odpowiednich genów. Archetypem TCS jest szlak sygnałowy EnvZ/OmpR niepatogenicznej *Escherichia coli* K-12 uczestniczący w osmoregulacji ekspresji genów białek porynowych OmpC i OmpF. System EnvZ/OmpR składa się z transbłonowej kinazy histydynowej EnvZ, która odbierając sygnał ze środowiska, przenosi go w postaci grupy fosforanowej na partnerskie białko cytoplazmatyczne – regulator odpowiedzi OmpR. Ufosforylowane białko OmpR wiąże się z regionem promotorowym genu *ompC* oraz *ompF* i w sposób pozytywny lub negatywny reguluje ich transkrypcję.

Funkcja białka OmpR w regulacji ekspresji genów jest od lat przedmiotem intensywnych badań u różnych gatunków bakterii, w tym u *Y. enterocolitica*. Wyniki sugerują, że regulator OmpR może pełnić różnorodne, często odmienne funkcje, także specyficzne dla określonego gatunku bakterii. Klasycznym podejściem stosowanym do identyfikacji celów działania OmpR było dotychczas badanie fizjologicznych konsekwencji delekcji genu regulatora. Wprowadzenie technik transkryptomicznych oraz proteomicznych umożliwiło kompleksowe spojrzenie na funkcję OmpR u bakterii.

Badania prezentowane w pracy doktorskiej koncentrowały się na poznaniu funkcji regulatora OmpR *Y. enterocolitica* w modulowaniu składników proteomu błony zewnętrznej oraz wyjaśnieniu roli OmpR w regulacji ekspresji wytypowanych genów na poziomie transkrypcyjnym.

Do identyfikacji białek błony zewnętrznej, regulowanych przez białko OmpR zastosowano różnicową analizę proteomiczną metodą *shotgun*. W pierwszym etapie prac dokonano optymalizacji protokołu izolacji białek OM, wykorzystując szereg detergentów w zmiennych kombinacjach i stężeniach. Optymalizowano także warunki trawienia trypsyną uzyskanych frakcji białkowych. Wyniki analiz LC-MS/MS przeprowadzanych podczas testowania protokołów izolacji białek OM, pozwoliły na wybór optymalnej metodyki, którą zastosowano we właściwych eksperymentach.

Fracje białkowe błon, wzbogacone o białka OM, uzyskane ze szczepów różniących się obecnością białka OmpR, tj. dzikiego i mutantu  $\Delta ompR$ , hodowanych w różnych warunkach temperatury, osmolarności oraz pH, analizowano w systemie HPLC sprzężonym

z tandemowym spektrometrem mas Orbitrap Velos. Wyniki LC-MS/MS, po bioinformatycznej, jakościowej i ilościowej analizie danych, pozwoliły na utworzenie list białek różnicowych.

Na podstawie danych MS wykazano, że OmpR, w określonych warunkach środowiska, reguluje pozytywnie lub negatywnie poziom 120 białek, w tym związanych pośrednio lub bezpośrednio z błoną zewnętrzną, które pełnią w komórce różnorodne funkcje. Wśród nich zidentyfikowano znane, opisane wcześniej, jak i nowe OmpR-zależne białka, w tym także charakterystyczne dla bakterii z rodzaju *Yersinia*. Białka różnicowe przyporządkowano do określonych kategorii procesów biologicznych, w których uczestniczą. Wykazano wpływ OmpR na szereg białek biorących udział w dyfuzji, transporcie aktywnym, czynnym usuwaniu substancji toksycznych, w utrzymaniu homeostazy żelazowej, a także organizacji błony zewnętrznej oraz patogenezie. Ocena zmian w składzie proteomu pozwoliła na określenie biologicznej funkcji OmpR u *Y. enterocolitica* i jego kluczowej roli w adaptacji do zmiennych warunków środowiska.

Zdefiniowany OmpR-zależny proteom stanowił punkt wyjścia do analiz *in silico* w celu identyfikacji sekwencji DNA wiążących OmpR. Potencjalne motywy wiązania białka OmpR wyznaczono w obrębie sekwencji regulatorowych genów *cycA*, *dcuA*, *fecA*, *fepA*, *hemR*, *kdgM2*, *myfC*, *ompW*, *scrY* i *yadA*, a także *acrA*, *fadL*, *ompC*, *ompF*, *ompX*, *tpdB*, które jako geny regulonu OmpR zidentyfikowano wcześniej u *E. coli* i *Salmonella*.

Do szczegółowych badań genetycznych i biochemicznych mających na celu poznanie mechanizmu OmpR-zależnej regulacji, wytypowano *yadA*, *hemR* oraz *kdgM2*, kodujące odpowiednio, czynnik wirulencji YadA warunkujący adhezję i oporność komórki na bakteriobójcze działanie surowicy, receptor HemR niezbędny dla przyswajania hemu, a także białko KdgM2, ortolog poryn specyficznych dla oligogalakturonianów (OGA) – produktów degradacji pektyn, u patogenów roślin, w tym *Dickeya dadantii*. Dla białka KdgM2 zanotowano ponad 100-krotny, tj. najwyższy parametr krotności zmiany, wśród OmpR-zależnych składników proteomu OM.

Badania nad rolą OmpR w regulacji ekspresji genów *YadA* i *HemR* rozpoczęto od analiz Western blot, które wykazały wyższy poziom obu białek w szczepie niesyntezującym regulatora OmpR i tym samym potwierdziły wyniki proteomiczne. Analizy aktywności promotorów wskazały, że białko OmpR negatywnie reguluje poziom ekspresji genów *yadA* i *hemR*. Badania opóźnienia tempa migracji kompleksów nukleoproteinowych w natywnym żelu poliakrylamidowym tzw. testy EMSA udowodniły, że OmpR-zależna regulacja transkrypcji *yadA* wynika z bezpośredniego oddziaływania regulatora ze specyficzną

sekwencją wiążącą. W przypadku *hemR* zaproponowano mechanizm, w którym OmpR negatywnie, ale pośrednio reguluje ekspresję *hemR*.

Punktem wyjścia do prac nad określeniem funkcji białka OmpR w regulacji ekspresji *kdgM2* były analizy bioinformatyczne sekwencji genomów bakterii. Pozwoliły one na zidentyfikowanie u *Y. enterocolitica* klastrów genów, charakterystycznych dla fitopatogenów, które są związane z transportem oraz depolimeryzacją produktów degradacji pektyn, w tym kodujących poriny KdgM2 i KdgM1, specyficzne dla OGA oraz regulator KdGR. Ponadto, analizy *in silico* wykazały brak genów zewnątrzkomórkowych enzymów pektynolitycznych, typowych dla patogenów roślin, co potwierdzono w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono szereg badań z wykorzystaniem skonstruowanych mutantów delecyjnych, fuzji reporterowych, RT-qPCR, SDS-PAGE oraz EMSA, które dowiodły, że OmpR wykazuje bezpośredni, ale odwrotny efekt regulatorowy na poziom białek KdgM2 i KdgM1, w wyniku negatywnej regulacji transkrypcji *kdgM2* oraz pozytywnej *kdgM1*. W toku badań ustalono także, że KdGR pełni funkcję represora genów szlaku pektynolizy, a regulator OmpR może wpływać na ekspresję *kdgM2* i *kdgM1*, w sposób pośredni, poprzez negatywną regulację transkrypcji genu *kdgR*.

Dodatkowo, badania biologicznej funkcji KdgM2 pozwoliły wnioskować o znaczeniu tego białka w przepuszczalności błony zewnętrznej *Y. enterocolitica*.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska stanowi pierwszą, kompleksową charakterystykę roli regulatora OmpR w modulowaniu proteomu błony zewnętrznej *Y. enterocolitica*. Zidentyfikowano nieznane wcześniej geny regulonu OmpR i wykazano, że OmpR regulując ich transkrypcję (pozytywnie lub negatywnie) pełni ważną rolę adaptacyjną. Prezentowane wyniki sugerują, że OmpR jako integrator wielu komórkowych procesów, może decydować o wyborze strategii życiowej *Y. enterocolitica*, związanej z saprofityczną lub patogenną formą życia bakterii.