

**Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Mikrobiologii**

**Rozprawa doktorska**

**BIĄŁKO DRAD UROPATOGENNYCH SZCZEPÓW  
*ESCHERICHIA COLI* DR<sup>+</sup> - MECHANIZM  
TRANSPORTU NA POWIERZCHNIĘ KOMÓRKI I  
ROLA W PROCESIE POLIMERYZACJI STRUKTUR  
FIMBRIALNYCH**

**mgr inż. Katarzyna Bury**

**prof. dr hab. Józef Kur**

**Gdańsk, 2008**

*Piotrowi i moim Rodzicom*

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi panu profesorowi Józefowi Kur za przekazanie mi tematu pracy, cennej i bogatej wiedzy oraz doświadczenia naukowego. Dziękuję bardzo za opiekę, udzieloną mi pomoc oraz wskazówki merytoryczne, przydatne w czasie powstawania i redagowania niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję za niezwykle życzliwość i wyrozumiałość.*

*Dziękuję także wszystkim koleżankom i kolegom z Katedry Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy.*

*Piotrowi za wsparcie, nieocenioną pomoc, pogodę ducha i optymizm.*

*Za trud wykształcenia i wiarę we mnie moim Rodzicom.*

# SPIS TREŚCI

<b>OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>6</b>
<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>7</b>
<b>CEL PRACY</b> .....	<b>10</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>11</b>
1.1. Wprowadzenie.....	11
1.2. Inwazja komórek nabłonkowych dróg moczowych przez uropatogenne szczepy <i>E. coli</i> ekspresyjne fimbrie typu Dr.....	13
1.3. Rodzina inwazyj AfaD-podobnych.....	17
1.4. Sekrecja czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych .....	19
1.4.1. Transport białek przez błonę wewnętrzną z wykorzystaniem systemu sekrecji Sec.....	21
1.4.2. Szlak sekrecji typu I .....	24
1.4.3. Szlak sekrecji typu II .....	26
1.4.4. Szlak sekrecji typu III .....	30
1.4.5. Szlak sekrecji typu IV.....	32
1.4.6. Szlak sekrecji typu V (autotransportery).....	33
1.4.7. Szlak sekrecji „chaperone/usher” .....	35
<b>2. MATERIAŁY</b> .....	<b>39</b>
2.1. Szczepy bakteryjne .....	39
2.2. DNA .....	39
2.3. Podłoża.....	42
2.4. Antybiotyki .....	42
2.5. Odczynniki i roztwory .....	42
2.6. Roztwory do elektroforezy agarozowej.....	42
2.7. Roztwory do elektroforezy poliakrylamidowej.....	43
2.8. Materiały do izolacji ultraczystego plazmidowego DNA.....	44
2.9. Materiały do izolacji genomowego DNA .....	45
2.10. Roztwory do izolacji fragmentu DNA z żelu agarozowego .....	45
2.11. Enzymy i bufony reakcyjne.....	45
2.12. Bufory i odczynniki do reakcji PCR .....	46
2.13. Odczynniki do mutagenezy miejscowo-specyficznej .....	48
2.14. Odczynniki do nokautu genowego .....	48
2.15. Materiały do przygotowania komórek kompetentnych.....	49
2.16. Bufory i odczynniki do techniki Western blotting .....	49
2.17. Odczynniki do izolacji białek podjednostkowych DraE fimbrii Dr ekspresyjnych na powierzchni komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów <i>E. coli</i> .....	51
2.18. Bufory i odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej.....	51



2.19. Odczynniki do hodowli linii komórkowej HeLa.....	52
2.20. Odczynniki i materiały stosowane w barwieniu metodą Giemsy.....	52
2.21. Aparatura .....	52
<b>3. METODY .....</b>	<b>54</b>
3.1. Hodowle bakteryjne.....	54
3.2. Izolacja plazmidowego DNA.....	54
3.3. Izolacja genomowego DNA.....	54
3.4. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego .....	54
3.5. Elektroforeza agarozowa .....	54
3.6. Konstrukcja plazmidu pCC90DraCmut (mutageneza ukierunkowana) .....	55
3.7. Określenie obecności operonu <i>gsp</i> w szczepach <i>E. coli</i> .....	56
3.8. Nokaut genu <i>gspD</i> laboratoryjnego szczepu <i>E. coli</i> BL21(DE3) i klinicznego szczepu <i>E. coli</i> DR14 z wykorzystaniem intronu RNA grupy II.....	56
3.8.1. Modyfikacja fragmentu intronu grupy II przy użyciu reakcji PCR .....	57
3.8.2. Modyfikacja fragmentu intronu grupy II w celu wprowadzenia promotora <i>spc</i> .....	58
3.8.3. Trawienie zmodyfikowanego fragmentu intronu przy użyciu enzymów restrykcyjnych HindIII oraz BsrGI .....	59
3.8.4. Reakcja ligacji zmodyfikowanego fragmentu intronu RNA z wektorem pACD4K-C-loxP .	59
3.8.5. Transformacja komórek <i>E. coli</i> BL21(DE3) przy użyciu DNA mieszaniny ligacyjnej i ekspresja intronu RNA grupy II .....	60
3.8.6. Transformacja komórek <i>E. coli</i> DR14 przy użyciu DNA mieszaniny ligacyjnej i ekspresja intronu RNA grupy II .....	61
3.8.7. Amplifikacja DNA kodującego fragment genu <i>gspD</i> szczepów <i>E. coli</i> BL21(DE3), IH11128 oraz DR14.....	62
3.9. Konstrukcja plazmidu pET30gspD.....	62
3.9.1. Amplifikacja DNA genu <i>gspD</i> .....	62
3.9.2. Trawienie fragmentów DNA enzymami restrykcyjnymi SphI i HindIII .....	63
3.9.3. Reakcja ligacji DNA wektora pET30b+ z DNA insertu otrzymanego przez amplifikację DNA genu <i>gspD</i> .....	64
3.10. Transformacja komórek <i>E. coli</i> plazmidowym DNA.....	64
3.11. Produkcja białka inwazy DraD z sekwencją sygnałną w szczepie <i>E. coli</i> BL21(DE3)	65
3.12. Produkcja zewnątrz błonowego białka GspD w szczepie <i>E. coli</i> BL21(DE3)gspDmut i DR14gspDmut.....	65
3.13. Produkcja natywnych fimbrii Dr oraz natywnego białka inwazy DraD w szczepie <i>E. coli</i> BL21(DE3) oraz BL21(DE3)gspDmut.....	65
3.14. Produkcja natywnego białka inwazy DraD w klinicznym szczepie <i>E. coli</i> DR14, DR14gspDmut oraz DR14gspDmut-(pET30gspD).....	66
3.15. Produkcja rekombinazy Cre w szczepie <i>E. coli</i> BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut ..	66

3.16. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.....	66
3.17. Detekcja białek rekombinantowych metodą Western blotting .....	67
3.18. Izolacja białka podjednostkowego adhezyny DraE fimbrii Dr .....	69
3.19. Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów <i>E. coli</i> eksprymujących fimbrie Dr oraz białko inwazyny DraD .....	69
3.20. Badanie adhezji komórek <i>E. coli</i> do komórek linii HeLa .....	71
3.21. Precypitacja frakcji supernatantów .....	71
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>73</b>
4.1. Określenie roli kanałotwórczego białka DraC w transporcie białka DraD na powierzchnię komórek <i>E. coli</i> .....	73
4.1.1. Konstrukcja plazmidu rekombinantowego zawierającego operon <i>dra</i> ze zmutowanym genem <i>draC</i> (pCC90DraCmut) .....	73
4.1.2. Badanie sekrecji białka DraD w różnych szczepach rekombinantowych <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	75
4.2. Zdefiniowanie roli białka DraD w biogenezie fimbrii Dr zbudowanych z podjednostek białka DraE .....	77
4.2.1. Immunoidentyfikacja białka adhezyny DraE metodą Western blotting .....	78
4.2.2. Immunodetekcja białka inwazyny DraD oraz adhezyny DraE z wykorzystaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej.....	80
4.3. Zdefiniowanie roli systemu sekrecji typu II w procesie transportu białka DraD na powierzchnię komórek <i>E. coli</i> Dr <sup>+</sup> .....	81
4.3.1. Identyfikacja operonu <i>gsp</i> w badanych szczepach <i>E. coli</i> .....	82
4.3.2. Identyfikacja rodzaju genów <i>gspD</i> w badanych szczepach <i>E. coli</i> .....	84
4.3.3. Konstrukcja nokautowych szczepów w genie <i>gspD</i> ( <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>gspD</i> mut oraz DR14 <i>gspD</i> mut).....	88
4.3.4. Określenie roli zewnątrz błonowego, kanałotwórczego białka GspD, w transporcie inwazyny DraD na powierzchnię komórek <i>E. coli</i> eksprymujących fimbrie typu Dr ( <i>E. coli</i> Dr <sup>+</sup> ) .....	93
4.3.5. Komplementacja <i>in trans</i> zmutowanego genu <i>gspD</i> i określenie zdolności transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej.....	99
<b>5. DYSKUSJA I WNIOSKI KOŃCOWE.....</b>	<b>112</b>
<b>6. DOROBEK NAUKOWY. GRANTY.....</b>	<b>119</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>122</b>

## OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>ang.</b>	z angielskiego
<b>ATP</b>	adenozynotrifosforan
<b>CFU</b>	jednostka tworząca kolonię (ang. <u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit)
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAB</b>	3,3' diaminobenzodyna
<b>DAF</b>	ang. <u>D</u> ecay- <u>A</u> ccelerating <u>F</u> actor
<b>DNA</b>	kwask deoksyrybonukleinowy
<b>EDTA</b>	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
<b>FITC</b>	izotiocyanian fluoresceiny (ang. <u>F</u> luorescein <u>I</u> so <u>T</u> hio <u>C</u> yanate, Isomer I)
<b>GSP</b>	główny szlak sekrecji (ang. <u>G</u> eneral <u>S</u> ecretory <u>P</u> athway)
<b>IEP</b>	białko kodowane przez intron (ang. <u>I</u> ntron <u>E</u> ncoded <u>P</u> rotein)
<b>Ig</b>	immunoglobulina
<b>IM</b>	błona wewnętrzna (ang. <u>I</u> nnner <u>M</u> embrane)
<b>IPTG</b>	izopropyl-β-D-tiogalaktozyd
<b>IU</b>	jednostka międzynarodowa (ang. <u>I</u> nternational <u>U</u> nit)
<b>M</b>	stężenie molowe [mol/dm <sup>3</sup> ]
<b>MCS</b>	miejsce wielokrotnego klonowania (ang. <u>M</u> ultiply <u>C</u> loning <u>S</u> ite)
<b>OM</b>	błona zewnętrzna (ang. <u>O</u> uter <u>M</u> embrane)
<b>PBS</b>	ang. <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
<b>PCR</b>	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
<b>pz</b>	par zasad
<b>SDS</b>	sól sodowa siarczanu dodecyłu
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z użyciem SDS (ang. <u>S</u> DS- <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
<b>RBS</b>	miejsce wiązania RNA (ang. <u>R</u> NA <u>B</u> inding <u>S</u> ite)
<b>RNA</b>	kwask rybonukleinowy
<b>RNP</b>	kompleks RNA-białko (ang. <u>R</u> NA- <u>P</u> rotein complex)
<b>T1SS</b>	szlak sekrecji typu I (ang. <u>T</u> ype <u>I</u> <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem)
<b>T2SS</b>	szlak sekrecji typu II (ang. <u>T</u> ype <u>II</u> <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem)
<b>T3SS</b>	szlak sekrecji typu III (ang. <u>T</u> ype <u>III</u> <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem)
<b>TBS-T</b>	ang. <u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline- <u>T</u> ween
<b>Tris</b>	tris[hydroksymetylo]aminometan
<b>TRITC</b>	izotiocyanian tetrametylorodaminy (ang. <u>T</u> etramethyl <u>R</u> hodamine <u>I</u> so <u>T</u> hio <u>C</u> yanate)
<b>UPEC</b>	uropatogenne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <u>U</u> ro <u>P</u> athogenic <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli)
<b>UTI</b>	zakażenia dróg moczowych (ang. <u>U</u> rinary <u>T</u> ract <u>I</u> nfections)

## STRESZCZENIE

Zakażenia bakteryjne układu moczowego należą do coraz poważniejszych problemów społecznych szczególnie w krajach wysoce rozwiniętych. Szacuje się, iż schorzenia związane z układem moczowym są przyczyną około 6% wszystkich porad lekarza ogólnego. Głównymi czynnikami etiologicznymi (80%) wywołującymi infekcje układu moczowego u ludzi są szczepy *Escherichia coli*. Szczepy *E. coli* ekspresyjujące fimbrie typu Dr stanowią istotny element w patogenezie zakażeń górnych dróg moczowych. Są one przyczyną infekcji u ok. 50% dzieci chorujących na UTI oraz u 30% kobiet ciężarnych cierpiących na odmiedniczkowe zapalenie nerek. Białka zaangażowane w biogenezę fimbrii Dr kodowane są przez operon *dra* złożony z sześciu otwartych ramek odczytu (ORF): *draA*, *draB*, *draC*, *draD*, *draP* i *draE*. Geny *draD* i *draE* kodują dwa najważniejsze czynniki wirulencji: inwazyję DraD oraz adhezynę DraE.

Celem prowadzonych badań było określenie drogi transportu białka DraD na powierzchnię komórek bakteryjnych *E. coli* ekspresyjujących fimbrie typu Dr (*E. coli* Dr<sup>+</sup>) oraz zdefiniowanie roli białka DraD w procesie biogenezy fimbrii Dr zbudowanych z podjednostek białka DraE.

Pierwszy etap badań obejmował konstrukcję plazmidu pCC90DraCmut, niosącego operon *dra* z mutacją w obrębie genu *draC*. Uzyskany plazmid rekombinantowy wykorzystany został następnie w doświadczeniach mających na celu określenie roli zewnątrzłonowego, kanałotwórczego białka DraC w transporcie inwazyjny DraD na powierzchnię komórek *E. coli*. W eksperymencie wykorzystano również rekombinantowe szczepy *E. coli* transformowane odpowiednimi plazmidami, pochodnymi pCC90 (plazmid zawierający cały operon *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych), zawierającymi mutacje w obrębie genów *draD* (pCC90DraDmut) oraz *draE* (pCC90D54stop). Obecność białek inwazyjny DraD oraz adhezyny DraE na powierzchni komórek bakteryjnych identyfikowano przy użyciu technik mikroskopii immunofluorescencyjnej oraz immunoblottingu z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał specyficznych odpowiednio dla białka DraD oraz DraE. Równocześnie przeprowadzone zostały badania z wykorzystaniem plazmidów pochodnych pBJN406, obejmującego cały operon *dra* wraz z regionem promotorowym i genami regulatorowymi, zawierających insercje transpozony w obrębie genów *draD* (pBN4), *draE* (pBN17) oraz *draC* (pBN417). Przeprowadzono również doświadczenia ekspresji genu kodującego periplazmatyczną formę białka

DraD w rekombinantowych szczepach *E. coli*, w układach bez obecności adhezyny DraE, białka opiekuńczego DraB oraz zewnątrz błonowego białka DraC. Stwierdzono obecność białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* ekspresyjnych całego operonu *dra* (kontrola pozytywna) oraz w przypadku szczepów rekombinantowych niosących operon *dra* z wyłączoną funkcją genu *draE* oraz *draC*. Powierzchniową obecność białka DraD zaobserwowano również w rekombinantowym szczepie *E. coli* produkującym jedynie periplazmatyczną formę białka DraD. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na transport białka DraD na powierzchnię komórki bez udziału zewnątrz błonowego białka DraC. Jednocześnie, w eksperymentach na szczepach niosących operon *dra* z mutacją w obrębie genu *draD*, wykluczona została rola białka DraD w biogenezie fimbrii typu Dr. Obserwowany poziom ekspresji fimbrii Dr w komórkach *E. coli* transformowanych odpowiednio plazmidem pCC90, niosącym funkcjonalny operon *dra* i pCC90DraDmut (brak ekspresji genu *draD*), był na tym samym poziomie, natomiast w komórkach transformowanych plazmidem pCC90D54stop (brak ekspresji genu *draE*) stwierdzono produkcję tylko białka DraD, co świadczy o niezależnej sekrecji obu tych białek na powierzchnię komórek bakteryjnych.

Kolejny etap badań obejmował zdefiniowanie roli systemu sekrecji typu II w procesie transportu białka DraD na powierzchnię komórek *E. coli* ekspresyjnych fimbrii typu Dr. W tym celu, przy wykorzystaniu techniki nokautu genowego, na bazie laboratoryjnego szczepu *E. coli* BL21(DE3) oraz klinicznego szczepu *E. coli* DR14 (niosącego operon *dra* z wyłączoną funkcją genu *draC*), skonstruowano szczepy *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut posiadające insercję (w postaci intronu grupy II) w obrębie genu *gspD* kodującego zewnątrz błonowe białko kanałowe, stanowiące ważny element szlaku sekrecji typu II. Obecność białek inwazyjnych DraD oraz adhezyny DraE na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)gspDmut transformowanych odpowiednimi plazmidami (układy z funkcjonalnym operonem *dra* bądź z wyłączoną funkcją genu *draD*, *draE* lub *draC*) oraz na powierzchni szczepu *E. coli* DR14gspDmut, testowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał specyficznych odpowiednio dla białka DraD oraz DraE. W celu określenia obecności białka DraD na powierzchni komórek bakteryjnych przeprowadzono również doświadczenia wykorzystujące zdolność rekombinantowych szczepów *E. coli* syntetyzujących białko DraD, do adhezji do komórek linii HeLa (receptor  $\alpha_5\beta_1$  rozpoznawany przez białko

DraD). Stwierdzono brak obecności białka DraD na powierzchni analizowanych szczepów bakteryjnych.

W celu potwierdzenia zdolności do transportu białka DraD poprzez system sekrecji typu II, przeprowadzono eksperymenty komplementacji *in trans* zmutowanego genu *gspD* w analizowanych szczepach bakteryjnych *E. coli*. W tym celu skonstruowano plazmid pET30gspD, zawierający w swojej sekwencji gen kodujący zewnątrzłonowe białko kanałowe GspD. Komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD) transformowane odpowiednimi plazmidami analizowano następnie przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej. Stwierdzono obecność białka inwazyjnego DraD na powierzchni komórek *E. coli* w przypadku szczepów rekombinantowych niosących operon *dra* z wyłączoną funkcją genu *draE* oraz *draC*. Wymienione rekombinantowe szczepy bakteryjne wykazywały również zdolność adhezji do komórek linii HeLa.

Analizie poddano również wyizolowane frakcje periplazmatyczne i pożywkę pochodzącą po odwirowaniu komórek badanych szczepów syntetyzujących białko DraD. Stwierdzono obecność białka DraD w periplazmie i pożywce pochodzącej w szczepie *E. coli* niosącym funkcjonalny operon *dra* (pCC90) oraz w szczepach *E. coli* niosących plazmidy ze zmutowanym genem *draE* (pCC90D54stop) oraz *draC* (pCC90DraCmut). Uzyskane wyniki wskazują na możliwość komplementacji *in trans* zmutowanego genu *gspD* przez plazmid pET30gspD, skutkiem czego jest przywrócenie funkcjonalności systemu sekrecji typu II i transport białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej za pośrednictwem tego systemu sekrecji.

## **CEL PRACY**

Celem prowadzonych badań było określenie drogi transportu białka DraD na powierzchnię komórek bakteryjnych *E. coli* ekspresujących fimbrie typu Dr (*E. coli* Dr<sup>+</sup>) oraz zdefiniowanie roli białka DraD w procesie biogenezy fimbrii Dr zbudowanych z podjednostek białka DraE.

# 1. WSTĘP

## 1.1. Wprowadzenie

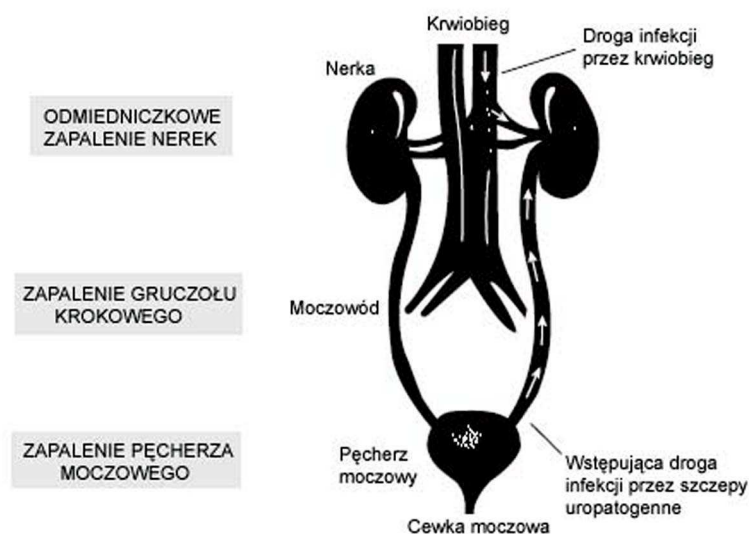
Zakażenia dróg moczowych (ang. Urinary Tract Infections – UTI) stanowią poważny problem zdrowotny, który każdego roku obejmuje miliony ludzi na całym świecie. Infekcje tego typu są chorobami występującymi najczęściej w każdej populacji i w każdym wieku. Szacuje się, iż schorzenia związane z układem moczowym są przyczyną około 6% wszystkich porad lekarza ogólnego (Książek i Rutkowski, 2004). W samych Stanach Zjednoczonych częstość występowania tego typu schorzeń wynosi około 6 milionów przypadków rocznie, zaś koszty z tym związane przekraczają miliard dolarów (Orłowski, 1998). Ponadto, według statystyk amerykańskich, infekcje te są najczęstszą przyczyną niezdolności kobiet do pracy w wieku produkcyjnym, a u 40-60% występują co najmniej raz w życiu (Książek i Rutkowski, 2004). W wielu przypadkach zakażeń, bakterie uropatogenne pochodzą z flory jelitowej i wywołują zakażenia drogą wstępującą, poprzez cewkę moczową wywołując tymczasowe zapalenie okołocewkowe (**Rysunek 1**) (Sobel, 1997; Muhldorfer i wsp., 2001). Dlatego tak ważna jest prawidłowa profilaktyka i właściwa terapia zakażeń układu moczowego, która może przyczynić się do obniżenia wskaźnika zachorowań i zmniejszenia kosztów związanych z leczeniem.

Bakteryjne zakażenia dróg moczowych wywołują u gospodarza złożoną reakcję obronną polegającą na zwiększeniu przepływu moczu oraz pojawieniu się wielu czynników antybakteryjnych. Efektywna kolonizacja i zakażenie tkanek zwierzęcych przez bakterie uropatogenne zachodzi dzięki skutecznym mechanizmom umożliwiającym adhezję, inwazję oraz przetrwanie wewnątrz komórek gospodarza.

Infekcje dróg moczowych mogą wywoływać różne objawy kliniczne, z których najczęstszymi są zapalenie pęcherza moczowego, odmiedniczkowe zapalenie nerek oraz zapalenie gruczołu krokowego. Zapalenie pęcherza moczowego występuje w 95% przypadków zachorowań i objawia się bolesnym i trudnym oddawaniem moczu, nagłymi potrzebami oddawania moczu i niekiedy nadłonowym bólem. Przy odmiedniczkowym zapaleniu nerek występują: gorączka, mdłości, wymioty, bóle w boku, pocenie się i ogólne złe samopoczucie. Dodatkowo mogą pojawić się objawy związane z zapaleniem pęcherza moczowego. W około 30% przypadków ostrego odmiedniczkowego zapalenia nerek występują powikłania w postaci bakteriemii, która może prowadzić do posocznicy (Muhldorfer i wsp., 2001). Większość infekcji



dróg moczowych (ponad 80%) wywołwana jest przez uropatogenne szczepy *E. coli* (ang. Uropathogenic E*sch*erichia coli – UPEC) (Svanborg i Godaly, 1997).



**Rys.1.** Budowa układu moczowego. Uropatogeny infekujące układ moczowy drogą wstępującą wędrują przez cewkę moczową, kolonizują pęcherz moczowy i mogą przemieszczać się przez moczowód do nerek. Infekcje, podczas których uropatogen przemieszcza się z krwioobiegu do nerek, zdarzają się rzadko.

Uropatogenne szczepy *E. coli* są grupą bakterii zróżnicowaną pod względem genetycznym oraz pod względem zdolności do kolonizacji i przetrwania wewnątrz komórek nabłonkowych pęcherza oraz wewnątrz komórek nerek (Foxman i wsp., 1995). Epidemiologiczne badania z wykorzystaniem linii komórkowych wskazują na to, że wiele czynników wirulencji wytwarzanych przez UPEC może regulować zdolność bakterii do inwazji układu moczowego. Czynniki te są zazwyczaj kodowane na chromosomie bakteryjnym i stanowią często fragment dużych, niestabilnych regionów chromosomalnych, nazywanych wyspami patogenności (Muhldorfer i wsp., 2001). Najważniejszymi czynnikami patogenności bakterii wywołujących zakażenia dróg moczowych są:

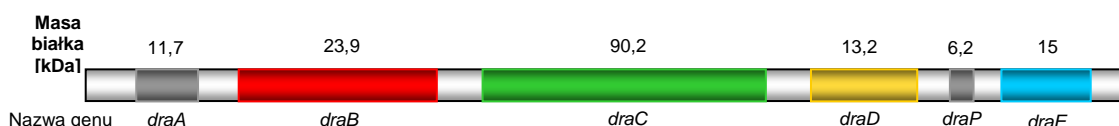
- 1) adhezyny, warunkujące przyleganie bakterii do komórek nabłonkowych i równocześnie zapobiegające szybkiemu wymywaniu bakterii z pęcherza przez przepływający mocz;
- 2) inwazyjne, umożliwiające mikroorganizmom internalizację komórek gospodarza.

Przeprowadzone badania dowodzą, że bakterie uropatogenne mają zdolność inwazji, a jednocześnie uwalniania się z komórek nabłonkowych pęcherza. Ta umiejętność może umożliwiać uropatogenom namnażanie się i uwalnianie z komórek nabłonkowych pęcherza przed zakończeniem procesu złuszczenia zainfekowanych komórek nabłonkowych. Warunkuje to również rozprzestrzenianie się bakterii w drogach moczowych i zabezpiecza bakterie przed wrodzonymi i adaptacyjnymi mechanizmami obronnymi gospodarza. Ponadto, złuszczenie się komórek nabłonkowych pęcherza moczowego może nie dotyczyć komórek urotelium, które stają się w ten sposób bardziej podatne na infekcje bakteryjne. W tych warstwach nabłonkowych bakterie mogą przetrwać w stanie biernym stanowiąc źródło nawracających infekcji dróg moczowych (Gaillard i wsp., 1991).

## 1.2. Inwazja komórek nabłonkowych dróg moczowych przez uropatogenne szczepy *E. coli* ekspresyjące fimbrie typu Dr

Szczepy *E. coli* wykazujące powierzchniową ekspresję fimbrii typu Dr, są jedną z najszerzej rozpowszechnionych grup drobnoustrojów powodujących kolonizację dróg moczowych oraz końcowego odcinka układu pokarmowego.

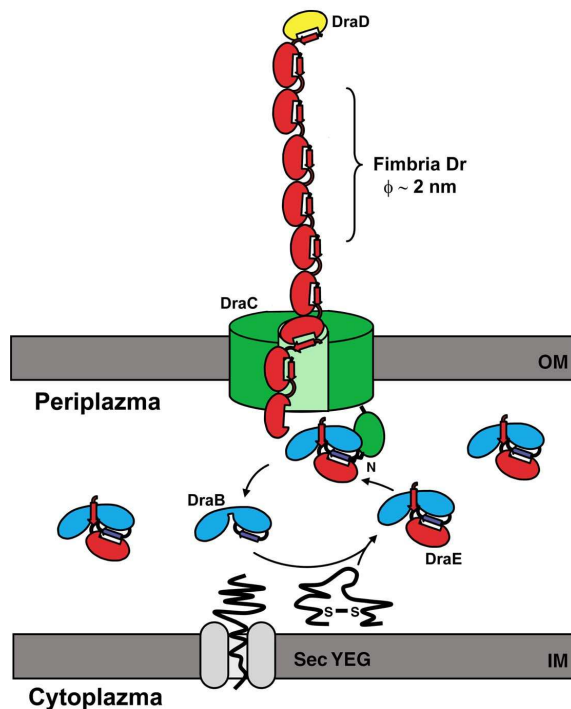
Operon *dra* kodujący fimbrie Dr posiada sześć otwartych ramek odczytu (ORF): *draA*, *draB*, *draC*, *draD*, *draP* i *draE* (**Rysunek 2**) (Garcia i wsp., 1994). Geny operonu *dra* kodują białka odpowiedzialne za regulację transkrypcji operonu (DraA i DraP), białka zaangażowane w biosyntezę fimbrii (periplazmatyczne białko opiekuńcze DraB, zewnątrzblonowe białko DraC będące miejscem polimeryzacji fimbrii) oraz czynniki adhezyjne i inwazyjne (podjednostka fimbrialna DraE i inwazyjna DraD) warunkujące internalizację bakterii *E. coli* Dr<sup>+</sup> do wnętrza komórek nabłonkowych dróg moczowych (Nowicki i wsp., 2001).



**Rys.2.** Schemat operonu *dra* kodującego fimbrie Dr.

Fimbrie typu Dr to homopolimeryczne struktury o średnicy ok. 2 nm, zbudowane z podjednostkowego białka DraE, pełniącego jednocześnie funkcję adhezyjną poprzez rozpoznawanie receptora DAF (ang. Decay-Accelerating Factor), zlokalizowanego na powierzchni komórek nabłonkowych i erytrocytów. Na szczycie

polimeru fimbrialnego znajduje się białko DraD, wchodzące w interakcje z receptorem integryny  $\alpha_5\beta_1$  (Plancon i wsp., 2003; Zalewska-Piątek i wsp., 2008). Proces poprawnego fałdowania adhezyny DraE, do postaci zdolnej do polimeryzacji, zachodzi w periplazmie. Możliwy jest on dzięki obecności periplazmatycznego białka opiekuńczego DraB, które równocześnie chroni podjednostkę DraE przed rozkładem proteolitycznym (system proteaz DegP) (Piątek i wsp., 2005) (**Rysunek 3**).



**Rys.3.** Schemat biogenezy fimbrii Dr uropatogennych szczepów *E. coli* Dr<sup>+</sup>.

Białko DraB, należące do rodziny białek opiekuńczych, zbudowane jest z dwóch globularnych domen (domena N- i C-terminalna). Obie domeny wykazują strukturę  $\beta$ -beczki złożonej z dwóch anty-równoległych  $\beta$ -kartek. Topologia każdej z domen jest identyczna i składa się z 7 anty-równoległych  $\beta$ -harmonijek (oznaczonych od  $\beta$ A do  $\beta$ G). W procesie tworzenia kompleksów z podjednostkami fimbrialnymi bierze udział N-terminalna domena „chaperonu” DraB (Piątek i wsp., 2005).

W przypadku podjednostki fimbrialnej DraE, mamy do czynienia ze strukturą immunoglobulino-podobną (Ig-podobną), posiadającą jedynie 6  $\beta$ -harmonijek (brak  $\beta$ -harmonijki G). Efektem tego jest brak zdolności do samodzielnego tworzenia struktury natywnej. Periplazmatyczne białko DraB posiada w swojej strukturze specyficzną  $\beta$ -harmonijkę donorową G1, której funkcja polega na uzupełnieniu struktury Ig-podobnej białka DraE.  $\beta$ -harmonijka donorowa „chaperonu” oddziałuje

bezpośrednio z C-terminalną  $\beta$ -harmonijką F podjednostki fimbrialnej, która nosi nazwę  $\beta$ -harmonijki akceptorowej. W efekcie tego procesu podjednostka zyskuje stabilną strukturę immunoglobulino-podobną składającą się z 7  $\beta$ -harmonijek. Reakcja tworzenia kompleksu podjednostka fimbrialna - białko opiekuńcze nosi nazwę reakcji komplementacji nici donorowej. Stabilny w periplazmie kompleks DraB-DraE migruje do zlokalizowanego w błonie zewnętrznej białka kanałotwórczego DraC, stanowiącego miejsce polimeryzacji fimbrii. Tam w specyficznym środowisku tworzonym przez białko DraC następuje proces polimeryzacji kolejnych podjednostek DraE w strukturę fimbrialną (Piątek i wsp., 2005). W procesie tworzenia polimeru bierze udział nieustrukturyzowana N-terminalna nić białka podjednostkowego, swobodnie „wystająca” ze struktury Ig podjednostki i wypierająca białko „chaperonu” z oddziaływania z drugą podjednostką fimbrialną, znajdującą się z nim w kompleksie (Normark, 2000). W efekcie struktura Ig podjednostki fimbrialnej zostaje uzupełniona przez N-terminalną sekwencję pochodzącą z innej podjednostki poprzez mechanizm donorowej wymiany nici, pełniąc dokładnie tą samą funkcję, co donorowa  $\beta$ -harmonijka G1 „chaperonu” (Sauer i wsp., 2000; Thanassi i wsp., 2000).

Bardzo specyficzną własnością fimbrii Dr jest ich zdolność do wiązania drugiego receptora - kolagenu typu IV, który jest zlokalizowany w błonie podstawnej nabłonka dróg moczowych (Van Loy i wsp., 2002). Własność ta, charakterystyczna tylko dla białka DraE w obrębie całej rodziny Dr, powoduje, że komórki szczepów *E. coli* ekspresujących fimbrie Dr po inwazji są bardzo trudne do wyeliminowania przez układ immunologiczny oraz stosowane chemoterapeutyki. Szczepy te są klasycznym przykładem bakterii wywołujących chroniczne infekcje górnych dróg moczowych, głównie odmiedniczkowe zapalenie nerek (ang. pyelonephritis), poddające się bardzo trudno procesowi leczenia. U kobiet ciężarnych istnieje ponad 50% prawdopodobieństwo rozwoju odmiedniczkowego zapalenia nerek, co znacznie zwiększa ryzyko przedwczesnego porodu, może być również przyczyną opóźnienia rozwoju płodu, uszkodzenia nerek, obniżenia odporności immunologicznej, a także małej masy urodzeniowej dziecka (Książek i Rutkowski, 2004). Związane jest to ze zwiększoną produkcją progesteronu (wytwarzanego w czasie ciąży przez łożysko i ciało żółte), co powoduje ekspresję większej liczby receptora komórkowego DAF. Obecność tej glikoproteiny z jednej strony chroni płód przed cytotoksycznym działaniem układu dopełniacza, jednak z drugiej strony warunkuje wzrost liczby

receptora dla adhezyn Dr, co ułatwia bakteriom adhezję i kolonizację układu moczowego (Orłowski, 1998; Connolly i wsp., 1999).

Wirulencja bakterii *E. coli* ekspresujących fimbrie Dr potwierdzona została na modelu zwierzęcym, w którym badano myszy C3/HeJ ze śródmiąższowym zapaleniem nerek. Bakterie *E. coli* Dr<sup>+</sup> wykazują zdolność kolonizacji tkanki nerki przez 1 rok, podczas gdy izogeniczny mutant Dr jest eliminowany z nerek u 50% zwierząt w ciągu 20 tygodni, a po 32-52 tygodniach eliminowany jest całkowicie. Komplementacja mutantu Dr<sup>-</sup> plazmidem zawierającym operon *dra* przywraca zdolność do wywoływania trwałych infekcji.

Bakterie *E. coli* ekspresujące fimbrie Dr wykazują zdolność do inwazji komórek nabłonkowych linii HeLa. Inwazja jest skutecznym sposobem chroniącym bakterie przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Proces ten prawdopodobnie przyczynia się również do wywoływania chronicznych infekcji układu moczowego przez bakterie *E. coli* ekspresujące fimbrie Dr (Nowicki i wsp., 2001). Zdolność inwazji komórek nabłonkowych linii HeLa posiadają zarówno szczepy kliniczne *E. coli* Dr<sup>+</sup> (IH11128) oraz rekombinantowe szczepy *E. coli* BN406 niosące cały operon *dra*. Zdolności tej nie wykazują natomiast bakterie niosące plazmidy rekombinantowe zawierające insercyjne mutacje transpozonowe w obrębie poszczególnych genów operonu *dra* (Goluszko i wsp., 1999). Szczepy *E. coli* BN17 (mutacja w genie *draC*), *E. coli* BN418 (mutacja w genie *draD*), *E. coli* BN417 (mutacja w genie *draC*) oraz *E. coli* BN413 (mutacja w genie *draB*) (Carnoy i wsp., 1997) nie wykazują zdolności inwazji komórek nabłonkowych linii HeLa (Goluszko i wsp., 1999). Szczep bakteryjny *E. coli* BN418 wykazuje słabą aktywność hemaglutynacyjną oraz ulega adhezji do komórek linii HeLa (4-5 komórek bakteryjnych na komórkę linii HeLa).

W wyniku komplementacji mutacji w genach operonu *dra* przez wprowadzony do komórek plazmid rekombinantowy pBJN406 niosący cały operon *dra*, przywrócona zostaje zdolność inwazji komórek linii HeLa przez badane szczepy bakteryjne. Powyższe wyniki sugerują bezpośrednie zaangażowanie białek DraE, DraB, DraC i DraD w proces inwazji bakterii *E. coli* Dr<sup>+</sup> do wnętrza komórek nabłonkowych (Goluszko i wsp., 1997b).

W wyniku adhezji komórek *E. coli* Dr<sup>+</sup> do komórek nabłonkowych następuje akumulacja receptora DAF oraz przegrupowanie białek cytoszkieletu, dostarczające siły motorycznej dla procesu inwazji. Zaobserwowano również polimeryzację aktyny i

$\alpha$ -aktyliny w miejscach adhezji bakterii *E. coli* Dr<sup>+</sup>, występujące w czasie 15 minut od momentu zainfekowania komórek linii HeLa. Ilość występujących agregatów aktyny jest proporcjonalna do liczby bakterii związanych z powierzchnią komórek nabłonkowych i wzrasta w czasie trwania infekcji. W miejscach adhezji zaobserwowano również agregację erazyny zaangażowanej w łączenie filamentów aktyny z receptorami błonowymi.

Wyniki badań zdolności inwazji bakterii *E. coli* Dr<sup>+</sup> do wnętrza komórek nabłonkowych linii HeLa sugerują, że interakcja podjednostek fimbrialnych Dr z receptorem komórkowym DAF jest wystarczająca do wywołania procesu inwazji komórki bakteryjnej. W celu udowodnienia tej hipotezy przeprowadzono dodatkowe doświadczenia z zastosowaniem kuleczek polistyrenowych opłaszczonych oczyszczonymi białkami fimbrii Dr, które po inkubacji z komórkami linii HeLa ulegają adhezji do mikrokosmków komórkowych, co ostatecznie pozwala na ich inwazję do wnętrza komórek. W miejscach adhezji kuleczek polistyrenowych zaobserwowano również akumulację receptora DAF i polimeryzację aktyny (Goluszko i wsp., 1997b; 1999).

### 1.3. Rodzina inwazyn AfaD-podobnych

Rodzina inwazyn AfaD jest strukturalnie i funkcjonalnie zakonserwowana. Stopień zakonserwowania genów *afaD* został określony poprzez sekwencjonowanie genów *afaD1*, *afaD2*, *afaD5*, *draD* oraz *daaD* i porównaniu uzyskanych sekwencji z opublikowaną sekwencją nukleotydową genu *afaD* kodowanego przez operon *afa3* (Isberg i wsp., 1995). Przeprowadzone analizy wykazały wysoki stopień identyczności sekwencji nukleotydowej (93,02 – 100%), co odpowiada 91,87 – 100% identyczności sekwencji aminokwasowej białek inwazyn kodowanych przez te geny (Garcia i wsp., 2000).

Białko DraD należy do zakonserwowanej rodziny inwazyn AfaD (**Rysunek 4**) (złożone jest ze 121 reszt aminokwasowych, 13,2 kDa). Podobnie jak adhezyna DraE posiada strukturę Ig-podobną, złożoną z dwóch anty-równoległych  $\beta$ -katrek. Jedna z  $\beta$ -katrek zbudowana jest z sześciu  $\beta$ -harmonijek (A, B, E, D1, D2 i D3), natomiast druga z czterech  $\beta$ -harmonijek (F, C1, C2 i C3). Inwazyna DraD posiada mostek disiarczkowy zlokalizowany pomiędzy resztami aminokwasowymi Cys28 i Cys116, łączący  $\beta$ -harmonijkę B w obrębie jednej  $\beta$ -kartki z  $\beta$ -harmonijką F w obrębie drugiej  $\beta$ -kartki. Mostek ten usztywnia hydrofobową szczelinę akceptorową, której

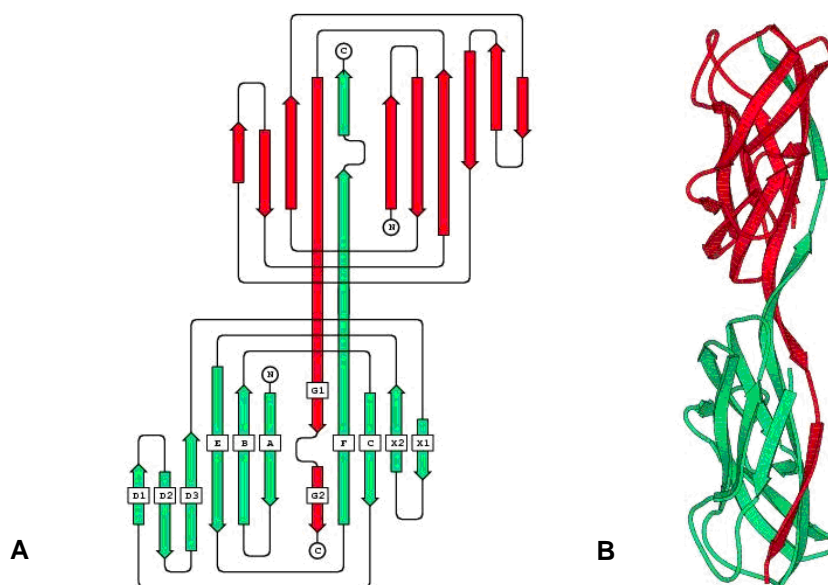
integralną część tworzy  $\beta$ -harmonijka F. Podobnie jak adhezyna DraE, inwazyjna DraD tworzy strukturę  $\beta$ -beczki opartej na motywie „jelly-roll” (**Rysunek 5**).

AfaD-3	MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGVSQAELHLESRGGSGTQLRDGAKVATGRIICRE	56
DraD	MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGVSQAELHLESRGGSGTQLRDGAKVATGRIICRE	56
AfaD-1	MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGVSQAELHLESRGGSGTQLRNGAKLATGRIICRE	56
AfaD-2	MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGVSQAELTLESHGSRGGQLRDGEKLATGRIICRE	56
AfaD-5	MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGVSQAELTLESHGSRGGQLRDGEKLATGRIICRE	56
DaaD	MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGVSQAELHLESRGGSGTQLRNGAKLATGRIICRE	56
AfaD-3	AHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRVTGGDGWSPVKEGGGKGVSRPG	112
DraD	AHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRVTGGDGWSPVKEGGGKGVSRPG	112
AfaD-1	AHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRVTGGDGWSPVKEGGGKGVSRPG	112
AfaD-2	AHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRVTGGDGWSPVKEGGGKGVSRPG	112
AfaD-5	AHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRVTGGDGWSPVKEGGGKGVSRPG	112
DaaD	AHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRVTGGDGWSPVKEGGGKGVSRPG	112
AfaD-3	QEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGGACVVPQE	147
DraD	QEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGGACVVPQE	147
AfaD-1	QEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGGACVVPQE	147
AfaD-2	QEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGGACVVPQE	147
AfaD-5	QEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGGACVVPQE	147
DaaD	QEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGGACVVPQE	147

**Rys.4.** Porównanie sekwencji aminokwasowych inwazyj rodziny AfaD wraz z sekwencjami sygnałnymi (oznaczone kolorem żółtym). Kolorem niebieskim zaznaczono reszty aminokwasowe różniące białka AfaD-1, AfaD-2, AfaD-5 i DaaD od białka AfaD-3. Białko inwazyjne DraD wykazuje 100% podobieństwa do białka inwazyjnego AfaD-3. Sekwencje aminokwasowe poszczególnych białek zaczerpnięto z bazy danych NCBI.

Struktura krystaliczna fuzyjnego białka DraD (**Rysunek 5**), zawierającego domenę polihistydynową na C-końcu, o rozdzielczości 1,05 Å, została opracowana w 2005 roku w wyniku współpracy Katedry Mikrobiologii PG z Synchrotron Radiation Section, NCI, National Cancer Institute, Argonne National Laboratory (USA) (Jędrzejczak i wsp., 2005). Białko to posiada dodatkową  $\beta$ -harmonijkę donorową w postaci domeny fuzyjnej złożonej z 13 reszt aminokwasowych (komplementującej hydrofobową szczelinę akceptorową) pochodzącą z drugiej podjednostki białka DraD. Peptyd fuzyjny biegnie tylko po powierzchni szczeliny akceptorowej. W związku z tym szczelina akceptorowa w dużej mierze jest otwarta do rozpuszczalnika (Jędrzejczak i wsp., 2006). Wynika z tego, że białko DraD bez obecności specyficznej nici donorowej (pochodzącej z białka fimbrialnego DraE) jest w stanie przyjąć strukturę zbliżoną do natywnej, która dodatkowo jest stabilizowana przez mostek disiarczkowy, łączący dwie anty-równoległe  $\beta$ -kartki w strukturze  $\beta$ -beczki. Dlatego też białko DraD może występować w dwóch formach – jako podjednostka niezależna od adhezyny

DraE, tworząca powierzchniową strukturę otoczki bakteryjnej oraz podjednostka zlokalizowana na szczycie struktury fimbrialnej złożonej z podjednostek adhezyny DraE (szczelina akceptorowa białka DraD uzupełniana przez N-terminalną nić donorową pochodzącą z białka DraE) (Zalewska-Piątek i wsp., 2008).



**Rys.5.** Diagram topologiczny (A) oraz struktura dimeru DraD (B) z zaznaczonymi  $\beta$ -harmonijkami.

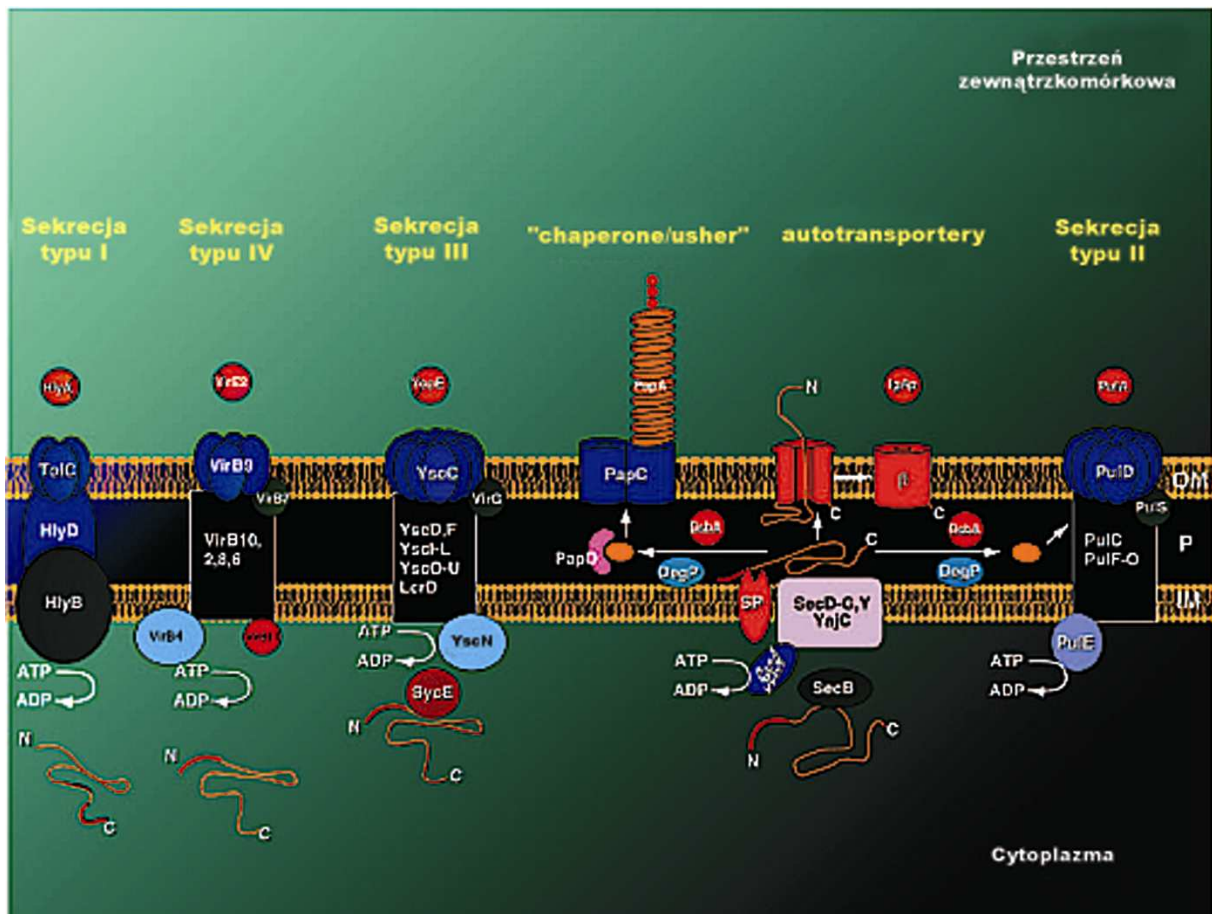
W strukturze widoczna jest charakterystyczna szczelina akceptorowa mogąca ulegać donorowaniu przez N-terminalną nić donorową pochodzącą z białka DraE. Białko DraD nie posiada sekwencji odpowiadającej N-terminalnej nici donorowej występującej w białku DraE (Jędrzejczak i wsp., 2005).

#### 1.4. Sekrecja czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych

Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych zbudowana jest z dwóch błon oddzielonych od siebie przestrzenią periplazmatyczną. Błony komórkowe stanowią istotną barierę, warunkującą integralność całego organizmu. Ściana komórkowa bakterii musi jednak posiadać dostateczną przepuszczalność, aby zapewnić odpowiednim molekułom przenikanie do wnętrza i na zewnątrz komórki. Zewnątrzkomórkowa lokalizacja determinant wirulentnych jest ważną cechą, charakteryzującą mikroorganizmy patogenne. Eksport białek na powierzchnię komórek bakteryjnych obejmuje transport poprzez błonę wewnętrzną (IM – ang. Inner Membrane), periplazmę oraz błonę zewnętrzną (OM – ang. Outer Membrane).



Sekrecja białek zachodzi dzięki różnym, często złożonym mechanizmom. Wszystkie systemy sekrecji podzielić możemy na dwie główne grupy: (i) „Sec – zależne” oraz (ii) „Sec – niezależne” (**Rysunek 6**).



**Rys.6.** Schemat przedstawiający główne drogi sekrecji białek u bakterii Gram-ujemnych.

**OM** – błona zewnętrzna; **P** – periplazma; **IM** – błona wewnętrzna; **SP** – peptydaza sygnalna (peptydaza sygnalna I dla białek PapA i IgAp, peptydaza sygnalna II dla białka PulA); **β** – domena β autotransportera proteazy IgA1; **N** – N-koniec białka; **C** – C-koniec białka (Kostakioti i wsp., 2005).

Bakterie Gram-ujemne rozwinęły kilka dróg transportu białek do środowiska zewnątrzkomórkowego (**Rysunek 6**). Zaliczamy do nich:

- szlak sekrecji typu I (szlak sekrecji typu ABC), np. sekrecja hemolizyny A *E. coli* – bezpośredni transport substratu poprzez błonę wewnętrzną (IM) i zewnętrzną (OM) z pominięciem przestrzeni periplazmatycznej (sekrecja „Sec-niezależna”);
- szlak sekrecji typu II, np. białko pullanaza *Klebsiella oxytoca* – dwuetapowy proces wymagający udziału systemu Sec do transportu poprzez błonę

wewnętrzną oraz odrębnego aparatu sekrecji białek przez periplazmę i błonę zewnętrzną (sekrecja „Sec-zależna”);

- szlak sekrecji typu III, np. sekrecja białka Yop *Yersinia spp.*, funkcjonuje u bakterii wyłącznie w celu dostarczenia czynników wirulencji bezpośrednio do komórki gospodarza („sekrecja Sec-niezależna”);
- szlak sekrecji typu IV – dwuetapowy system transportu przez błonę wewnętrzną na bazie systemu Sec do periplazmy i przez błonę zewnętrzną na powierzchnię komórki (sekrecja „Sec-zależna”);
- szlak sekrecji typu V - autotrasportery oraz białka wymagające pojedynczych czynników dodatkowych („sekrecja Sec-zależna”);
- szlak sekrecji „chaperone/usher”, np. biogeneza pili typu 1 i pili typu P *E. coli* (sekrecja „Sec-zależna”).

Do głównych szlaków sekrecji białek (ang. General Secretory Pathway – GSP), zaliczamy szlak sekrecji typu II, system sekrecji „chaperone/usher” oraz sekrecję białek z wykorzystaniem autotransporterów.

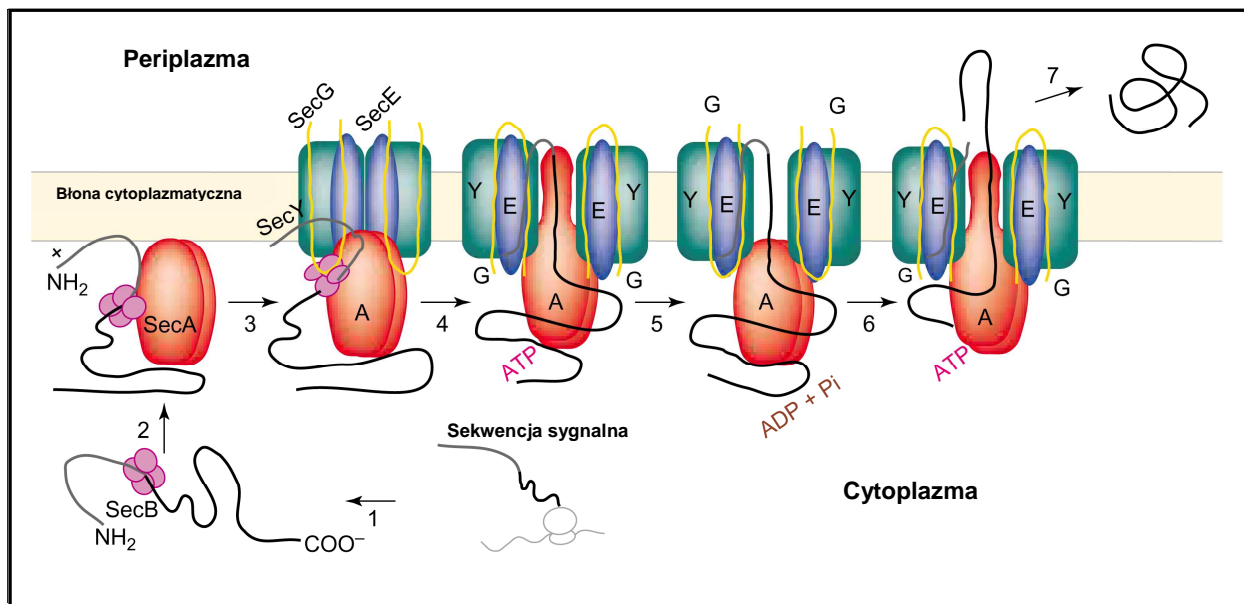
#### **1.4.1. Transport białek przez błonę wewnętrzną z wykorzystaniem systemu sekrecji Sec**

Prekursory białek periplazmatycznych, zewnątrz błonowych i wielu białek zewnątrzkomórkowych, syntetyzowane są w cytoplazmie wraz z N-terminalną domeną sygnałną umożliwiającą transport tych białek przez błonę wewnętrzną z wykorzystaniem systemu sekrecji Sec. System ten wykorzystywany jest podczas dwuetapowego transportu białek z wykorzystaniem głównych systemów sekrecji białek (GSP). W skład systemu sekrecji Sec (**Tabela 1**) wchodzi cytoplazmatyczne białko opiekuńcze SecB, ATPaza SecA (forma białka SecA związana z ATP ma duże powinowactwo do transportowanych białek) oraz wewnątrz błonowy, integralny kompleks białkowy, składający się z sześciu różnych podjednostek białkowych (SecY, SecE, SecD, SecF, SecG i YajC). Badania *in vivo* wykazały, że do efektywnego transportu białek poprzez błonę wewnętrzną konieczne są tylko białka SecY i SecE, natomiast pozostałe cztery białka kompleksu błonowego wymagane są jedynie w niskich temperaturach (Danese i Silhavy, 1998).

Białko opiekuńcze SecB transportuje prekursor białek do błony wewnętrznej, gdzie zlokalizowane jest białko SecA. Białko SecA, w wyniku wielokrotnych cykli hydrolizy ATP, dostarcza peptyd sygnałny wraz z fragmentem białka macierzystego

do kompleksu SecYEG tworzącego kanał w wewnętrznej błonie komórkowej. Podczas hydrolizy jednej cząsteczki ATP następuje transport ok. 2,5 kDa fragmentu białka. Po kilku cyklach, białko prekursorowe zostaje przetransportowane przez błonę wewnętrzną, jednakże pozostaje w niej zakotwiczone poprzez peptyd sygnałny (**Rysunek 7**).

Sekwencje sygnałne transportowanych białek, wykazują kilka cech wspólnych: (1) mają długość 13 do 36 reszt aminokwasowych; (2) część sekwencji sygnałnej zawiera przynajmniej jedną resztę o ładunku dodatnim; (3) środek sekwencji sygnałnej przy N końcu jest silnie hydrofobowy, zazwyczaj o długości 10 do 15 reszt aminokwasowych; w rejonie tym często występują alanina, leucyna, walina, izoleucyna i fenylalanina (Stryer, 1997).



**Rys. 7.** Komponenty systemu Sec oraz mechanizm procesu Sec-zależnej translokacji.

Prebiałko oznaczono na schemacie czarną linią, zawierającą N-terminalną sekwencję sygnałną (zaznaczoną kolorem szarym). Etapy 1÷3 – proces dostarczenia prebiałka do Sec-zależnego systemu translokacji; etapy 4 i 5 – inicjacja procesu translokacji; etap 6 – proces translokacji białka z wykorzystaniem systemu Sec; etap 7 – zakończenie procesu translokacji białka (Hiroyuki i Koreaki, 2001).

Po przetransportowaniu białka przez błonę wewnętrzną następuje odcięcie peptydu sygnałnego przez zlokalizowaną w błonie peptydazę sygnałną. Wyróżniamy trzy rodzaje peptydaz sygnałnych (**Tabela 1**) posiadających odmienną specyficzność substratową (Pugsley, 1993):

- sygnalna peptydaza I (LepB) – pochodząca z *E. coli*, będąca integralnym białkiem wewnętrznej błony komórkowej, zbudowana z dwóch helikalnych segmentów transmembranowych i dużej C-terminalnej domeny periplazmatycznej, charakteryzującej się aktywnością proteolityczną (Dalbey i wsp., 1992);
- sygnalna peptydaza II (LspA) – będąca integralnym białkiem wewnętrznej błony komórkowej (rozpoznającym peptydy sygnałne specyficzne dla prekursorów lipoprotein), zbudowana z czterech  $\alpha$ -helikalnych segmentów błonowych, których końce zlokalizowane są w cytoplazmie (Sankaran i Wu, 1995);
- peptydaza prepiliowa specyficzna dla pili typu 4 (BfpA) – wewnątrz błonowa peptydaza, posiadająca dwie aktywności enzymatyczne: aktywność endoproteolityczną, niezbędną do usuwania peptydów sygnałnych z prekursorów białkowych podjednostek pili typu 4 oraz aktywność N-metylującą niezbędną do posttranskrypcyjnej obróbki pili typu 4 (Lory i Strom, 1997) oraz odcinania peptydu sygnałnego od strony cytoplazmatycznej błony komórkowej.

Po odcięciu peptydu sygnałnego następuje jego degradacja przez proteazę IV. Dojrzałe białko zostaje uwolnione do przestrzeni periplazmatycznej. Kolejnym etapem sekrecji białka jest transport przez błonę zewnętrzną.

**Tabela 1.** Składniki systemu sekrecji Sec oraz peptydazy sygnałne *E. coli*.

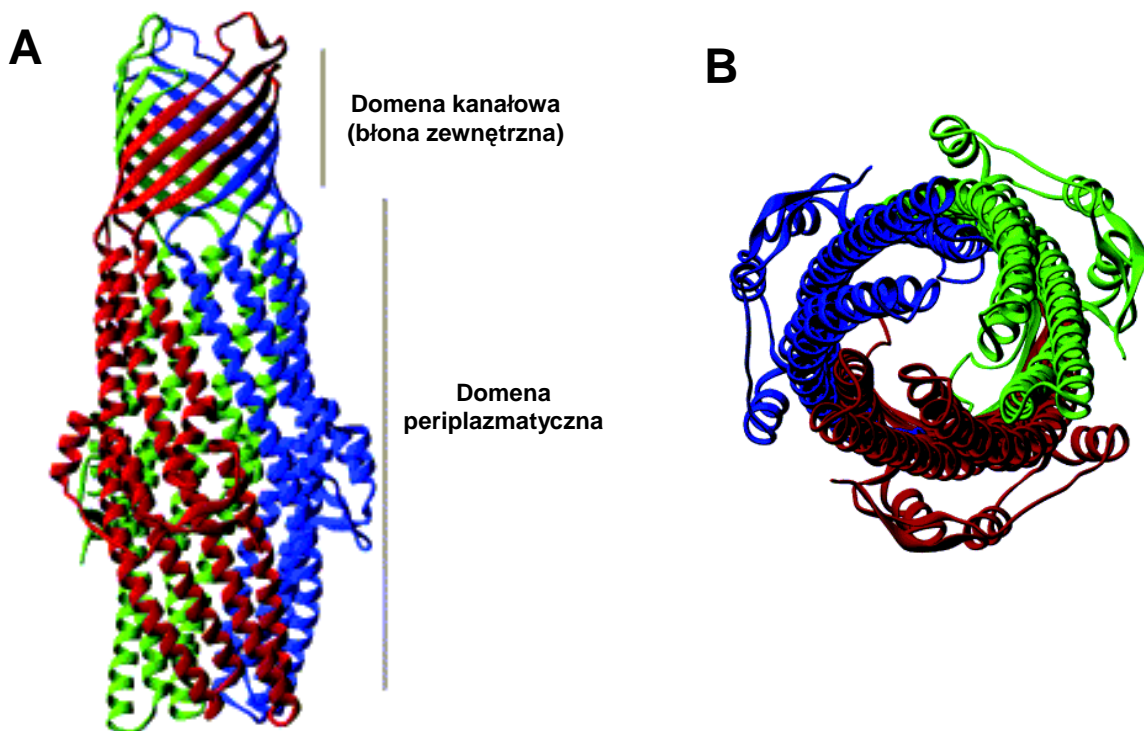
<i>Białko</i>	<i>Lokalizacja</i>	<i>Wielkość (kDa)</i>	<i>Struktura/Topologia</i>	<i>Główne funkcje w sekrecji białek</i>
<i>Sec translokazy:</i>				
SecB	Cytoplazma	17	Homotetramer	Białko opiekuńcze (ang. chaperone)
SecA	cytoplazma i błona wewn.	102	Homodimer	ATPaza odpowiedzialna za dostarczenie prekursora polipeptydu do aparatu sekrecyjnego
SecY	Błona wewn.	49	10 segmentów transmembranowych	Białko tworzące kompleks z białkiem SecE i prawdopodobnie z białkiem SecG; tworzy kanał w błonie wewnętrznej
SecE	Błona wewn.	14	3 segmenty transmembranowe	Białko tworzące kompleks z białkiem SecY i prawdopodobnie z białkiem SecG
SecD	Błona wewn.	67	6 segmentów transmembranowych	Białko zapobiegające cofaniu się prekursora białka związanego z białkiem SecA
SecF	Błona wewn.	35	6 segmentów transmembranowych	Białko zapobiegające cofaniu się prekursora białka związanego z białkiem SecA
SecG	Błona wewn.	11	2 segmenty transmembranowe	Białko ułatwiające integrację białka SecA z błoną wewnętrzną
YajC	Błona wewn.	12	1 segment transmembranowy	?
<i>Peptydazy sygnałne</i>				
Sygnałna peptydaza I (LepB)	Błona wewn.	36	2 segmenty transmembranowe	Białko odcinające N-terminalny peptyd sygnałny od transportowanego białka
Sygnałna peptydaza II (LspA)	Błona wewn.	18	4 segmenty transmembranowe	Białko odcinające N-terminalny peptyd sygnałny od prekursorów lipoprotein
Peptydaza prepiliowa (BfpA)	Błona wewn.	27	?	Białko odcinające peptyd sygnałny od prepiliowych podjednostek pili typu 4, białko metylujące N-koniec podjednostki pili typu 4

### 1.4.2. Szlak sekrecji typu I

System transportu typu I (T1SS – ang. Type I Secretion System), umożliwia bakteriom Gram-ujemnym sekrecję białek o różnej wielkości i różnych funkcjach

bezpośrednio (z pominięciem przestrzeni periplazmatycznej) z cytoplazmy do środowiska zewnątrzkomórkowego. Pełna charakterystyka T1SS wykonana została na bazie badania procesu sekrecji  $\alpha$ -hemolizyny *E. coli*. Białka transportowane na zewnątrz komórki poprzez szlak sekrecji typu I posiadają zamiast N-terminalnego peptydu sygnałowego C-terminalną sekwencję sygnałową, złożoną z 60 reszt aminokwasowych, która nie ulega odcięciu po przetransportowaniu białka (droga transportu z pominięciem systemu Sec).

W skład systemu sekrecji typu I wchodzi trzy białka: wewnątrz błonowy eksporter ABC (ang. Inner Membrane ATP Binding Cassette Exporter) specyficznie rozpoznający C-terminalną sekwencję sygnałową, białko MFP (ang. Membrane Fusion Protein) zakotwiczone w błonie wewnętrznej, którego znaczna część obejmuje przestrzeń periplazmatyczną oraz białko OMP (ang. Outer Membrane Protein) tworzące kanał w błonie zewnętrznej (Thanassi i Hultgren, 2000). W wyniku interakcji tych trzech elementów białkowych powstaje funkcjonalny, zamknięty kanał eksportujący, łączący błonę wewnętrzną z błoną zewnętrzną (**Rysunek 8**). Energia niezbędna do transportu białka pochodzi z hydrolizy wysokoenergetycznych wiązań w cząsteczce ATP, przeprowadzanej przez białko ABC. Po zakończeniu procesu sekrecji kompleks translokacyjny ulega rozpadowi.

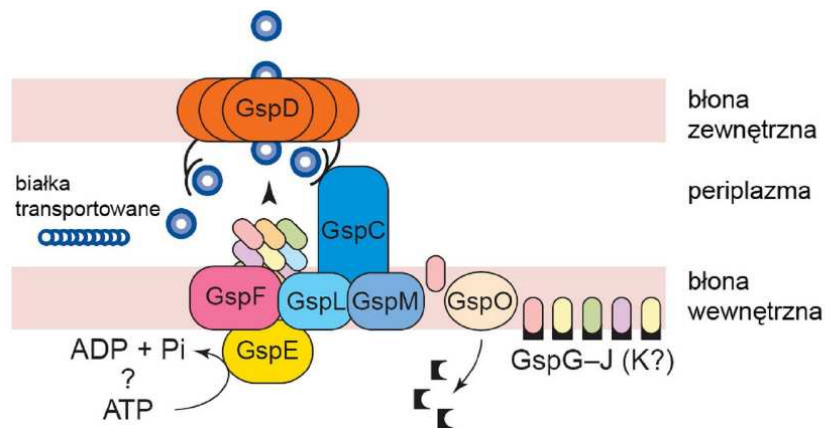


**Rys.8.** Struktura krystaliczna zewnątrz błonowego trimery białka TolC *E. coli*. **(A)** widok z boku (trzy indywidualne, identyczne podjednostki oznaczone odmiennymi kolorami); **(B)** widok w głąb otwartego kanału tworzonego od strony periplazmatycznej (Sharff i wsp., 2001).

### 1.4.3. Szlak sekrecji typu II

Szlak sekrecji typu II (T2SS – Type II Secretion System), będący najważniejszym szlakiem głównego systemu sekrecji jest szeroko rozpowszechniony wśród bakterii (**Tabela 2**). System ten odpowiedzialny jest za sekrecję rozmaitych białek (m.in. toksyn, enzymów hydrolitycznych), wśród których obecnych jest wiele czynników wirulentnych warunkujących patogenność danego drobnoustroju.

Sekrecja przy udziale T2SS obejmuje translokację białek poprzez dwie błony komórkowe (**Rysunek 9**). Białka ulegające sekrecji przy udziale T2SS posiadają N-końcową sekwencję sygnałną, umożliwiającą translokację poprzez błonę wewnętrzną za pośrednictwem systemu Sec. Po przetransportowaniu białka przez błonę wewnętrzną następuje odcięcie peptydu sygnałnego przez zlokalizowaną w błonie peptydazę sygnałną. Następnym etapem jest poprawne złożenie i uwolnienie białka do przestrzeni periplazmatycznej. Na tym etapie białka mogą ulegać dalszym modyfikacjom, takim jak tworzenie mostków disiarczkowych lub łączenie się podjednostek białkowych. Transport białek na powierzchnię komórki bakteryjnej poprzez system sekrecji typu II różni się od pozostałych systemów sekrecji tym, że transportowany substrat stanowi poprawnie i w pełni złożone białko.



**Rys.9.** Schemat transportu białek na powierzchnię komórek poprzez system sekrecji typu II (Nunn, 1999).

**Tabela 2.** Rozpowszechnienie systemu sekrecji typu II wśród bakterii Gram-ujemnych (Cianciotto, 2005).

<b>Klasa</b>	<b>Gatunek</b>	<b>Sekwencjonowany szczep</b>	<b>Nisza ekologiczna</b>	<b>Patogenność</b>	<b>Obecność genów T2S</b>
<b><math>\gamma</math>-proteobakterie</b>					
<i>Actinobacter</i>	<i>cacoaceticus</i>	ADP1	Woda, gleba	Niepatogeny	-L, M
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	Ah65	Woda	Patogen ryb	Komplet
<i>Erwinia</i>	<i>carotovora</i> subsp. <i>aeroseptica</i>	SCRI1043	Woda, gleba	Patogen roślin	Komplet
<i>Escherichia</i>	<i>chrysanthemii</i>	EC16	Woda, gleba	Patogen roślin	Komplet
	<i>coli</i> O78:H11	H10407	Jelita	Patogen ludzki	Komplet
	<i>coli</i> O157:H7	EDL 933	Jelita	Patogen ludzki	Komplet
	<i>coli</i> K-12	MG1655, MC4100	Szczep laboratoryjny	Niepatogeny	Komplet
	<i>coli</i> O15:H-	83/39	Jelita	Patogen króliczy	Komplet
<i>coli</i> O6:H1	CFT073	Układ moczowy	Patogen ludzki	Komplet	
<i>Idiomarina</i>	<i>loihiensis</i>	L2TR	Głębokie kanały morskie	Niepatogeny	Komplet
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	UNF5023	Woda, gleba	Patogen ludzki	Komplet
<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>	130b, Lens, Paris, Philadelphia-1	Woda	Patogen ludzki	Komplet
<i>Methylococcus</i>	<i>capsulatus</i>	Bath	Woda, osady	Niepatogeny	-C
<i>Photobacterium</i>	<i>profundum</i>	SS9	Głębokie kanały morskie	Niepatogeny	Komplet
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	PA01, PAK	Woda, gleba, rośliny	Patogen ludzki	Komplet
	<i>alcaligenes fluorescens</i>	M-1 Pf-5	Gleba Gleba, woda, rośliny	Niepatogeny Niepatogeny	Komplet Komplet
	<i>putida</i>	KT2440, WCS358	Gleba	Niepatogeny	Komplet
	<i>syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	Rośliny	Patogen roślin	Komplet
<i>Shewanella</i>	<i>oneidensis</i>	MR-1	Woda	Niepatogeny	Komplet
<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i> El Tor	TRH7000, N16961	Woda, mięczaki	Patogen ludzki	Komplet
	<i>fischeri</i>	ES114	Symbionty kałamarnic	Niepatogeny	Komplet
	<i>parahemolyticus</i>	RIMD2210633	Woda, mięczaki	Patogen ludzki	Komplet
	<i>vulnificus</i>	YJO16	Woda, mięczaki	Patogen ludzki	Komplet
	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodia</i> pv. <i>citri</i>	306	Woda, gleba	Patogen roślin
	<i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ATCC 33913, XC1701	Woda, gleba	Patogen roślin	Komplet
<i>Xylella</i>	<i>fastidiosa</i>	Temecula	Ksyllem roślinny	Patogen roślin	Komplet
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	WA-314	Jelita ludzi i zwierząt	Patogen ludzki	Komplet
	<i>pestis</i> bv. <i>mediaevalis</i>	KIM	Gryzonie	Patogen ludzki	-M
	<i>pestis</i> bv. <i>orientalis</i>	CO92	Gryzonie	Patogen ludzki	-M
	<i>pseudotuberculosis</i>	IP32953	Jelita ludzi i zwierząt	Patogen ludzki	-M
<b><math>\alpha</math>-proteobakterie</b>					
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	USDA110	Symbiont roślin	Niepatogeny	-C, I, M
<i>Caulobacter</i>	<i>crescentus</i>	CB15	Woda	Niepatogeny	Komplet
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>diazotrophicus</i>	SRT7	Endofit cukru trzcinowego	Niepatogeny	-K
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	MAFF303099	Symbiont roślin	Niepatogeny	-M
<b><math>\beta</math>-proteobakterie</b>					
<i>Azoarcus</i>	sp. <i>mallei</i>	EbN1 ATCC 23344	Woda, gleba Konie, muły, osły	Niepatogeny Patogen ludzki	-M Komplet
<i>Chromobacterium</i>	<i>pseudomallei</i>	K96243	Woda, gleba	Patogen ludzki	Komplet
<i>Ralstonia</i>	<i>solanacearum</i>	ATCC 12472 GMI 1000	Woda, gleba Gleba	Niepatogeny Patogen roślin	-M Komplet
<b><math>\delta</math>-proteobakterie</b>					
<i>Bdellovibrio</i>	<i>bacteriovorus</i>	HD100	Woda, gleba	Niepatogeny	-L, M
<i>Geobacter</i>	<i>sulfurreducens</i>	PCA	Osady	Niepatogeny	Komplet



Do prawidłowego działania T2SS niezbędne są białka kodowane przez 12-16 genów (**Tabela 3**), które tworzą multimetryczny kompleks, zakotwiczony w błonie wewnętrznej i zewnętrznej (tzw. sekreton) (**Rysunek 9**). Geny i ich produkty oznaczane są poprzez litery A-O oraz S. Typ II sekrecji posiada wiele cech wspólnych z typem IV sekrecji, zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym (Sandkvist, 2001). Większość białek kompleksu sekrecyjnego związanych jest z wewnętrzną błoną komórkową (Russel, 1998). Funkcjonowanie T2SS związane jest z obecnością dwóch białek zewnątrz błonowych: GspD i GspS. Białko D należące do rodziny sekretyn, tworzy kanał w błonie zewnętrznej. Kanał ten zbudowany jest z 12-14 podjednostek białkowych tworzących strukturę pierścienia. Zakonserwowana część C-terminalna jest zakotwiczona w błonie zewnętrznej, podczas gdy zmienna część N-terminalna znajduje się w perioplazmie. Średnica pierścienia białkowego wynosi ok. 70-80 Å, co jest wystarczające do transportu dużych, prawidłowo złożonych białek. Transport białek przez kanał w błonie zewnętrznej jest prawdopodobnie uzależniony od zmian konformacyjnych w obrębie N-terminalnej domeny białka D. Podjednostka S jest małą zewnątrz błonową lipoproteiną ułatwiającą i stabilizującą lokalizację białka D w błonie zewnętrznej. Białko S wiąże się do domeny C-terminalnej białka D w stosunku 1:1. Nie stwierdzono jednak obecności białka S w każdym systemie sekrecji typu II.

**Tabela 3.** Podział i śródkomórkowa lokalizacja komponentów systemu sekrecji typu II (Sandkvist, 2001).

<b>Gatunek</b>	<b>Produkty genów systemu sekrecji typu II i ich śródkomórkowa lokalizacja</b>														
<i>V. cholerae (eps)</i>	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	VcpD <sub>o</sub>
<i>A. hydrophila (exe)</i>	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	TapD <sub>o</sub>
<i>E. coli (gsp)</i>	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O
<i>K. oxytoca (pul)</i>	S	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>E. chrysanthemi (out)</i>	S	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O
<i>E. carotovora (out)</i>	S	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>P. aeruginosa (xcp)</i>			P <sub>C</sub>	Q <sub>D</sub>	R <sub>E</sub>	S <sub>F</sub>	T <sub>G</sub>	U <sub>H</sub>	V <sub>I</sub>	W <sub>J</sub>	X <sub>K</sub>	Y <sub>L</sub>	Z <sub>M</sub>		A <sub>o</sub> /PilD <sub>o</sub>
<i>X. campestris (xps)</i>				D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	PilD <sub>o</sub>
Lokalizacja	om	im	im	im/om	om	c	im	im/om	Im/om	im/om	im/om	im/om	im	im	im

om – błona zewnętrzna, im – błona wewnętrzna, c – cytoplazma

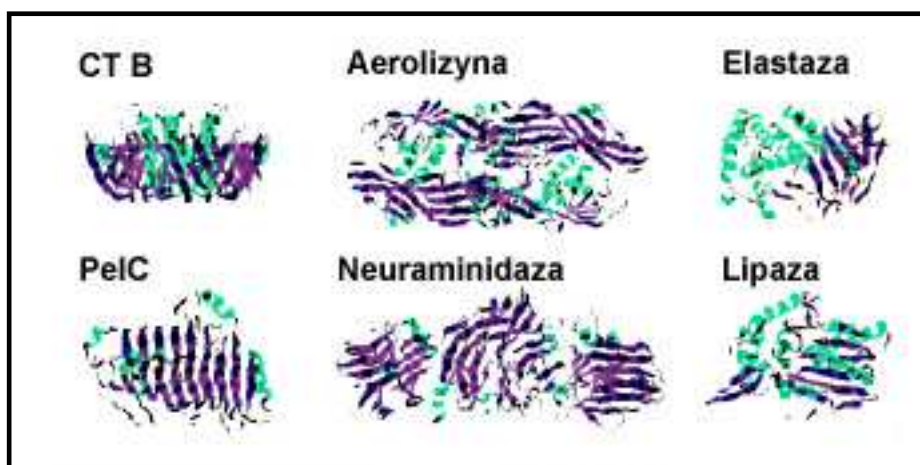
Innym białkiem pomocniczym, obecnym w kilku scharakteryzowanych systemach sekrecji typu II, jest białko B. Prawdopodobnie pełni ono rolę stabilizacyjną wobec białka D, a także reguluje proces transportu poprzez

dostarczanie energii niezbędnej do zmian konformacyjnych białka D, co umożliwia otwarcie kanału błonowego. Białko B tworzy również stabilny kompleks z białkiem A umiejscowionym w błonie wewnętrznej, które posiada domenę wiążącą ATP.

Kolejnym białkiem, które występuje tylko w części zidentyfikowanych systemów sekrecji typu II jest białko N. Białko to oddziałuje z białkiem D i jest zakotwiczone w błonie wewnętrznej. Białka A, B, S i N pełnią rolę białek gatunkowo specyficznych podczas procesu sekrecji. Prawdopodobną funkcją białka C jest rozpoznawanie transportowanego substratu. Białko to oddziałuje także z białkiem D oraz z białkami L i M, które tworzą stabilny kompleks. Białko E jest umiejscowione w błonie cytoplazmatycznej i oddziałuje z N-terminalną domeną białka L oraz z białkiem M. Podjednostki białka E mogą tworzyć homooligomery. Białko E prawdopodobnie pełni rolę kinazy bądź ATPazy, która reguluje proces sekrecji. Podjednostka E oddziałuje również z białkiem G (Sandkvist, 2001).

Białka G, H, J i K, które są wcześniej metylowane i trawione enzymatycznie przez białko O, tworzą strukturę przypominającą pilę typu IV. Homologie pomiędzy wieloma białkami systemu sekrecji typu II, a biogenezą pili typu IV świadczą o ich bliskim pokrewieństwie ewolucyjnym (Nunn, 1999). Tworząca się struktura pili może działać jak „spust”, który wypycha transportowane białka na zewnątrz komórki bakteryjnej poprzez cykliczne wydłużanie (polimeryzację) i skracanie (depolimeryzację) pili.

Jak wspomniano wcześniej unikalną cechą systemu sekrecji typu II jest zdolność do transportowania białek w pełni złożonych. Białka transportowane tym szlakiem sprawiają wrażenie braku jakichkolwiek cech wspólnych (Sandkvist, 2001). Analiza pierwszorzędowej struktury aminokwasowej białek transportowanych przez T2SS, nie ukazuje żadnej homologii. Niektóre z analizowanych białek (elastaza) występują w postaci monomeru, inne zaś (toksyna cholery) mają postać oligomerów. Białka ulegające sekrecji poprzez ten system transportu, wykazują także odmienne funkcje. Niektóre z nich to toksyny, działające wewnątrz komórek eukariotycznych, inne to enzymy hydrolityczne posiadające zróżnicowane specyficzności substratowe (jedne działają na białka, niektóre na lipidy, a jeszcze inne na chitynę). Analiza struktury trzeciorzędowej ukazuje jednak podobieństwo białek transportowanych przez system sekrecji typu II – białka te charakteryzują się stosunkowo wysoką zawartością  $\beta$ -harmonijek w strukturze trzeciorzędowej (Sandkvist, 2001) (**Rysunek 10**).



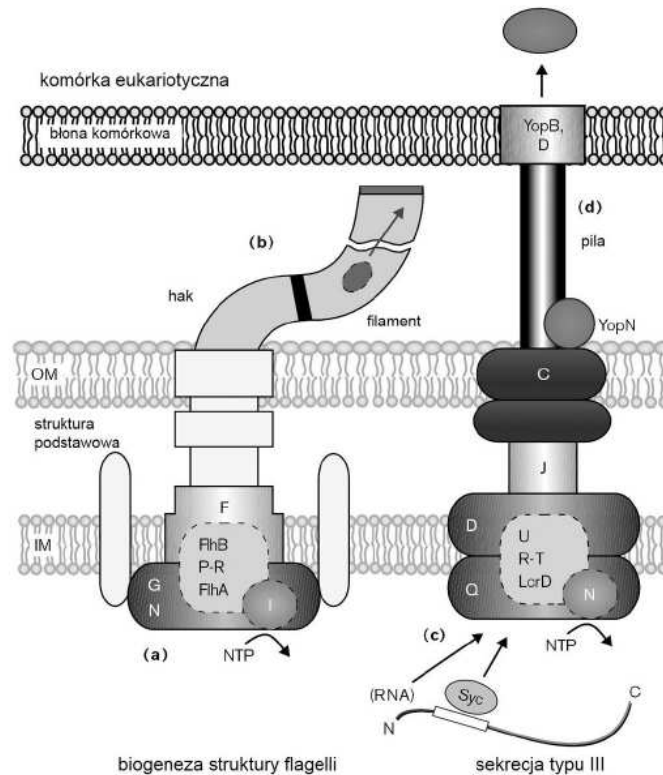
**Rys.10.** Struktury wybranych białek transportowanych przez system sekrecji typu II (Sandkvist, 2001).

Pomimo wnikliwej analizy systemu transportu typu II oraz transportowanych przez ten system białek nie udało się do tej pory ustalić specyficznych cech białek oraz sygnałów sekrecyjnych, które powodowałyby, że dane białko transportowane jest właśnie poprzez szlak sekrecji typu II.

#### 1.4.4. Szlak sekrecji typu III

Szlak sekrecji typu III (T3SS – Type III Secretion System) jest wykorzystywany przez mikroorganizmy patogenne w celu bezpośredniego dostarczania białek cytoplazmatycznych do komórek gospodarza. Podobnie jak w przypadku sekrecji typu I, białka transportowane są na powierzchnię komórki z pominięciem przestrzeni periplazmatycznej (bez udziału systemu Sec). Pozwala to na uniknięcie mechanizmów obronnych ze strony komórek gospodarza. Proces transportu białek jest ściśle regulowany. Niezbędne są dwie sekwencje sygnałowe: pierwsza sekwencja odpowiada za transport kompleksu rybosom-RNA w miejsce aparatu sekrecyjnego i umożliwia połączenie translacji z sekrecją, druga sekwencja sygnałowa umożliwia wiązanie białka transportowanego z białkiem opiekuńczym Syc występującym w cytoplazmie i kierującym białka do aparatu sekrecyjnego.

System sekrecji typu III składa się z co najmniej 17 polipeptydów, zlokalizowanych w przeważającej mierze w błonie cytoplazmatycznej (**Rysunek 11**). Najlepiej scharakteryzowanym systemem należącym do III typu sekrecji jest system odpowiedzialny za sekrecję białka Yop w bakteriach należących do rodzaju *Yersinia* (Ghosh, 2004).



**Rys.11.** Schemat transportu białek na zewnątrz komórek poprzez system sekrecji typu III (Thanassi i wsp., 2000).

Zewnątrz błonowe białko *YscC* *Yersinia spp.*, jest homologiem białka *GspD* wchodzącego w skład systemu sekrecji typu II, co wskazuje na pokrewieństwo do zewnątrz błonowych białek kanałotwórczych. Kanał w błonie zewnętrznej tworzy kompleks złożony z kilkunastu podjednostek białka *YscC*, którego lokalizacja w błonie zewnętrznej wymaga udziału dodatkowego małego białka będącego lipoproteina (podobnie jak w typie II sekrecji). Białko *YscJ* stanowi „pomost” pomiędzy błoną wewnętrzną i zewnętrzną poprzez oddziaływanie z białkami błonowymi. Przemieszczanie się białek wewnątrz utworzonego systemu wspomagane jest przez białko *YscN*, ATPazę zlokalizowaną w cytoplazmie. Białka zlokalizowane w błonie zewnętrznej tworzą kanałowe organellum (zbudowane z podjednostek białka *YscF*) łączące bakterię z komórką eukariotyczną. Translokację białek bezpośrednio do komórki gospodarza eukariotycznego umożliwia wewnątrz błonowy kanał utworzony z białek *YopB* i *YopD*. Funkcje poszczególnych białek wchodzących w skład systemu sekrecji typu III przedstawione zostały w **Tabeli 4**.

**Tabela 4.** Białka systemu sekrecji typu III (Tampakaki i wsp., 2004).

Białko	Charakterystyka, funkcja i lokalizacja białka
YscR	Integralne białka błony wewnętrznej, biorące udział w formowaniu włókna
YscS	
YscT	
LcrD (YscV)	Białko pełniące funkcje regulatorowe
YscU	Integralne białko błony wewnętrznej, biorące udział w formowaniu włókna
YscJ	Lipoproteina, domniemane białko transportujące przez przestrzeń periplazmatyczną
YscQ	?
YscN	Białko rozpuszczalne, ATPaza
YscC	Kanałotwórcze białko zewnątrz błonowe
YopN	Białko hydrofilowe, zlokalizowane na powierzchni komórki bakteryjnej

System sekrecji typu III posiada wiele cech wspólnych z systemem odpowiedzialnym za biogenezę rzęsek u bakterii. Prawdopodobnie oba te systemy wyewoluowały od wspólnego przodka.

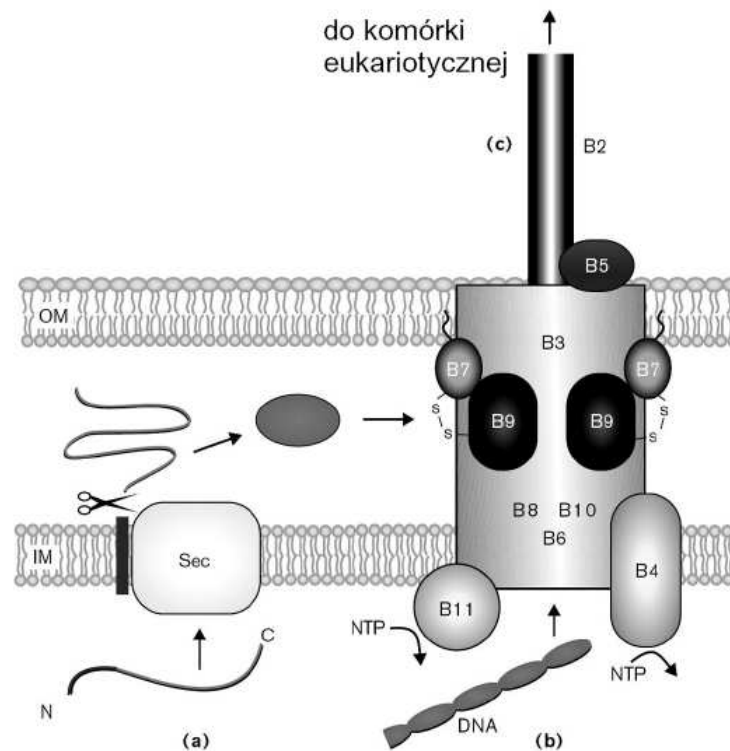
#### 1.4.5. Szlak sekrecji typu IV

Szlak sekrecji typu IV jest mechanizmem charakterystycznym dla bakterii takich jak *Bordetella pertussis* i *Helicobacter pylori*. W skład tego systemu wchodzi 9 białek wykazujących wysoki stopień homologii do białek systemu transportu VirB *Agrobacterium tumefaciens*. Aparat ten wykorzystywany jest przez mikroorganizmy zarówno do sekrecji białek jak i do translokacji cząsteczek DNA do komórek eukariotycznych. Sekrecja białek poprzez system typu IV zachodzi dwuetapowo (transport do periplazmy przy udziale systemu Sec, a następnie transport przez błonę zewnętrzną), natomiast transport cząsteczek DNA przebiega prawdopodobnie bez udziału systemu Sec (proces jednoetapowy – sekrecja bezpośrednio z cytoplazmy na zewnątrz komórki) (Thanassi i Hultgren, 2000).

Większość informacji dotyczących systemu sekrecji typu IV pochodzi z badań nad systemem VirB *Agrobacterium tumefaciens* zbudowanego z 11 białek VirB (**Rysunek 12**).

Białka systemu VirB są w większości związane z błonami komórkowym. Białka te oddziałują między sobą i są obecne w aparacie sekrecyjnym w wielu kopiach. VirB7 – 10, poprzez oddziaływanie między sobą, tworzą duży kompleks obejmujący przestrzeń periplazmatyczną i łączący błonę wewnętrzną z błoną zewnętrzną. Białko VirB7 jest zewnątrz błonową lipoproteina tworzącą heterodimerskie wiązanie

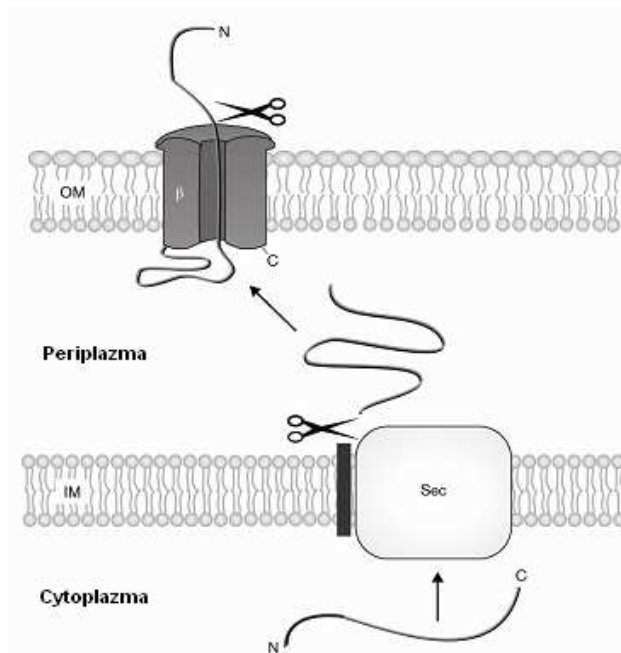
disiarczkowe z białkiem VirB9. Kompleks ten jest istotny ze względu na stabilizację pozostałych komponentów systemu VirB. Białka VirB4 oraz B11, zlokalizowane w błonie wewnętrznej, posiadają aktywność ATPazy i/lub autokinazy. System sekrecji typu IV, podobnie jak system sekrecji typu III, tworzy strukturę piliową łączącą bezpośrednio komórkę bakteryjną z komórką gospodarza.



**Rys.12.** Schemat transportu białek na powierzchnię komórek poprzez system sekrecji typu IV (Thanassi i wsp., 2000). **(a)** Pierwszy etap sekrecji białek transportowanych przez system typu IV obejmuje translokację błony wewnętrznej za pośrednictwem systemu sekrecji Sec. **(b)** Transport cząsteczki DNA zachodzi jednoetapowo - bezpośrednio z cytoplazmy na zewnątrz komórki. Białka B4 oraz B11 posiadają zdolność do wiązania kwasów nukleinowych. **(c)** Białko B2 stanowi główną podjednostkę pili typu IV, podjednostką podrzędną jest natomiast białko B5.

#### 1.4.6. Szlak sekrecji typu V (autotransportery)

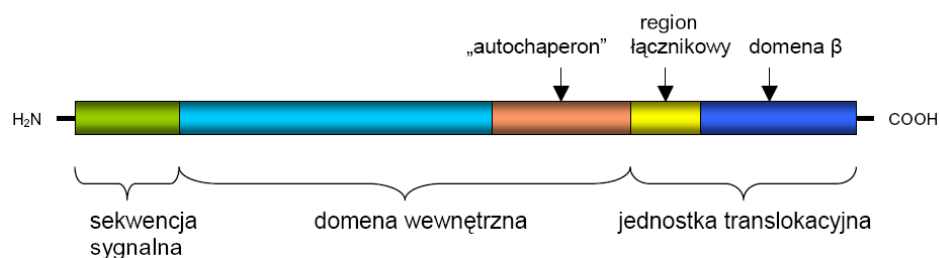
Rodzina białek autotransporterowych bakterii Gram-ujemnych to unikalny zespół białek, niewymagających dodatkowego aparatu wspomagającego do sekrecji białek z periplazmy (**Rysunek 13**).



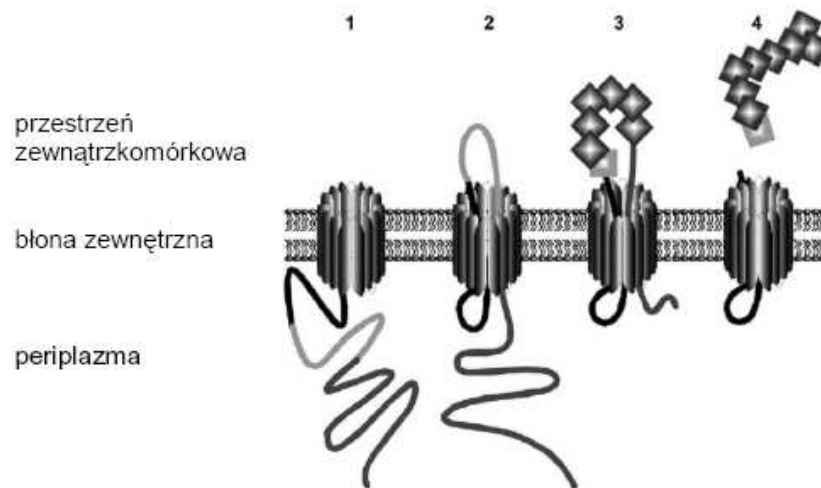
**Rys.13.** Schemat sekcji autotransporterowej (Thanassi i Hultgren, 2000). Domena C-terminalna tworzy w błonie zewnętrznej kanał o strukturze  $\beta$ -beczki, za pośrednictwem którego następuje transport domeny „pasażerskiej” na powierzchnię komórki. Uwolnienie przetransportowanej domeny do środowiska zewnątrzkomórkowego zachodzi na drodze proteolizy.

Typowy autotransporter syntetyzowany jest jako białko prekursorowe, w którym wyróżniamy trzy domeny: N-terminalną sekwencję sygnałową (umożliwiającą transport przez błonę wewnętrzną z wykorzystaniem systemu Sec), wewnętrzną domenę funkcjonalną (domenę „pasażerską”) oraz domenę C-terminalną (Henderson i wsp., 1998). Domena C-terminalna składa się z części tworzącej strukturę  $\beta$ -beczki oraz krótkiej  $\alpha$ -helisy pełniącej rolę łącznika (**Rysunek 14**) (Desvaux i wsp., 2004).

Po przetransportowaniu białka do periplazmy następuje odcięcie N-terminalnej domeny sygnałowej, natomiast domena C-terminalna zostaje włączona do błony wewnętrznej, tworząc w niej kanał o strukturze  $\beta$ -beczki (z hydrofilowym kanałem centralnym), przez którą przetransportowana zostaje wewnętrzna domena funkcjonalna (**Rysunek 15**). Sekrecja białek z wykorzystaniem autotransporterów nie wymaga dostarczania energii z zewnątrz.



**Rys.14.** Schemat budowy autotransportera (Desvaux i wsp., 2004).



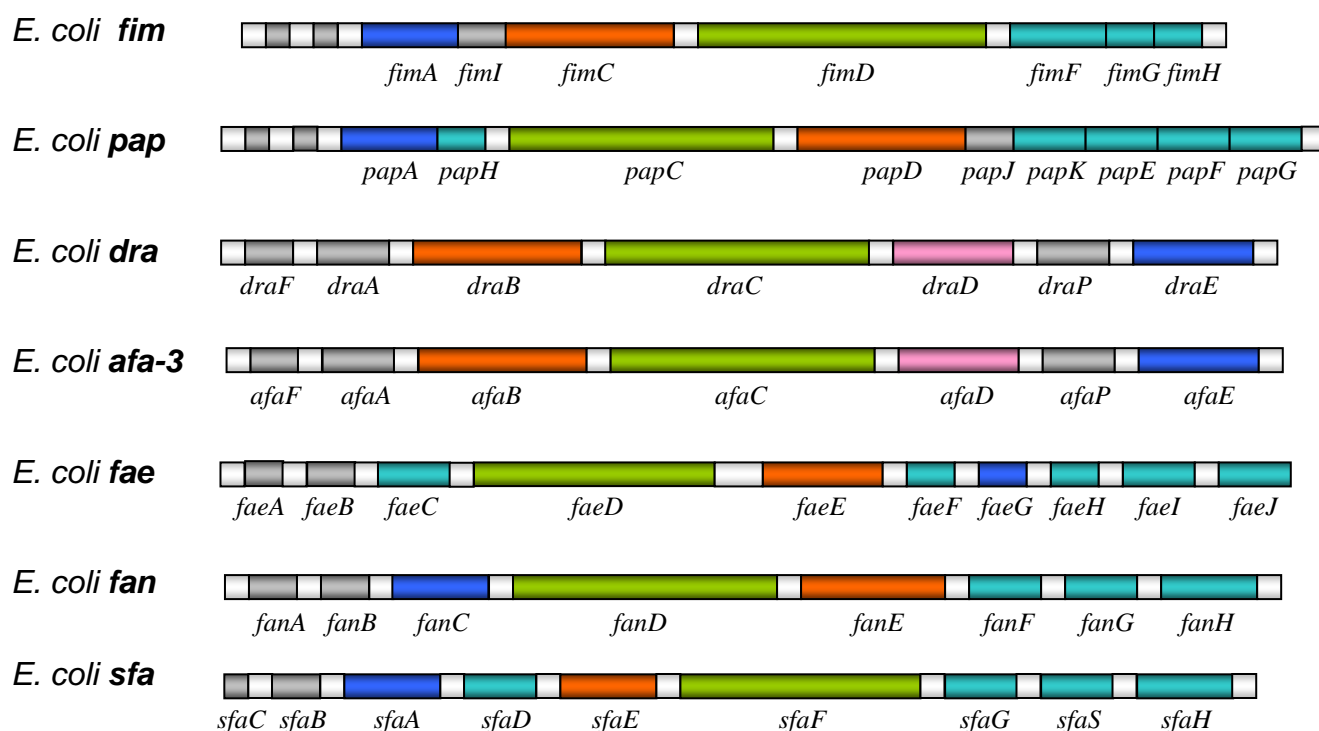
**Rys.15.** Mechanizm sekrecji autotransporterowej (Desvaux i wsp., 2004). **1** – insercja domeny C-terminalnej w błonę zewnętrzną i utworzenie kanału; **2** – inicjacja procesu transportu (sekwencja łącznika); **3** – poprawne złożenie domeny wewnętrznej katalizowane przez domenę „autochaperonu”, transport domeny wewnętrznej przez kanał w błonie zewnętrznej; **4** – proteoliza i uwolnienie białka do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

#### 1.4.7. Szlak sekrecji „chaperone/usher”

Szlak sekrecji „chaperone/usher” należy do szlaku GSP i jest (podobnie jak typ II sekrecji) nazywany głównym zakończeniem GSP (Thanassi i wsp., 1998). Jest on wykorzystywany w procesie biogenezy szerokiego spektrum wirulentnych struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych. Do tej pory ustalono, że ok. 30 struktur adhezyjnych, zarówno piliowych, jak i niepiliowych jest budowanych z użyciem systemu „chaperone/usher” (Saulino i wsp., 2000). Biogeneza typowych dla uropatogennych szczepów *E. coli* pili typu 1, typu P oraz fimbrii Dr, odbywa się z wykorzystaniem właśnie tego systemu sekrecji. Szlak transportu „chaperone/usher” nie wymaga do zajścia procesu energii dostarczanej z zewnątrz. Energia potrzebna do sekrecji w tym mechanizmie wywodzi się prawdopodobnie z interakcji zachodzących pomiędzy białkami zaangażowanymi w proces biogenezy pili/fimbrii.

Operony kodujące białka niezbędne do biogenezy adhezyjnych zewnątrzkomórkowych struktur polimerycznych na drodze „chaperone/usher” wykazują duże podobieństwo (**Rysunek 16**). Ich elementem wspólnym jest obecność genów kodujących białko opiekuńcze (kolor pomarańczowy), białko „usher” (kolor zielony) oraz białka strukturalne powierzchniowych struktur adhezyjnych (kolor jasno i ciemnoniebieski).





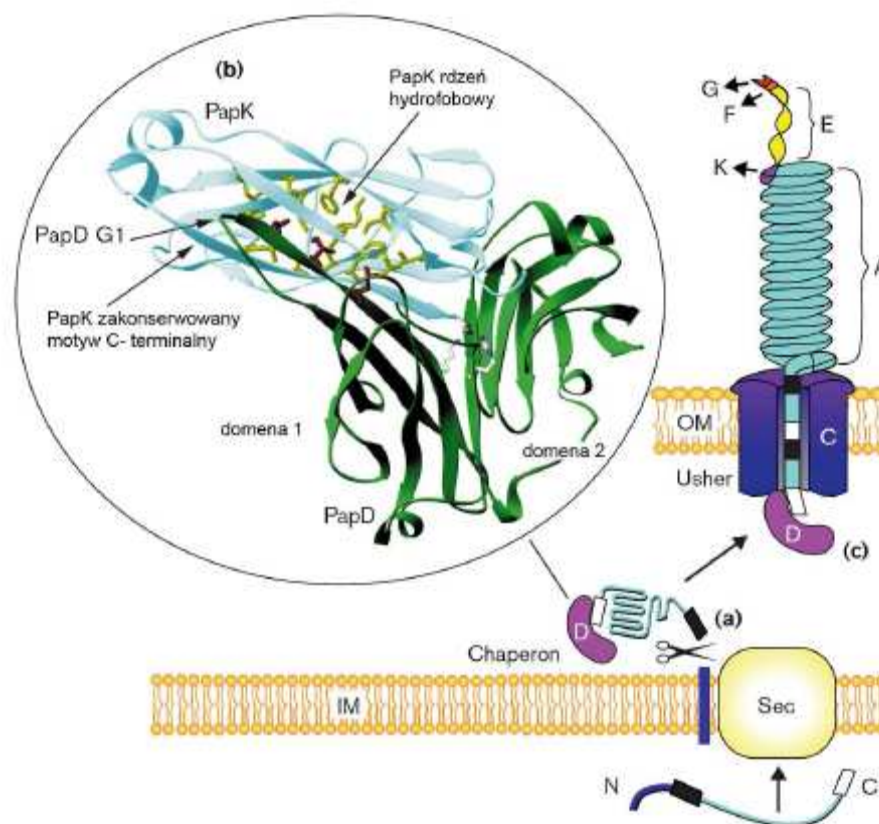
**Rys.16.** Schematy wybranych operonów kodujących różne adhezyjne struktury zewnątrzkomórkowe ulegające sekrecji z wykorzystaniem szlaku „chaperone/usher”.

Geny kodujące: białka opiekuńcze - kolor pomarańczowy, „usher” - kolor zielony, podjednostki budulcowe struktur zewnątrzkomórkowych - kolor niebieski (główne podjednostki strukturalne - ciemnoniebieski, pozostałe - jasnoniebieski). Kolorem szarym zaznaczono geny regulatorowe, kolorem różowym oznaczono geny kodujące białko inwazyjne.

Białka opiekuńcze wykazują co najmniej 30% podobieństwo w stosunku do wzorcowego białka PapD. Z tego względu nazwano je białkami PapD-podobnymi. Wysoką homologię wykazują również białka „usher”. Wysokie zróżnicowanie obserwuje się natomiast w sekwencji podjednostek strukturalnych zewnątrzkomórkowych polimerów adhezyjnych. Zróżnicowanie sekwencji podjednostek przekłada się na różnorodność zewnątrzkomórkowych struktur adhezyjnych, ulegających biogenezie za pomocą systemu „chaperone/usher”. I tak, mechanizm ten przyczynia się do powstania zarówno ustrukturyzowanych organelli adhezyjnych, jak pile czy fimbrie (*pap* - pile typu P, *fim* - pile typu 1, *dra* - fimbrie Dr, *fae* – pile K88, *fan* – pile K99, *sfa* - pile S) oraz układów amorficznych (*afa-3*) (Mol i Oudega, 1996). Wśród tych struktur występują zarówno układy homo-, jak i heterooligomeryczne.

Sekrecja według mechanizmu „chaperone/usher” zachodzi dwuetapowo: w pierwszej kolejności następuje transport białek do przestrzeni periplazmatycznej

przy udziale systemu Sec, a następnie transport przez błonę zewnętrzną (**Rysunek 17**).



**Rys. 17.** Struktura krystalograficzna kompleksu „chaperone” PapD–podjednostka piliowa PapK i mechanizm biogenezy pili typu P na drodze „chaperone” PapD–„usher” PapC (Thanassi i Hultgren, 2000). Transport podjednostki piliowej do perioplazmy zachodzi za pośrednictwem systemu Sec. N-terminalna sekwencja sygnałowa odcinana jest przez peptydazę sygnałną (zlokalizowaną w błonie wewnętrznej). Podjednostki piliowe wychwytywane są w perioplazmie przez białko PapD. Kompleks białkowy „chaperone”-podjednostka piliowa transportowany jest do kanału PapC zlokalizowanego w błonie zewnętrznej.

Przetransportowane do perioplazmy białka zostają związane zakonserwowanym C-końcem z białkiem opiekuńczym, które warunkuje poprawne zwiniecie się białek podjednostkowych w strukturę natywną. Białko opiekuńcze zapobiega także przedwczesnym interakcjom pomiędzy białkami podjednostkowymi w perioplazmie. W przypadku braku białek opiekuńczych podjednostki piliowe tworzą agregaty, degradowane przez perioplazmatyczne proteazy (głównie proteazę DegP).

Kolejnym etapem w biogenezie pili/fimbrii jest transport białka związanego z białkiem opiekuńczym do błony zewnętrznej, w której umiejscowione jest białko kanałotwórcze („usher”). Interakcja kompleksu białka opiekuńczego z białkiem

kanałowym, powoduje oddysocjowanie cząsteczki białka od białka opiekuńczego, a po przetransportowaniu białka przez zewnątrz błonowe białko kanałowe, na skutek interakcji pomiędzy białkami podjednostkowymi następuje formowanie się pili/fimbrii na powierzchni komórki.

## 2. MATERIAŁY

### 2.1. Szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* Top 10F' – F' *lac I<sup>q</sup> Tn10* (Tet<sup>R</sup>), *mcrAΔ* (*mrr*-*hsd RMS* –*mcr BC*)  $\phi$  80' *lacZΔ15*,  $\Delta$ *lacX74* *deo R* *recA1* *ava D139 Δ(ava –leu)* F697 *gal U gal K rpsL* (*strR*) *end A1nup G* (Invitrogen).

Genetyczna konstrukcja bakterii *E. coli* Top10F' umożliwia wstępne klonowanie genów poprzez zwiększenie efektywności procesu transformacji bakterii obcym materiałem genetycznym. Wstępny etap klonowania ma na celu otrzymanie jak największej ilości DNA rekombinantowego plazmidu celem analizy i dalszych modyfikacji enzymatycznych.

- *Escherichia coli* BL21(DE3) - F' *ompT gal [dcm] hsd S<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>* : an *E. coli* B strain) (Invitrogen).

Szczep bakteryjny *E. coli* BL21(DE3) jest stabilnym lizogenem  $\lambda$ DE3, zawierającym na chromosomie gen polimerazy RNA T7 pod kontrolą promotora *lacUV5*, co stwarza możliwość wykorzystania tego szczepu do ekspresji białek w układzie Tabora-Studiera (Studier i wsp., 1990).

- *E. coli* IH11128 – kliniczny izolat syntetyzujący fimbrie Dr (Nowicki i wsp., 1986; Goluszko i wsp., 1997a).
- *E. coli* DR14 – insercyjny mutant skonstruowany na bazie szczepu IH11128, zawierający mutację w obrębie genu *draC* kodującego zewnątrz błonowe białko kanałowe DraC (Nowicki i wsp., 1986; Goluszko i wsp., 1997a).
- *E. coli* H10407 – enteropatogeny szczep *E. coli* (serotyp O78:H11), wyizolowany z płynnego stolca pacjenta z uporczywą cholero-podobną, *Vibrio*-negatywną biegunką (Evans i wsp., 1973).
- *E. coli* MT13 - insercyjny mutant skonstruowany na bazie szczepu *E. coli* H10407, zawierający mutację w obrębie genu *gspD* kodującego zewnątrz błonowe białko kanałowe GspD (Tauschek i wsp., 2002).

### 2.2. DNA

- pBJN406 – plazmid rekombinantowy otrzymany przez wklonowanie do plazmidu pACYC184 insertu zawierającego sekwencję nukleotydową całego operonu *dra*. Insert z sekwencją operonu *dra* otrzymano przez trawienie genomowego DNA pochodzącego z klinicznych szczepów *Escherichia coli* O75:K5:H enzymem

HindIII. Transformacja niepatogennych szczepów *E. coli* rekombinantowym plazmidem pBJN406 powoduje, że stają się one zjadliwe i wykazują zdolność do hemaglutynacji ludzkich erytrocytów oraz zdolność do inwazji ludzkich komórek nabłonkowych linii HeLa (Goluszko i wsp., 1997, Nowicki i wsp., 1989). Plazmid otrzymany od B. Nowicki, University of Texas (Galveston)

- pBJN4 - plazmid rekombinantowy, pochodna plazmidu pBJN406, zawierający insercję transpozonową (*draD::TnPhoA*) w obrębie genu *draD* kodującego białko inwazyjne DraD z sekwencją sygnałową (Nowicki i wsp., 1989). Plazmid otrzymany od B. Nowicki, University of Texas (Galveston)
- pBJN17 - plazmid rekombinantowy, pochodna plazmidu pBJN406, zawierający insercję transpozonową (*draE::TnPhoA*) w obrębie genu *draE* kodującego główną podjednostkę fimbrii Dr (Nowicki i wsp., 1989). Plazmid otrzymany od B. Nowicki, University of Texas (Galveston)
- pBJN417 - plazmid rekombinantowy, pochodna plazmidu pBJN406, zawierający insercję transpozonową (*draC::Tn5*) w obrębie genu *draC* kodującego zewnętrzne białko kanałowe DraC (Nowicki i wsp., 1989). Plazmid otrzymany od B. Nowicki, University of Texas (Galveston)
- pCC90 - plazmid rekombinantowy otrzymany przez wklonowanie do niskokopijnego plazmidu pACYC177 (niosący replikon p15A, co umożliwia plazmidowi pCC90 współistnienie w jednej komórce bakteryjnej razem z plazmidami z grupy ColE1) insertu DNA zawierającego sekwencję nukleotydową operonu *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych *draA* i *draF*. Inset DNA bez regionu promotorowego i genów regulatorowych *draA* i *draF* operonu *dra* (o wielkości 8600 par zasad) otrzymano poprzez wstępne trawienie DNA plazmidu pBJN406 (zawierającego całą sekwencję operonu *dra*) restryktazą EcoRI (po wprowadzeniu dodatkowego miejsca rozpoznania dla restryktazy EcoRI 45 par zasad powyżej genu *draB* w plazmidzie pBJN406). W ten sposób usunięto region promotorowy operonu *dra* podlegający kontroli przez mechanizm zmienności fazowej, mający wpływ na poziom ekspresji białek fimbrialnych. Następnie pozostały fragment DNA (flankowany przez miejsca rozpoznania dla restryktaz EcoRI i HindIII) z sekwencją operonu *dra* bez regionu regulatorowego wklonowano do wektora pACYC177 (pozwalającego na transkrypcję operonu *dra*

z promotora genu oporności na kanamycynę) (Carnoy i Moseley, 1997). Plazmid otrzymany od B. Nowicki, University of Texas (Galveston)

- pCC90DraDmut – plazmid rekombinantowy pCC90, w którym gen *draD* zastąpiono produktem amplifikacji zawierającym kodon stop w trzech ramkach odczytu. Plazmid ten uniemożliwia ekspresję genu kodującego białko DraD dzikiego typu (Zalewska i wsp., 2005). Plazmid skonstruowano w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej
- pCC90D54stop – plazmid rekombinantowy pCC90, w którym za pomocą mutagenyzy miejscowo-specyficznej trójka nukleotydowa GAC kodująca kwas asparaginowy (Asp54) została zastąpiona przez kodon stop. Plazmid ten uniemożliwia ekspresję genu kodującego białko DraE dzikiego typu (Carnoy i Moseley, 1997). Plazmid otrzymany od B. Nowicki, University of Texas (Galveston)
- pET30b+ – plazmidowy wektor ekspresyjny o wielkości 5422 pz, zawierający silny promotor  $\phi 10T7lac$ , terminator transkrypcji faga T7 oraz origin replikacji pochodzące z wektora pBR322 (Novagen)
- plnvDsyg-C-His – plazmid rekombinantowy, otrzymany przez wklonowanie do plazmidu pET30Ek/LIC insertu zawierającego sekwencję nukleotydową genu *draD* z sekwencją sygnałną. Plazmid ten umożliwia ekspresję genu kodującego białko DraD z domeną polihistydynową na C-końcu (Zalewska i wsp., 2005). Plazmid skonstruowano w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej
- plnvDsygstop - plazmid rekombinantowy, otrzymany przez wklonowanie do plazmidu pET30Ek/LIC insertu zawierającego sekwencję nukleotydową genu *draD* z sekwencją sygnałną. Plazmid ten umożliwia ekspresję genu kodującego białko DraD bez domen fuzyjnych (Zalewska i wsp., 2005). Plazmid skonstruowano w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej
- pCre705 – plazmid rekombinantowy zawierający origin replikacji pSC101, gen kodujący rekombinazę Cre faga P1 oraz gen oporności na chloramfenikol. Ekspresja genu *cre* zachodzi w temperaturze 30°C, inaktywacja w 42°C. Plazmid otrzymany od dr Mariana Sęktasa, Uniwersytet Gdański
- Marker wielkości DNA 50 bp (Fermentas): 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 pz
- Marker wielkości DNA 1 kbp (Fermentas): 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 6000, 8000, 10000 pz

- Marker wielkości DNA – Ideal (DNA Gdańsk): 700, 900, 1241, 1827, 2555, 3653, 5982, 9276 pz.

### 2.3. Podłoża

- |  |       |
|--|-------|
| • <u>podłoże płynne LB</u> (pH 7,0 - 7,2): | w g/l |
| Trypton                                    | 10    |
| ekstrakt drożdżowy                         | 5     |
| NaCl                                       | 10    |
| • <u>podłoże stałe LA:</u>                 | w g/l |
| Trypton                                    | 10    |
| ekstrakt drożdżowy                         | 5     |
| NaCl                                       | 10    |
| Agar                                       | 15    |

### 2.4. Antybiotyki

- chloramfenikol – roztwór wyjściowy: 34 mg/ml 70% etanolu
- kanamycyna – roztwór wyjściowy: 20 mg/ml H<sub>2</sub>O
- tetracyklina – roztwór wyjściowy: 12,5 mg/ml etanolu
- ampicylina – roztwór wyjściowy: 50 mg/ml H<sub>2</sub>O.

### 2.5. Odczynniki i roztwory

- 1 M roztwór IPTG (izopropylotiogalaktozyd) – 238 mg/ml H<sub>2</sub>O (Sigma)
- agarozą (Prona)
- Tris-HCl – (hydroksymetylo-aminoetan) (Sigma)
- Coomasie Brilliant Blue G-250 (Sigma)
- akrylamid (Serva)
- TEMED (N,N,N,'N'-tetrametyloetylenodiamina) (Serva)
- nadsiaraczan amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Serva)
- EDTA (sól sodowa etylenodiaminy) (Sigma).

### 2.6. Roztwory do elektroforezy agarozowej

- bufor do elektroforezy agarozowej TBE (pH 8,3)

Roztwór podstawowy 10 razy stężony	w g/l
Tris-HCl	108
EDTA	9,3
kwasy borowe	55
dopełnić wodą do 1000 ml	

Stężenie robocze (1x stęż.): 90 mM Tris-boran, 2 mM EDTA.

- roztwór podstawowy bromku etydydy EtBr – 5 mg/ml (Sigma)
- barwnik do nanoszenia próbek na żel w g/10 ml H<sub>2</sub>O
 

błękit bromofenolowy	0,025
sacharoza	8
EDTA	1,48

## 2.7. Roztwory do elektroforezy poliakryloamidowej

- 30% roztwór akrylamidów – (29% akrylamidu, 1% N,N'-metyleno-bisakrylamidu)
- W celu sporządzenia 30% roztworu akrylamidów należy rozpuścić 29 g akrylamidów i 1 g N,N-metyleno-bisakrylamidu w 70 ml wody. Tak przygotowany roztwór należy przechowywać w ciemnej butelce w temperaturze 4°C.
- żel zagęszczający (5%) do elektroforezy poliakryloamidowej (objętość końcowa żelu – 3 ml):
 

H <sub>2</sub> O	2,1 ml
akrylamidy 30%	0,5 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,38 ml
10% SDS	0,03 ml
10% nadsiarczan amonu	0,03 ml
TEMED	0,005 ml
- żel rozdzielający 15% (objętość końcowa żelu – 5 ml):
 

H <sub>2</sub> O	1,1 ml
akrylamidy 30%	2,5 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml
10% nadsiarczan amonu	0,05 ml
TEMED	0,004 ml



- roztwór do nanoszenia próbek na żel:
  - 1% SDS – powoduje powierzchniową denaturację białek; nadaje im wypadkowy ładunek ujemny
  - 1M  $\beta$ -merkaptoetanol – redukuje mostki disiarczkowe, które mogą występować w cząsteczkach białek
  - 0,25% błękit bromofenolowy – nadaje zabarwienie próbkom, umożliwiając obserwację migracji białek w żelu
  - 10% glicerol – stanowi obciążenie próbek, ułatwiając ich nanoszenie do studzienek żelu
  - 1M Tris-HCl (pH 6,8) – czynnik buforujący.
- roztwór barwiący do żeli po przeprowadzonej elektroforezie SDS-poliakryloamidowej:
 

Coomasie Brilliant Blue R-250	0,25 g
metanol	50 ml
lodowaty kwas octowy	10 ml
woda	40 ml
- roztwór odbarwiający do żeli poliakryloamidowych:
 

metanol	300 ml
lodowaty kwas octowy	100 ml
woda	600 ml
- bufor do elektroforezy poliakryloamidowej Tris-Glicyna 1x stężony, pH 8,3  
Roztwór podstawowy 5 razy stężony, skład na 1 litr roztworu:
 

Tris-HCl	15,1 g
glicyna	94 g
10% SDS	50 ml

 Dopełnić wodą do 1000 ml

## 2.8. Materiały do izolacji ultraczystego plazmidowego DNA

- bufor L1: 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA
- bufor L2: 0,2 M NaOH; 1% SDS
- bufor L3: 3 M octanu potasu (pH 4,8)
- roztwór G: 8 M chlorowodorek guanidyny
- roztwór A1 lub 96% EtOH

- bufor TE (pH 8,0): 10 mM TRIS; 1 mM EDTA.

## 2.9. Materiały do izolacji genomowego DNA

- roztwór płuczący A1
- roztwór lizujący LT
- bufor Tris-HCl
- Proteinaza K
- minikolumnki ze złożem krzemionkowym (A&A Biotechnology)
- probówki 2 ml.

## 2.10. Roztwory do izolacji fragmentu DNA z żelu agarozowego

- roztwór płuczący A1
- roztwór R7S rozpuszczający agarozę
- izopropanol
- minikolumnki ze złożem krzemionkowym (A&A Biotechnology).

## 2.11. Enzymy i bufor reakcyjne

- Enzymy restrykcyjne i bufor do trawienia:

Enzym restrykcyjny	Rozpoznawana sekwencja	Bufor do trawienia	Optymalna temperatura trawienia
HindIII (BioLabs)	5'-A/AGCTT-3'	NEBuffer 2	37°C
SphI	5'-GCATG/C-3'	NEBuffer 2	37°C
NdeI (BioLabs)	5'-CA/TATG-3'	NEBuffer 4	37°C
BsrGI	5'-T/GTACA-3'	NEBuffer 2	37°C

### Skład buforów:

- NEBuffer 2: 50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ditiotritol
- NEBuffer 4: 50 mM octan potasu; 20 mM Tris-octan; 10 mM octan magnezu; 1 mM ditiotritol
- Polimeraza DNA *Pwo* (DNA Gdańsk II) – rekombinantowa polimeraza DNA *Pyrococcus woesei*, wykazująca aktywność polimeryzacji 5'-3' i aktywność

egzonukleazy 3'-5', charakteryzująca się ok. 12 razy większą wiernością syntezy DNA niż polimeraza *Taq*

- Enzym i odczynniki do reakcji ligacji:
  - ligaza polinukleotydowa faga T4 (Epicentre);
  - bufor do reakcji ligacji (Epicentre): 100 mM NaCl, 50 mM Tris (pH=7,5); 0,1 mM EDTA; 1 mM ditiotreitol; 0,1% Triton X-100; 50% glicerol;
  - roztwór ATP (Epicentre).

## 2.12. Bufory i odczynniki do reakcji PCR

- bufor do reakcji PCR dla polimerazy DNA *Pwo* (1x stężony)
 

Tris-HCl (pH 8,8)	10 mM
MgCl <sub>2</sub> (DNA Gdańsk II)	2 mM
KCl	50 mM
Triton X-100	0,1%
- trifosforany deoksynukleozydów (dNTP) (DNA Gdańsk II):
 

dATP	2,5 mM
dGTP	2,5 mM
dCTP	2,5 mM
dTTP	2,5 mM
- matryca do reakcji PCR – DNA genomowe szczepów *E. coli* BL21(DE3), IH11128 oraz DR14
- startery (DNA Gdańsk II):

1) Startery (DNA Gdańsk II) wykorzystane do przeprowadzenia mutagenyzy miejscowo-specyficznej na matrycy DNA plazmidu pCC90, w celu wprowadzenia kodonu stop w obrębie genu *draC*:

- starter N-terminalny DraC1mut:

5' – GCGGCCATGCTGTGAAGGTGGCGGGAAGG – 3'  
└─┬─┘  
kodon stop

- starter C-terminalny DraC2mut:

5' – CCTTCCCGCCACCTCACAGCATGGCCGC – 3'  
└─┬─┘  
kodon stop

2) Startery wykorzystane w celu potwierdzenia obecności operonu *gsp* w analizowanych szczepach bakteryjnych (Tauschek i wsp., 2001):

- starter P78      5'–TTCGGAAATCGCCCGCGTGC–3'
  - starter P109    5'–TCCACCTTCGAGACTTCC–3'
- } Amplifikacja fragmentu genu *gspD* o wielkości 1 kpz
- 
- starter P5      5'–GCAGCAGGTGACTAACGGC–3'
  - starter P12     5'–CAGGGCTTAACCACGGGTC–3'
- } Amplifikacja fragmentu genu *gspK* o wielkości 1,2 kpz

3) Startery wykorzystywane do potwierdzenia obecności insertu DNA w obrębie docelowego fragmentu genu *gspD* w szczepie laboratoryjnym *E. coli* BL21(DE3) i klinicznym *E. coli* DR14:

- starter N-terminalny GspD-1:

5'–ATT CGC CGT GCT CAG GTG C–3'

- starter C-terminalny GspD-2:

5'–GTC GGA CGG ATA AAC ACC ATC AGG–3'

4) Startery wykorzystane do przeprowadzenia nokautu genu *gspD* (poprzez insercję zmodyfikowanego intronu RNA grupy II) laboratoryjnego szczepu *E. coli* BL21(DE3) oraz klinicznego szczepu *E. coli* DR14:

- starter IBS:

5'–AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGGCGGCTAAAAAGTGCGCCAGATAGGGTG–3'

- starter EBS1d:

5'–CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCTAAAAACGTA ACTTACCTTTCTTTGT–3'

- starter EBS2:

5'–TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCCGCCTCGATAGAGGAAAGTGTCT–3'

- starter EBS Universal (Targetron Gene Knockout System)

-spc-starter:

5'–AAAAAAGCTTCCGTTTATTTTTCTACCCATATCCTTGAAGCGGTGTTATAATG  
CCGCGCCCTCGATAAAAAGAGCTTATAATTATCCTTA–3'

Podkreślona sekwencja DNA – sekwencja promotora spc.

5) Startery wykorzystane do klonowania genu *gspD*:

- SPC-Sph

5'-ATAGCATGCCCGTTTATTTTTCTACCCATATCCTTGAAGCGGTGTTATAATG  
SphI  
CCGCGCCCTCGATACCAATAATTTTGTTTAACTTTAAAAGGAGACAGCTATGGG  
GCCGGGCGTACAGGGG-3'

Podkreślona sekwencja DNA – sekwencja promotora spc.

- *gspD*-Hind

5'-TAAAGCTTTTAACGCGTTCTCCCGGCATTGAAGAACGCGCGAACTTCCGGCG  
HindIII  
GTAAGGCCTGGTTTTGCGC-3'.

- polimeraza DNA *Pwo* (DNA Gdańsk II)

### 2.13. Odczynniki do mutagenyzy miejscowo-specyficznej

W celu przeprowadzenia mutagenyzy ukierunkowanej wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), w skład którego wchodzi:

- polimeraza DNA *PfuTurbo* (2,5 U/μl)
- bufor do reakcji PCR (10 x stężony)
- mieszanina trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP)
- enzym restrykcyjny DpnI (10 U/μl).

### 2.14. Odczynniki do nokautu genowego

W celu przeprowadzenia nokautu genowego wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw TargeTron™ Gene Knockout System (Sigma), w skład którego wchodzi:

- matryca w postaci fragmentu intronu RNA grupy II, przeznaczona do reakcji PCR

- starter EBS Universal
- liniowa forma wektora pACD4K-C-loxP (20 ng/μl)
- mieszanina JumpStart™ REDTag
- enzym restrykcyjny HindIII (20 U/μl)
- enzym restrykcyjny BsrGI (10 U/μl)
- 10 x stężony bufor do trawienia enzymami restrykcyjnymi.

## 2.15. Materiały do przygotowania komórek kompetentnych

- podłoże płynne LB
- chlorek wapnia – roztwór 100 mM (Sigma).

## 2.16. Bufory i odczynniki do techniki Western blotting

### 1) Przeciwciała pierwotne:

- poliklonalne królicze przeciwciała anty-DraD, specyficzne dla białka inwazyjnego DraD
- poliklonalne królicze przeciwciała anty-DraE, specyficzne dla białka adhezyjnego DraE (otrzymane przez zespół naukowy prof. B. Nowickiego z The University of Texas Medical Branch at Galveston)

### 2) Przeciwciała wtórne:

- małpie przeciwciała specyficzne dla przeciwciał króliczych znakowane peroksydazą chrzanową typu IV (ang.: Anti-Rabbit IgG from monkey, Peroxidase Conjugate; Sigma).

### 3) Żel poliakrylamidowy z SDS z rozdzielonymi w nim białkami.

### 4) Odczynniki:

- bufor do transferu białek z żelu poliakryloamidowego na błonę nitrocelulozową (pH 8,3), skład na 1 litr roztworu:

Tris-HCl 25 mM	3,03 g
glicyna 192 mM	14,4 g
metanol 20%	200 ml
Dopełnić wodą do 1000 ml	

- bufor TBS-T (ang. Tris-buffered saline-Tween); (pH 7,5), skład na 1 litr roztworu:

Tris-HCl 20 mM	2,42 g
----------------	--------

NaCl 500 mM	29,0 g
0,05% Tween 20	500 µl

Dopełnić wodą do 1000 ml

- bufor TBS-T – 1% M (ang.: Tris-buffered saline-Tween-non-fat milk); (pH 7,5), skład na 1 litr roztworu:

Tris-HCl	2,42 g
NaCl	29,0 g
0,05% Tween 20	500 µl
1% odtłuszczone mleko w proszku	10,0 g

Dopełnić wodą do 1000 ml

- bufor TBS-T 3% M (ang.: Tris-buffered saline-Tween-non-fat milk); (pH 7,5), skład na 1 litr roztworu:

Tris-HCl	2,42 g
NaCl	29,0 g
0,05% Tween 20	500 µl
3% odtłuszczone mleko w proszku	30,0 g

Dopełnić wodą do 1000 ml

#### 5) Markery białkowe:

- marker firmy Sigma C6210 -  $M_r$ : 26,600; 17,000; 14,200; 6,500; 3,496; 1,060 kDa.

#### 6) Błona nitrocelulozowa (45 micron, Sigma)

#### 7) Bibuła Whatman (Sigma)

#### 8) Odczynnik do detekcji DAB – 3,3'diaminobenzzydina, 3,3',4,4'-tetra-aminobifenyl otrzymywany w postaci tetrachlorowodoru ( $C_{12}H_{14}N_4 \cdot 4HCl$ ) (Sigma)

Stosowano roztwór tetrachlorowodoru DAB przez rozpuszczenie 6 mg tej substancji w 9 ml 0,05 M buforu Tris-HCl (pH 7,6).

#### 9) 30% roztwór $H_2O_2$ . Dodawano 0,1 ml $H_2O_2$ na 9 ml roztworu odczynnika do detekcji DAB w 0,05 M buforze Tris-HCl (pH 7,6)

#### 10) 0,3% roztwór $NiCl_2$ . Dodawano 1 ml $NiCl_2$ na 9 ml roztworu odczynnika do detekcji DAB w 0,05 M buforze Tris-HCl (pH 7,6).

## 2.17. Odczynniki do izolacji białek podjednostkowych DraE fimbrii Dr ekspymowanych na powierzchni komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów *E. coli*

- bufor PBS (pH 7,5)

80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,67 g
20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,76 g
100 mM HCl	5,85 g

dopełnić wodą do 1000 ml

- 40 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w buforze PBS
- błona dializacyjna (MWCO>100,000) Sigma

## 2.18. Bufory i odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej

- bufor PBS (pH 7,5): 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl
- bufor PBSglyc – buforowany roztwór soli fizjologicznej (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,5) i 10% glicerolu
- przeciwciała pierwotne:
  - poliklonalne królicze przeciwciała anty-Dr, specyficzne dla białka adhezyny DraE (Pham, 1997)
  - poliklonalne królicze przeciwciała anty-DraD, specyficzne dla białka inwazyjności DraD.
- przeciwciała wtórne:
  - kozie przeciwciała specyficzne dla przeciwciał króliczych (ang. Anti-Rabbit IgG from goat, Whole Molecule; Sigma) znakowane izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Surowicę zawierającą te przeciwciała otrzymano przez immunizację kóz oczyszczonymi immunoglobulinami IgG pochodzenia króliczego. Następnie w celu uzyskania specyficznych przeciwciał otrzymaną surowicę odpornościową poddano immunospecyficznemu oczyszczaniu, w celu usunięcia wszystkich immunoglobulin, które nie wiążą specyficznie króliczych przeciwciał IgG. W następnym etapie oczyszczone przeciwciała zostały skoniugowane z FITC i poddane dializie do buforu PBS
  - kozie przeciwciała specyficzne dla przeciwciał króliczych (ang. Anti-Rabbit IgG from goat, Whole Molecule; Sigma) znakowane izotiocyanianem



tetrametylorodaminy (TRITC). Surowicę zawierającą te przeciwciała otrzymano przez immunizację kóz oczyszczonymi immunoglobulinami IgG pochodzenia króliczego. Następnie w celu uzyskania specyficznych przeciwciał otrzymaną surowicę odpornościową poddano immunospecyficznemu oczyszczaniu, w celu usunięcia wszystkich immunoglobulin, które nie wiążą specyficznie króliczych przeciwciał IgG. W następnym etapie oczyszczone przeciwciała zostały skoniugowane z TRITC i poddane dializie do buforu PBS.

- Olejek immersyjny (Olympus)
- Szkiełka mikroskopowe (76 x 26 mm) i szkiełka nakrywkowe (15 x 15 mm) (Medlab)

### **2.19. Odczynniki do hodowli linii komórkowej HeLa**

- MEM – ang. minimal essential medium (Gibco)
- FBS – ang. fetal bovine serum (Gibco)
- roztwór 0,5% trypsyny i 0,2% EDTA (Sigma)
- 50 x stężony roztwór penicyliny i streptomycyny (Sigma).

### **2.20. Odczynniki i materiały stosowane w barwieniu metodą Giemsy**

- barwnik Giemsy (Sigma)
- 70% metanol
- jałowa woda
- linia komórek HeLa – wyprowadzona z guzów nowotworowych raka szyjki macicy (Helen Larsen)

### **2.21. Aparatura**

- aparat do elektroforezy agarozowej Delfin (DNA Gdańsk II)
- aparat do elektroforezy poliakrylamidowej (DNA Gdańsk II)
- autoklaw (Systec)
- aparatura do techniki Western Blotting (Fermentas)
- mikrowirówka Sigma 1-5 nr 12124 PP 214/98, max 24 x 5 g 14000 min<sup>-1</sup>
- wirówka Sigma 1-15, nr 66315 (Sigma)
- pH-metr (Sigma)

- spektrofotometr firmy Pharmacia
- termocykler (Perkin Elmer 2400)
- termoblok (DNA Gdańsk II)
- transiluminator UV (Sigma)
- waga laboratoryjna (AXIS)
- zasilacz stabilizowany prądu stałego (DNA Gdańsk II)
- mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60
- inkubator CO<sub>2</sub> (HERA cell 150, Heraeus)
- komora laminarna (HERA safe KS12, Heraeus)

### **3. METODY**

#### **3.1. Hodowle bakteryjne**

- hodowle bakterii *E. coli* w pożywce LB z dodatkiem odpowiednich antybiotyków prowadzone w wytrząsarce powietrznej, przez noc (12-24 h), w temperaturze 37°C.
- hodowle bakterii *E. coli* na podłożu LA wylanym na płytki Petriego z dodatkiem odpowiednich antybiotyków prowadzone w cieplarni, w temperaturze 37°C.

#### **3.2. Izolacja plazmidowego DNA**

Izolacja plazmidowego DNA została wykonana za pomocą zestawu do izolacji ultraczystego plazmidowego DNA Miniprep plus (A&A Biotechnology).

#### **3.3. Izolacja genomowego DNA**

Do izolacji genomowego DNA ze szczepów bakteryjnych, wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw do izolacji Genomic Mini (A&A Biotechnology).

#### **3.4. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego**

Do izolacji fragmentów DNA z żelu agarozowego, wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw GelOut (A&A Biotechnology).

#### **3.5. Elektroforeza agarozowa**

Elektroforezę agarozową prowadzono w 1% żelu agarozowym (w zależności od wielkości rozdzielanych fragmentów DNA) w aparacie do elektroforezy horyzontalnej w buforze TBE (Materiały, pkt. 2.6). Agarozę rozpuszczono przez zagotowanie w buforze TBE, a po schłodzeniu do temperatury ok. 50°C oraz dodaniu bromku etydyny do końcowego stężenia 0,5 µg/ml (Materiały, pkt. 2.6) żel wylano na płytkę aparatu do elektroforezy. Próbkę nanoszono do kolejnych studzienek w żelu agarozowym przykrytym buforem elektrodowym, po uprzednim wymieszaniu ich z barwnikiem (Materiały, pkt. 2.6) w stosunku objętościowym 1:10. Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu prądu 80 mA, przez 30-60 min. Detekcję prowadzono przy świetle UV, o długości fali 312 nm, emitowanym przez transiluminator.

### 3.6. Konstrukcja plazmidu pCC90DraCmut (mutageneza ukierunkowana)

#### Amplifikacja DNA plazmidu pCC90

- zastosowane startery – DraC1mut i DraC2mut
- wykorzystana polimeraza DNA – polimeraza DNA *PfuTurbo* (Stratagene)
- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
95	30	
95	30	18
55	60	
68	300	
70	300	

Schłodzenie do 4°C.

- Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składniki	Objętość [μl]
Matryca DNA plazmidu pBJN406	2
Redestylowana woda jałowa	38,5
Bufor dla polimerazy DNA <i>PfuTurbo</i> (10xstężony)	5
dNTP	1
Starter DraC1mut	1,25
Starter DraC2mut	1,25
Polimeraza DNA <i>PfuTurbo</i>	1

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl

#### Usunięcie macierzowego DNA

Endonukleaza DpnI (sekwencja rozpoznania 5' – Gm<sup>6</sup>ATC – 3') to enzym restrykcyjny specyficzny dla zmetylowanej formy DNA. Jest on wykorzystywany do usuwania matrycowego DNA z mieszaniny po reakcji PCR w celu wyselekcjonowania zsyntetyzowanego DNA z wprowadzoną mutacją.

W celu usunięcia matrycowego DNA do mieszaniny reakcyjnej zawierającej zamplifikowany produkt dodano 1 μl endonukleazy DpnI (10 U/μl), a następnie inkubowano w 37°C przez 1 h.

### 3.7. Określenie obecności operonu *gsp* w szczepach *E. coli*

- zastosowane startery - P78 i P109 – amplifikacja fragmentu genu *gspD*  
o wielkości 1 kpz  
- P5 i P12 – amplifikacja fragmentu genu *gspK*  
o wielkości 1,2 kpz
- wykorzystana polimeraza DNA – polimeraza DNA *Pwo*
- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
94	300	
94	30	35
55	30	
72	150	
72	350	

Schłodzenie do 4°C.

- skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik:	Objętość [μl]
Matryca DNA	1
Redestylowana woda jałowa	31
Bufor dla polimerazy DNA <i>Pwo</i> (10x stęż.)	5
dNTP's	5
Starter GspD-1	2
Starter GspD-2	2
MgCl <sub>2</sub>	3
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	1

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl.

### 3.8. Nokaut genu *gspD* laboratoryjnego szczepu *E. coli* BL21(DE3) i klinicznego szczepu *E. coli* DR14 z wykorzystaniem intronu RNA grupy II

System TargeTron wykorzystuje zdolność intronów grupy RNA II do samodzielnej insercji w obrębie genu docelowego dzięki aktywności kompleksu RNA-białko (ang. RNA-protein complex – RNP) ekspresowanego z jednego plazmidu.

Białko wchodzące w skład kompleksu tzw. białko kodowane przez intron (ang. Intron Encoded Protein, IEP) posiada cztery funkcje istotne podczas procesu włączania intronu do sekwencji DNA gospodarza. Są to: (1) zdolność do prawidłowego składania RNA intronu, (2) zdolność do wiązania DNA gospodarza w celu odnalezienia przez kompleks RNP sekwencji docelowej, (3) aktywność endonukleazy oraz (4) aktywność odwrotnej transkryptazy. Pierwszy etap podczas nokautu genowego, polega na odpowiedniej modyfikacji fragmentu DNA kodującego intron RNA grupy II przy wykorzystaniu reakcji PCR i odpowiednio zaprojektowanych starterów. Modyfikacja ta umożliwi inaktywację wybranego genu poprzez rekombinację RNA intronu w ściśle określonym miejscu (RNA intronu zostaje zmienione w taki sposób aby specyficznie „rozpoznało” ściśle określoną sekwencję DNA). Kolejny etap w procesie mutagenyzy polega na transformacji komórek gospodarza bakteryjnego DNA plazmidu kodującego odpowiednio zmodyfikowany intron RNA. W komórce bakteryjnej zachodzi transkrypcja intronu RNA oraz ekspresja białka kodowanego przez intron (IEP). Powstałe białko wiąże się następnie do prekursora RNA intronu i powoduje jego poprawne złożenie. Prawidłowo złożone RNA intronu zostaje związane przez IEP (powstaje kompleks RNP). Kompleks ten wiąże się z DNA genomowym gospodarza i następuje skanowanie genomu w celu odnalezienia sekwencji docelowej. Po odnalezieniu przez kompleks RNP miejsca docelowego następuje przecięcie nici DNA (dzięki aktywności endonukleazy IEP) i włączenie RNA intronu do odpowiedniej nici DNA. Następnie IEP dzięki aktywności odwrotnej transkryptazy, dosyntetyzuje cDNA intronu. W efekcie, na skutek rekombinacji RNA intronu z DNA genomowym, następuje wyłączenie genu docelowego. Metoda ta, w przeciwieństwie do konwencjonalnej metody mutagenyzy wykorzystującej transpozony, jest miejscowo-specyficzna (zlokalizowana), a nie przypadkowa.

### **3.8.1. Modyfikacja fragmentu intronu grupy II przy użyciu reakcji PCR**

- zastosowana mieszanina starterów:  
2 µl startera IBS – końcowe stężenie 100 µM,  
2 µl startera EBS1d – końcowe stężenie 100 µM,  
2 µl startera EBS2 – końcowe stężenie 20 µM,  
2 µl startera EBS Universal – końcowe stężenie 20 µM;

- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
94	30	
94	15	30
55	30	
72	30	
72	120	

Schłodzenie do 4°C.

- Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składniki	Objętość [μl]
Matryca DNA fragmentu intronu	1
Redestylowana woda jałowa	23
Mieszanina starterów IBS, EBS1d, EBS2 oraz EBS Universal	1
Mieszanina JumpStart REDTag	25

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl

### 3.8.2. Modyfikacja fragmentu intronu grupy II w celu wprowadzenia promotora spc

- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
94	30	
94	15	30
55	30	
72	30	
72	120	

Schłodzenie do 4°C.

- Skład mieszaniny reakcyjnej:

Składniki	Objętość [μl]
Matryca DNA fragmentu intronu	1
Redestylowana woda jałowa	22
spc-starter	1
Starter EBS1d	1
Mieszanina JumpStart REDTag	25

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl

### 3.8.3. Trawienie zmodyfikowanego fragmentu intronu przy użyciu enzymów restrykcyjnych HindIII oraz BsrGI

- Mieszanina reakcyjna:

Składniki	Objętość [μl]
Oczyszczony produkt PCR (zmodyfikowany fragment intronu)	8
10 x stężony bufor do trawienia	2
enzym HindIII	1
enzym BsrGI	1
Redestylowana woda jałowa	8

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej - 20 μl

- Profil temperaturowo-czasowy reakcji trawienia:

Temperatura [°C]	Czas [min]
37	30
60	30
80	10

### 3.8.4. Reakcja ligacji zmodyfikowanego fragmentu intronu RNA z wektorem pACD4K-C-loxP

Reakcję ligacji prowadzono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej: DNA wektora i insertu, buforu dla ligazy DNA, roztworu ATP oraz ligazy DNA faga T4. Tak



przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 2 do 3 h w temperaturze pokojowej.

- Skład mieszaniny ligacyjnej:

Skład mieszaniny ligacyjnej	Objętość [μl]
DNA insertu	6
DNA wektora pACD4K-C-loxP	2
ATP	0,84
Ligaza DNA T4	1
Bufor do ligacji (10x stęż.)	2,11
Woda redestylowana	10

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 21,95 μl.

### 3.8.5. Transformacja komórek *E. coli* BL21(DE3) przy użyciu DNA mieszaniny ligacyjnej i ekspresja intronu RNA grupy II

W celu transformacji komórek kompetentnych szczepu *E. coli* BL21(DE3) plazmidowym DNA wykonano następujące czynności:

- do 50 μl zawiesiny komórek kompetentnych w probówce Eppendorfa dodano 1 μl mieszaniny ligacyjnej, zmieszano i inkubowano w lodzie przez 10 min
- szok termiczny: po inkubacji umieszczono probówki Eppendorfa z mieszaniną komórek kompetentnych i mieszaniny ligacyjnej w termobloku, w temperaturze 42°C, na 40 s, następnie przeniesiono probówki do lodu na 2 min
- przeniesiono zawiesinę komórek z DNA mieszaniny ligacyjnej do 450 μl pożywki LB bez antybiotyku i inkubowano w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 37°C, przez 1 h, w celu wywołania ekspresji genów odpowiedzialnych za oporność komórek bakteryjnych na antybiotyk i ich wzrostu
- przeniesiono 100 μl mieszaniny transformacyjnej do 3 ml pożywki LB zawierającej 25 μg/ml chloramfenikolu oraz 1% glukozy i inkubowano w temperaturze 37°C przez noc (ok. 18 h) z wytrząsaniem

- przeniesiono 40  $\mu$ l hodowli nocnej do 2 ml pożywki LB zawierającej 25  $\mu$ g/ml chloramfenikolu oraz 1% glukozy i inkubowano w temperaturze 37°C w wytrząsarce powietrznej do  $OD_{600} = 0,2$
- wykonano indukcję ekspresji poprzez dodanie 10  $\mu$ l 100 mM roztworu IPTG i inkubowano w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C, przez 30 min
- odwirowano komórki w mikrowirówce (3000xg, 10 min); uzyskany osad komórkowy zawieszono w 1 ml pożywki LB zawierającej 1% glukozy i kontynuowano hodowlę w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C, przez 1 h
- wysiano 100  $\mu$ l hodowli na płytce z podłożem LA zawierającym 25  $\mu$ g/ml kanamycyny
- płytki inkubowano w temperaturze pokojowej, przez 2-3 dni.

### **3.8.6. Transformacja komórek *E. coli* DR14 przy użyciu DNA mieszaniny ligacyjnej i ekspresja intronu RNA grupy II**

W celu transformacji komórek kompetentnych szczepu *E. coli* BL21(DE3) plazmidowym DNA wykonano następujące czynności:

- do 50  $\mu$ l zawiesiny komórek kompetentnych w probówce Eppendorfa dodano 1  $\mu$ l mieszaniny ligacyjnej, zmieszano i inkubowano w lodzie przez 10 min
- szok termiczny: po inkubacji umieszczono probówki Eppendorfa z mieszaniną komórek kompetentnych i mieszaniny ligacyjnej w termobloku, w temperaturze 42°C, na 40 s, następnie przeniesiono probówki do lodu na 2 min
- przeniesiono zawiesinę komórek z DNA mieszaniny ligacyjnej do 450  $\mu$ l pożywki LB bez antybiotyku i inkubowano w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 37°C, przez 1 h, w celu wywołania ekspresji genów odpowiedzialnych za oporność komórek bakteryjnych na antybiotyk i ich wzrostu
- przeniesiono 100  $\mu$ l mieszaniny transformacyjnej do 3 ml pożywki LB zawierającej 25  $\mu$ g/ml chloramfenikolu oraz 1% glukozy i inkubowano w temperaturze 30°C przez noc (ok. 18 h) z wytrząsaniem
- hodowlę nocą odwirowano (3000xg, 10 min) i zawieszono w 150  $\mu$ l pożywki LB
- całość wysiano na płytce z podłożem LA zawierającym 25  $\mu$ g/ml kanamycyny i 50  $\mu$ g/ml ampicyliny.

### 3.8.7. Amplifikacja DNA kodującego fragment genu *gspD* szczepów *E. coli* BL21(DE3), IH11128 oraz DR14

- zastosowane startery – GspD-1 oraz GspD-2 (Materiały, pkt. 2.12)
- wykorzystana polimeraza DNA – polimeraza DNA *Pwo*
- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
94	300	
94	30	35
55	30	
72	60	
72	300	

Schłodzenie do 4°C.

- skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik:	Objętość [μl]
Matryca DNA	1
Redestylowana woda jałowa	30,5
Bufor dla polimerazy DNA <i>Pwo</i> (10x stęż.)	5
dNTP's	5
Starter GspD-1	2
Starter GspD-2	2
MgCl <sub>2</sub>	4
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	0,5

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl.

## 3.9. Konstrukcja plazmidu pET30gspD

### 3.9.1. Amplifikacja DNA genu *gspD*

- zastosowane startery – SPC-Sph oraz *gspD*-Hind (Materiały, pkt. 2.12)
- wykorzystana polimeraza DNA – polimeraza DNA *Pwo*

- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
94	300	
94	30	35
55	30	
72	180	
72	300	

Schłodzenie do 4°C.

- skład mieszaniny reakcyjnej:

Składnik:	Objętość [μl]
Matryca DNA	1
Redestylowana woda jałowa	31
Bufor dla polimerazy DNA <i>Pwo</i> (10x stęż.)	5
dNTP's	5
Starter gspD1Nde	2
Starter gspD2Hind	2
MgCl <sub>2</sub>	3
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	1

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl.

### 3.9.2. Trawienie fragmentów DNA enzymami restrykcyjnymi SphI i HindIII

- Mieszanina reakcyjna:

Składniki	Objętość [μl]
Oczyszczony produkt PCR	8
10 x stężony bufor do trawienia	2
enzym SphI	1
enzym HindIII	1
Redestylowana woda jałowa	8

Reakcję trawienia DNA restryktazami prowadzono w odpowiednim buforze do trawienia, w temperaturze 37°C, przez 1 h. Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła od 20 µl. Wyniki reakcji trawienia obserwowano po rozdziale trawionego DNA w polu elektrycznym w żelu agarozowym.

### 3.9.3. Reakcja ligacji DNA wektora pET30b+ z DNA insertu otrzymanego przez amplifikację DNA genu *gspD*

Reakcję ligacji prowadzono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej: DNA wektora pET30b+ trawionego enzymami restrykcyjnymi SphI i HindIII i DNA insertu otrzymanego przez amplifikację DNA genu *gspD* z wykorzystaniem starterów SPH-Spc i *gspD*-Hind (Materiały, pkt. 2.12), trawionego tymi samymi restryktazami. Do mieszaniny dodano także buforu dla ligazy DNA, roztworu ATP oraz ligazy DNA faga T4. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 3 h, w temperaturze pokojowej.

- Skład mieszaniny ligacyjnej:

Skład mieszaniny ligacyjnej	Objętość [µl]
DNA insertu	35
DNA wektora	2
ATP	2,1
Ligaza DNA T4	1,5
Bufor do ligacji (10x stęż.)	5,2
Woda redestylowana	8

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 53,8 µl.

### 3.10. Transformacja komórek *E. coli* plazmidowym DNA

Komórki kompetentne *E. coli* określonego szczepu i transformację komórek kompetentnych DNA plazmidowym wykonano według standardowej procedury (Sambrook i wsp., 1989).

### **3.11. Produkcja białka inwazyjnego DraD z sekwencją sygnałową w szczepie *E. coli* BL21(DE3)**

W celu przeprowadzenia ekspresji genów kodujących natywne białko DraD oraz fuzyjne białko DraDsyg-C-His z plazmidów rekombinantowych pInVdsygstop oraz pInVdsyg-C-His w komórkach *E. coli* BL21(DE3), zaszczepiono hodowlę nocną w 40 ml pożywki LB, zawierającej kanamycynę (dodawano 40 µl antybiotyku do 40 ml pożywki LB) i inkubowano w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C, przez 20 h. Następnie hodowlę nocną odmłodzono w 1000 ml pożywki LB z tym samym antybiotykiem i nadal prowadzono hodowlę w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C. Po uzyskaniu przez hodowlę OD<sub>600</sub> wynoszącego 0,3 (po 2 h) dokonano indukcji ekspresji poprzez dodanie 1M IPTG do końcowego stężenia 1 mM. Ekspresję prowadzono 1 h od momentu indukcji. Po tym czasie hodowlę wirowano przy 3000 obr/min (Materiały, pkt 2.21), a uzyskane osady bakteryjne przeznaczono do dalszych badań.

### **3.12. Produkcja zewnątrzkomórkowego białka GspD w szczepie *E. coli* BL21(DE3)gspDmut i DR14gspDmut**

W celu przeprowadzenia ekspresji genu kodującego zewnątrzkomórkowe białko GspD z plazmidu rekombinantowego pET30gspD w komórkach *E. coli* BL21(DE3)gspDmut i DR14gspDmut zaszczepiono hodowlę nocną w 100 ml pożywki LB, zawierającej odpowiednie antybiotyki i inkubowano w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C, przez 18 h. Po tym czasie hodowlę wirowano przy 3000 obr/min (Materiały, pkt 2.21), a uzyskany osad bakteryjny przeznaczono do dalszych badań.

### **3.13. Produkcja natywnych fimbrii Dr oraz natywnego białka inwazyjnego DraD w szczepie *E. coli* BL21(DE3) oraz BL21(DE3)gspDmut**

Komórki kompetentne bakterii *E. coli* BL21(DE3) transformowano 10 µl DNA plazmidów rekombinantowych (pBJN406, pBJN4, pBJN17, pBJN417, pCC90, pCC90DraDmut, pCC90D54stop, pCC90DraCmut). Otrzymane szczepy rekombinantowe umożliwiają produkcję na powierzchni komórki natywnych fimbrii typu Dr oraz natywnego białka inwazyjnego DraD.

W celu ekspresji genów kodujących natywne białka z odpowiednich plazmidów rekombinantowych w komórkach *E. coli* BL21(DE3) zaszczepiono 20 h hodowlę, w 100 ml pożywki LB z odpowiednim antybiotykiem i inkubowano w 37°C przez 20 h. Po tym czasie hodowlę odwirowano przy 3000 obr/min (Materiały, pkt 2.21), a uzyskany osad bakteryjny przeznaczono do dalszych badań.

### **3.14. Produkcja natywnego białka inwazyjnego DraD w klinicznym szczepie *E. coli* DR14, DR14gspDmut oraz DR14gspDmut-(pET30gspD)**

W celu przeprowadzenia ekspresji genu kodującego natywne białko DraD w odpowiednich komórkach *E. coli* DR14 zaszczepiono hodowlę nocną w 100 ml pożywki LB, zawierającej odpowiednie antybiotyki i inkubowano w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C, przez 18 h. Po tym czasie hodowlę wirowano przy 3000 obr/min (Materiały, pkt 2.21), a uzyskany osad bakteryjny przeznaczono do dalszych badań.

### **3.15. Produkcja rekombinazy Cre w szczepie *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut**

Komórki kompetentne bakterii *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut transformowano 7 µl DNA plazmidu pCre705 i wysiewano na podłoże LA z chloramfenikolem. Otrzymany szczep rekombinantowy umożliwia ekspresję genu kodującego białko Cre. W celu ekspresji genu *cre* w komórkach *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut zaszczepiono 20 h hodowlę, w 100 ml pożywki LB z chloramfenikolem i inkubowano w 37°C przez 4 h. Po tym czasie hodowlę odwirowano przy 3000 obr/min (Materiały, pkt 2.21), a komórki wysiano na podłoże LA zawierające chloramfenikol. Kolonie bakteryjne przesiewano na podłoże LA z kanamycyną w celu potwierdzenia utraty genu oporności na kanamycynę.

### **3.16. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących**

Zasada rozdziału białek metodą elektroforezy poliakryloamidowej w warunkach denaturujących opiera się na różnicy mas cząsteczkowych analizowanych białek, które opłaszczone zjonizowanym siarczanem dodecyłu

migrują z różną prędkością w polu elektrycznym w kierunku anody. Procedura wykonania tego typu analizy obejmuje wykonanie następujących czynności:

- przygotowanie żelu - 15% żel poliakryloamidowy sporządzono według procedury podanej w punkcie 2.7. Formę dla żelu stanowiły dwie płytki szklane uszczelnione silikonem, z których jedna posiadała przekładki decydujące o grubości żelu
- elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu prądu wynoszącym 90 V
- przygotowanie próbek do analizy: 10÷15 µl próbki i 5 µl buforu denaturującego po zmieszaniu i denaturacji nanoszono na żel w ilości 15÷20 µl mieszaniny (proces denaturacji prowadzono w termobloku przez 5-10 min w temperaturze 98°C). Te same czynności wykonano dla próbki markera białkowego. Po elektroforezie żełe barwiono w roztworze barwiącym przez 30 min. Odbarwianie żelu prowadzono przez 1- 12 h w roztworze odbarwiającym (Materiały pkt 2.7).

### **3.17. Detekcja białek rekombinantowych metodą Western blotting**

*Wykonanie transferu metodą elektrotransferu:*

- nitrocelulozę (o wymiarach odpowiadających wielkości żelu) i żel poliakryloamidowy nasączone w buforze do transferu (Materiały, pkt 2.16) umieszczono poziomo na trzech bibułach Whatman, nasączonych w buforze do transferu, na płycie anodowej (nitroceluloza od strony anody – płyta tytanowa pokryta platyną, żel poliakryloamidowy od strony katody – płyta ze stali nierdzewnej);
- ponownie umieszczono trzy bibuły Whatman nasączone w buforze do transferu i przyłożono płytę katodową;
- transfer prowadzono w czasie 1-1,5 h, przy natężeniu prądu 66 mA;
- po tym czasie przeprowadzono immunodetekcję białek związanych z nitrocelulozą.

#### *Immunoidentyfikacja*

Przeprowadzono immunoidentyfikację białka inwazyjnego DraD w układzie:

- z zastosowaniem króliczych poliklonalnych przeciwciał anti-DraD, specyficznych dla białka inwazyjnego DraD oraz małych przeciwciał rozpoznających przeciwciała królicze wyznakowanych peroksydazą chrzanową (Materiały, pkt 2.16)

oraz immunoidentyfikację białka adhezyny DraE w układzie:



- z zastosowaniem króliczych poliklonalnych przeciwciał anti-Dr, specyficznych dla białka adhezyny DraE oraz małych przeciwciał rozpoznających przeciwciała królicze wyznakowanych peroksydazą chrzanową (Materiały, pkt 2.16).

Procedura wykonania immunoidentyfikacji z zastosowaniem przeciwciał z obu układów jest identyczna. Z tego względu poniżej przedstawiono sposób wykonania immunoidentyfikacji białka inwazy DraD, który jest wspólny dla obu układów.

#### *Wykonanie immunoidentyfikacji:*

- nitrocelulozę z unieruchomionymi na niej białkami umieszczono w pojemniku w buforze TBS-T 3% M i inkubowano przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Inkubacja z roztworem blokującym zawierającym kazeinę ma na celu zabezpieczenie przed niespecyficznym wiązaniem przeciwciał na membranie do miejsc nie zajętych przez przeniesione białka. Następnie odpłukano roztwór blokujący przez przemywanie błony nitrocelulozowej w buforze TBS-T
- wykonano rozcieńczenia przeciwciał pierwotnych w buforze TBS-T – 1% M w jednakowym stosunku dla obu układów (1:1000 w przypadku poliklonalnych przeciwciał króliczych anti-DraD i anti-Dr)
- po inkubacji błon z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami przez 1 h w temperaturze pokojowej usunięto nadmiar niezwiązanych przeciwciał za pomocą buforu TBS-T zawierającego Tween 20 o stężeniu 0,05%. Obecność niejonowego detergentu w buforze TBS zapobiega niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał z wykrywanym antygenem. Płukanie prowadzono przez 3-krotne przemycie nitrocelulozy roztworem TBS-T w ciągu 15 min.
- wykonano rozcieńczenia przeciwciał wtórnych wyznakowanych peroksydazą chrzanową w buforze TBS-T – 1% M w stosunku 1:1000 dla obu układów. Inkubowano błonę nitrocelulozową z tak sporządzonym roztworem przeciwciał przez 1 h w temperaturze pokojowej, a ich nadmiar usunięto przez 3-krotne przemycie roztworem TBS-T w ciągu 15 min.
- nitrocelulozę umieszczono w roztworze substratów dla peroksydazy chrzanowej (DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NiCl<sub>2</sub>) i obserwowano powstanie brunatnego zabarwienia w miejscu rozpoznawania fuzyjnego białka inwazy DraD przez swoiste przeciwciała
- w momencie pojawienia się tła przerwano reakcję przez usunięcie roztworu i przepłukanie nitrocelulozy wodą. Membranę osuszono i przechowywano bez dostępu światła.

### **3.18. Izolacja białka podjednostkowego adhezyny DraE fimbrii Dr**

Pojedyncze kolonie bakteryjne *E. coli* ekspresujące fimbrie typu Dr zawieszono w buforze PBS (Materiały, pkt 2.17) (każda kolonia bakteryjna została zawieszona w 400 µl buforu PBS) i wykonano posiew tak przygotowanych zawiesin bakteryjnych na płytki (350 µl zawiesiny bakteryjnej na każdą płytkę) z podłożem stałym LA z dodatkiem ampicyliny (10 - 15 płytek, o średnicy 150 mm). Płytki inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 h. Następnego dnia zebrano hodowle bakteryjne z każdej płytki za pomocą jałowej, jednorazowej głaszczki i zawieszono w 15 ml buforu PBS. Tak przygotowaną zawiesinę bakteryjną worteksowano przez 1 min i inkubowano w łaźni wodnej przez 1 h w temperaturze 65°C. W kolejnym etapie zawiesinę bakteryjną wirowano przy 6000 obr/min (Materiały, pkt 2.21) przez 10 min. Uzyskany supernatant komórkowy zebrano do jałowych probówek wirowniczych i wykorzystano do precypitacji białek za pomocą 40% roztworu siarczanu amonu w buforze PBS przez noc, w temperaturze 4°C (do klarownego supernatantu dodano 40% roztworu siarczanu amonu do końcowego stężenia 20%) (Materiały, pkt 2.17). Po 24 h inkubacji wytrącone w supernatancie białka wirowano przy 2500 obr/min (Materiały, pkt 2.21), przez 30 min, w temperaturze 4°C, zawieszono w 3 ml buforu PBS i poddano dializie (MWCO>100,000) do buforu PBS przez noc, w temperaturze 4°C.

### **3.19. Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów *E. coli* ekspresujących fimbrie Dr oraz białko inwazyjne DraD**

Do badań immunofluorescencyjnych (mikroskopia immunofluorescencyjna) wykorzystano hodowle bakteryjne *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)gspDmut oraz BL21(DE3)gspDmut-(pET30gspD) transformowanych następującymi plazmidami:

- a) pCC90 oraz pBJN406;
- b) pCC90DraDmut oraz pBJN4;
- c) pCC90D54 oraz pBJN17;
- d) pCC90DraCmut oraz pBJN417;
- e) pInvDsyg-C-His;

a także kliniczne szczepy *E. coli* DR14, DR14gspDmut oraz DR14gspDmut-(pET30gspD).

Ekspresję genów kodujących odpowiednie białka prowadzono według procedury zawartej w punktach 3.11, 3.12, 3.13 oraz 3.14. Uzyskane osady bakteryjne przepłukano trzykrotnie (płukanie 3 x 1 ml buforem PBS) i rozcieńczono w buforze PBS. Przygotowane frakcje stanowiące zawiesiny bakterii powyższych rekombinantowych szczepów *E. coli* (100 µl;  $10^5 - 10^6$  komórek/ml) w buforze PBS inkubowano z przeciwciałami pierwotnymi i wtórnymi.

#### Wykonanie:

- 100 µl frakcji stanowiącej zawiesinę bakteryjną określonych szczepów *E. coli* w buforze PBS inkubowano z 50 µl króliczych poliklonalnych przeciwciał anti-Dr lub anti-DraD (rozcieńczonych w stosunku 1 :500) specyficznych odpowiednio dla białka adhezyny DraE oraz białka inwazyny DraD (Materiały, pkt 2.18), w temperaturze 37°C, przez 60 min
- po inkubacji zawiesin bakteryjnych z przeciwciałami usunięto nadmiar nie związanych przeciwciał za pomocą buforu PBSglyc (trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBSglyc) (Materiały, pkt 2.18)
- 100 µl frakcji stanowiącej zawiesinę bakteryjną (w buforze PBS) określonych szczepów *E. coli* związanych z przeciwciałami anti-Dr, specyficznymi dla adhezyny DraE inkubowano z 50 µl kozich przeciwciał specyficznych dla przeciwciał króliczych (rozcieńczonych w stosunku 1:50) (ang. Anti-Rabbit IgG from goat, Whole Molecule; Sigma) znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC), w temperaturze 37°C przez 60 min (Materiały, pkt 2.18)
- 100 µl frakcji stanowiącej zawiesinę bakteryjną (w buforze PBS) określonych szczepów *E. coli* związanych z przeciwciałami anti-DraD, specyficznymi dla inwazyny DraD, inkubowano z 50 µl kozich przeciwciał specyficznych dla przeciwciał króliczych (rozcieńczonych w stosunku 1:25) (ang. Anti-Rabbit IgG from goat, Whole Molecule; Sigma) znakowanych izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC), w temperaturze 37°C, przez 60 min (Materiały, pkt 2.18)
- po inkubacji zawiesin bakteryjnych z odpowiednimi przeciwciałami usunięto nadmiar nie związanych przeciwciał za pomocą buforu PBSglyc (trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBSglyc) (Materiały, pkt 2.18);
- 10 µl każdej zawiesiny bakteryjnej nanoszono na szkiełka mikroskopowe i obserwowano pod mikroskopem immunofluorescencyjnym (Olympus BX-60).

### 3.20. Badanie adhezji komórek *E. coli* do komórek linii HeLa

Do badania adhezji komórek bakteryjnych do linii komórkowej HeLa wykorzystano hodowle szczepów *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)gspDmut oraz BL21(DE3)gspDmut-(pET30gspD) transformowanych następującymi plazmidami:

- a) pCC90;
- b) pCC90DraDmut;
- c) pCC90D54;
- d) pCC90DraCmut;

a także kliniczne szczepy IH11128, DR14, DR14gspDmut oraz DR14gspDmut-(pET30gspD).

Ekspresję genów kodujących odpowiednie białka prowadzono według procedury zawartej w punktach 3.12, 3.13 oraz 3.14. Uzyskane osady bakteryjne przepłukano trzykrotnie (płukanie 3 x 1 ml buforem PBS) i rozcieńczono w buforze PBS do  $OD_{600}=0.4$  ( $5 \times 10^4$  CFU/ml). Przygotowane frakcje stanowiące zawiesiny bakterii powyższych rekombinantowych szczepów *E. coli* w buforze PBS inkubowano z linią komórkową HeLa.

#### Wykonanie:

Komórki linii HeLa przesiane do sześćo dołkowych płytek (zaopatrzonych w szkiełka mikroskopowe) hodowano w pożywce hodowlanej MEM (ang. Minimal Essential Medium) z dodatkiem 10% FBS (ang. Fetal Bovine Serum) oraz roztworu penicyliny i streptomycyny w 37°C, w 5% atmosferze CO<sub>2</sub> przez 24 h (Materiały, pkt 2.19). Po tym czasie do hodowli komórkowej dodano hodowle bakteryjne odpowiednich szczepów rekombinantowych. Po 2 h inkubacji (37°C, 5% atmosfera CO<sub>2</sub>) komórek HeLa z bakteriami, komórki przepłukano buforem PBS, utrwalono 70% roztworem metanolu (10 min). Po tym czasie szkiełka mikroskopowe osuszono i barwiono preparaty przy użyciu 10% roztworu Giemsa (3 min) (Materiały, pkt 2.20). Wybarwione preparaty płukano 3-krotnie buforem PBS. Obecność związanych z linią komórkową szczepów bakteryjnych, analizowano z wykorzystaniem mikroskopu Olympus BX-60.

### 3.21. Precypitacja frakcji supernatantów

Uzyskane po ekspresji frakcje supernatantów precypitowano przez dodanie kwasu trichlorooctowego do końcowego stężenia 10%. Po 4-godzinnej inkubacji w

4°C sprecypitowane białka odwirowano (3,000xg; 4°C), a następnie przepłukano dwukrotnie roztworem acetonu i kwasu chlorowego (w stosunku 200:1) i ponownie roztworem czystego acetonu.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Określenie roli kanałotwórczego białka DraC w transporcie białka DraD na powierzchnię komórek *E. coli*

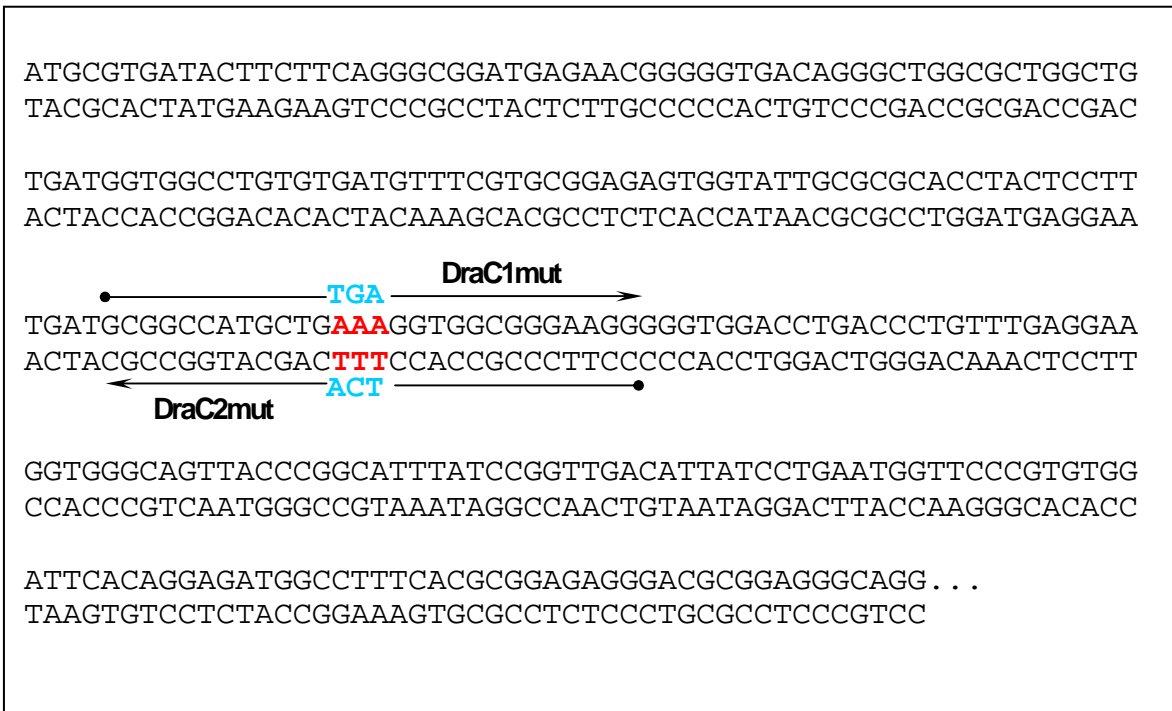
#### 4.1.1. Konstrukcja plazmidu rekombinantowego zawierającego operon *dra* ze zmutowanym genem *draC* (pCC90DraCmut)

W celu określenia roli zewnątrz błonowego, kanałotwórczego białka DraC w transporcie białka inwazyjnego DraD na powierzchnię komórek *E. coli* ekspresujących fimbrie typu Dr, skonstruowano, przy użyciu techniki mutagenyzy ukierunkowanej, plazmid pCC90DraCmut, zawierający operon *dra* ze zmutowanym genem *draC*. Technika mutagenyzy ukierunkowanej, umożliwia wprowadzenie mutacji w dowolnie wybranym miejscu w sekwencji DNA plazmidu.

Jako źródło matrycy do reakcji amplifikacji zastosowano DNA plazmidu rekombinantowego pCC90 zawierający operon *dra* (Materiały, pkt 2.2).

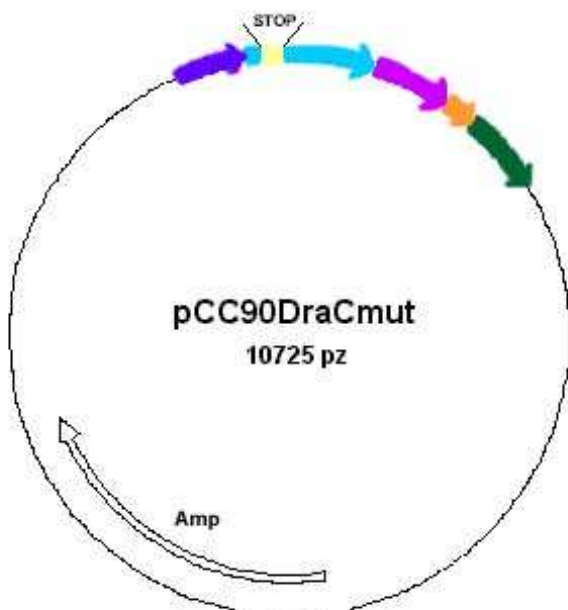
Zastosowanie do reakcji PCR odpowiednio zaprojektowanych, komplementarnych starterów DraC1mut oraz DraC2mut (Materiały, pkt 2.12) oraz odpowiedniego profilu temperaturowo – czasowego (Metody, pkt 3.6), umożliwiło otrzymanie właściwego produktu PCR o wielkości 10725 pz, w którym trójka nukleotydów AAA, kodująca Lys-11, została zastąpiona kodonem stop (TGA) **(Rysunek 18)**.

W celu usunięcia matrycowego DNA, do próbki zawierającej produkt PCR dodano enzym restrykcyjny DpnI (Metody, pkt 3.6). Endonukleaza DpnI (sekwencja rozpoznania 5' – Gm<sup>6</sup>ATC – 3') to enzym restrykcyjny specyficzny dla zmetylowanej formy DNA (matryca). Zastosowanie restryktazy DpnI umożliwiło wyselekcjonowanie z mieszaniny reakcyjnej zsyntetyzowanego DNA z wprowadzoną mutacją (niezmetylowane DNA).



**Rys.18.** Sekwencja nukleotydowa fragmentu DNA genu *draC* z uwzględnieniem miejsca przyłączenia starterów DraC1mut oraz DraC2mut. Kolorem czerwonym zaznaczono Lys-11 (miejsce wprowadzenia mutacji), kolorem niebieskim zaznaczono kodon STOP w obrębie starterów DraC1mut oraz DraC2mut.

Uzyskano plazmid rekombinantowy pCC90DraCmut (**Rysunek 19**), zawierający mutację w obrębie genu *draC*, uniemożliwiająca produkcję zewnątrzłonowego, kanałotwórczego białka DraC. Otrzymanie mutantu potwierdzono przez sekwencjonowanie.



**Rys.19.** Plazmid rekombinantowy pCC90DraCmut.

Oznaczenia:

- kolorem granatowym oznaczono gen *draB*
- kolorem niebieskim oznaczono gen *draC* z wprowadzoną mutacją (kolor żółty – miejsce wprowadzenia mutacji)
- kolorem różowym oznaczono gen *draD*
- kolorem pomarańczowym oznaczono gen *draP*
- kolorem zielonym oznaczono gen *draE*

#### 4.1.2. Badanie sekrecji białka DraD w różnych szczepach rekombinantowych *E. coli* BL21(DE3)

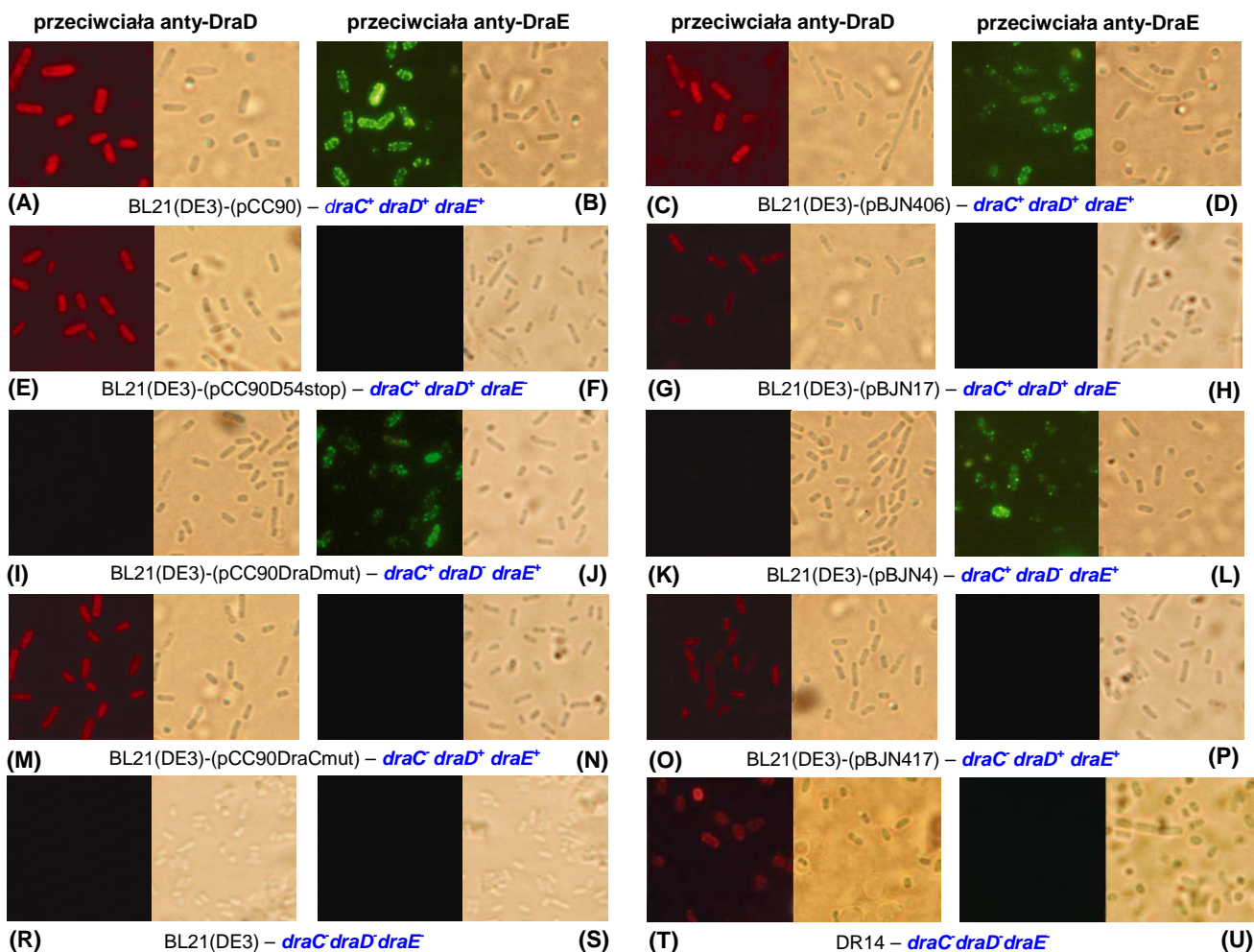
Komórki *E. coli* BL21(DE3) transformowane plazmidem pCC90DraCmut analizowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (Metody, pkt 3.19).

Kontrolę pozytywną powadzonych badań stanowiły szczepy *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90) i BL21(DE3)-(pBJN406) (**Rysunek 20A, B, C i D**), zawierające operon *dra* oraz BL21(DE3)-(pCC90D54stop) i BL21(DE3)-(pBJN17) zawierające odpowiednio mutację oraz insercję transpozonoową w obrębie genu *draE* (brak ekspresji fimbrii Dr) (**Rysunek 20E, F, G i H**). Kontrolę negatywną doświadczenia stanowiły komórki *E. coli* transformowane plazmidami pCC90DraDmut oraz pBJN4 zawierające odpowiednio mutację oraz insercję transpozonoową w obrębie genu *draD* (brak ekspresji genu kodującego białko DraD) (**Rysunek 20I, J, K i L**) oraz komórki *E. coli* BL21(DE3) (**Rysunek 20R i S**).

Przeprowadzono również doświadczenia ekspresji periplazmatycznych form białka DraD w rekombinantowych szczepach *E. coli* BL21(DE3) – (pInvDsyg-C-His) (ekspresja genu kodującego białko DraD z C-terminalną domeną polihistydynową) oraz BL21(DE3)-(pInvDsygstop) (ekspresja genu kodującego białko DraD bez domen fuzyjnych) – układy bez obecności białka DraC (Materiały, pkt 2.2) (Metody, pkt 3.11). Obecność białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pInvDsyg-C-His) oraz BL21(DE3)-(pInvDsygstop) analizowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (Metody, pkt 3.19) (**Rysunek 21**).

Stwierdzono obecność białka inwazyiny DraD na powierzchni komórek *E. coli* szczepu BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) (**Rysunek 20M**). Jednakowe wyniki uzyskano dla szczepu bakteryjnego *E. coli* BL21(DE3)-(pBJN417), kodującego operon *dra* z insercją transpozonoową w obrębie genu *draC* (brak ekspresji genu kodującego białko DraC) (**Rysunek 20O**) oraz klinicznego szczepu *E. coli* DR14 (**Rysunek 20T**).

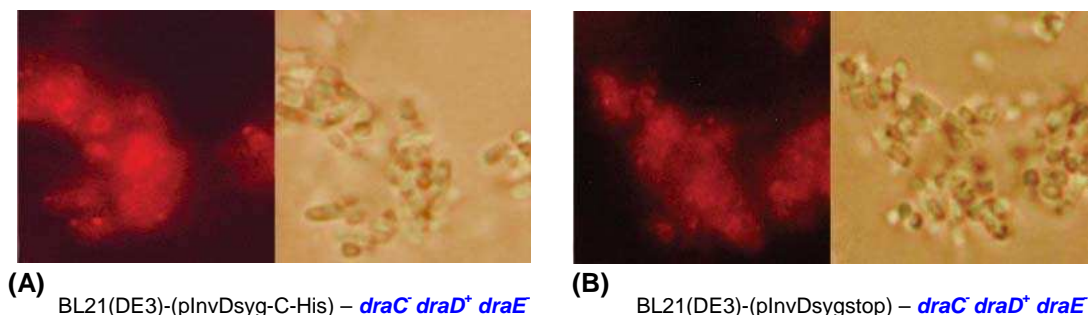




**Rys.20.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21(DE3)-(pCC90) (A i B), BL21(DE3)-(pBJN406) (C i D), BL21(DE3)-(pCC90D54stop) (E i F), BL21(DE3)-(pBJN17) (G i H), BL21(DE3)-(pCC90DraDmut) (I i J), BL21(DE3)-(pBJN4) (K i L), BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) (M i N), BL21(DE3)-(pBJN417) (O i P), BL21(DE3) (R i S) oraz DR14 (T i U) inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anty-DraD i anty-króliczymi znakowanymi TRITC (A, C, E, G, I, K, M, O, R i T) oraz przeciwciałami króliczymi anty-DraE i anty-króliczymi znakowanymi FITC (B, D, F, H, J, L, N, P, S i U) w połączeniu z mikrofotografiami w świetle widzialnym komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie x 10 000, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

Białko DraD wykryte zostało również na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pInvDsyg-C-His) (Rysunek 21A) oraz BL21(DE3)-(pInvDsygstop) (Rysunek 21B). W tych ostatnich szczepach w wyniku ekspresji genu kodującego białko DraD, dochodzi do agregacji komórek spowodowanej najprawdopodobniej interakcją między cząsteczkami białka DraD występującego w dużym stężeniu w otoczkach komórek bakteryjnych (Rysunek 21).

### przeciwciała anti-DraD



**Rys.21.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepów BL21(DE3)-(pInvDsyg-C-His) (A) i BL21(DE3)-(pInvDsygstop) (B) inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anti-DraD i anty-króliczymi znakowanymi TRITC w połączeniu z mikrofotografiami w świetle widzialnym komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie x 10 000, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

### Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują na transport białka DraD na powierzchnię komórki bez udziału białka DraC. Powierzchniowa lokalizacja białka inwazyjnego DraD w rekombinowanych szczepach *E. coli* BL21(DE3)-(pInvDsyg-C-His) oraz BL21(DE3)-(pInvDsygstop) (szczepy produkujące jedynie białko DraD – brak pozostałych białek kodowanych przez geny operonu *dra*) sugeruje udział w sekrecji białka DraD innego niż DraC, zewnątrz błonowego białka kanałowego.

## 4.2. Zdefiniowanie roli białka DraD w biogenezie fimbrii Dr zbudowanych z podjednostek białka DraE

W celu określenia roli białka DraD w biogenezie fimbrii Dr, do badań wykorzystano komórki *E. coli* BL21(DE3) transformowane plazmidami:

- pCC90 – plazmid rekombinacyjny kodujący operon *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych *draA* i *draF* - kontrola pozytywna (obecność na powierzchni komórki bakteryjnej białka DraD oraz fimbrii Dr zbudowanych z podjednostek białka DraE);
- pCC90DraDmut – plazmid rekombinacyjny, pochodna plazmidu pCC90, w którym gen *draD* zastąpiono produktem amplifikacji zawierającym kodon stop w trzech ramkach odczytu - kontrola negatywna (brak ekspresji genu kodującego białko DraD);

- pCC90D54stop – plazmid rekombinantowy, pochodna plazmidu pCC90, w którym za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej trójka nukleotydoma GAC kodująca kwas asparaginowy (Asp54) została zastąpiona przez kodon stop - kontrola negatywna (brak ekspresji genu kodującego białko DraE);
- pCC90DraCmut – plazmid rekombinantowy, pochodna plazmidu pCC90, w którym za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej trójka nukleotydoma kodująca lizynę (Lys-11) została zastąpiona przez kodon stop - kontrola negatywna (brak obecności fimbrii typu Dr na powierzchni komórki bakteryjnej, akumulacja kompleksów białko opiekuńcze DraB – podjednostka fimbrialna DraE w periplazmie).

Równocześnie przeprowadzone zostały badania z wykorzystaniem plazmidu pBJN406 obejmującego cały operon *dra* wraz z regionem promotorowym i genami regulatorowymi – kontrola pozytywna (obecność na powierzchni komórki bakteryjnej białka DraD oraz fimbrii Dr) oraz pochodnych tego plazmidu, zawierających insercje transpozonowe w obrębie genów *draD* (pBN4) – kontrola negatywna produkcji białka DraD oraz *draE* (pBN17) – kontrola negatywna produkcji białka DraE.

Obecność białek: inwazyiny DraD oraz adhezyny DraE na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych odpowiednimi plazmidami, testowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (Metody, pkt 3.19) z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał specyficznych odpowiednio dla białka DraD oraz DraE (Materiały, pkt 2.18) oraz techniki immunoblottingu (Metody, pkt 3.17) z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał specyficznych dla białka DraE (Materiały, pkt 2.16).

Kontrolę negatywną prowadzonych badań stanowiły komórki *E. coli* BL21(DE3) (brak ekspresji genów kodujących zarówno białko DraD, jak i DraE).

#### **4.2.1. Immunoidentyfikacja białka adhezyny DraE metodą Western blotting**

W celu detekcji białka adhezyny DraE przygotowano próbki całkowitych lizatów komórek *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)-(pCC90), BL21(DE3)-(pCC90D54stop), BL21(DE3)-(pCC90DraDmut), frakcji periplazmatycznej komórek *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)-(pCC90D54stop), BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) oraz frakcji fimbrialnych wyizolowanych z komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90), BL21(DE3)-(pCC90DraDmut).

Przeprowadzono transfer białek rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym metodą elektrotransferu, a w celu enzymatycznej detekcji białka DraE użyto DAB i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako substratów dla peroksydazy chrzanowej (Metody, pkt 3.17). Uzyskane wyniki immunoidentyfikacji białka DraE metodą Western blotting pokazano na **Rysunku 22**.



**Rys.22.** Immunoidentyfikacja białka adhezyny DraE techniką Western blotting.

**M** – marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting (Sigma) – M<sub>r</sub>: 45; 29; 20; 14,2; 6,5 kDa

**1** – 15 µl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3) (kontrola negatywna)

**2** – 15 µl lizatu komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90D54stop) nie ekspresujących fimbrii Dr (kontrola negatywna)

**3** – 15 µl frakcji periplazmatycznej wyizolowanej z komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90D54stop) (kontrola negatywna)

**4** - 15 µl frakcji periplazmatycznej wyizolowanej z komórek bakterii *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90DraCmut)

**5** – 5 µl frakcji fimbrii Dr wyizolowanych z komórek *E. coli* BL21(DE3)- (pCC90) (kontrola pozytywna)

**6** – 15 µl frakcji periplazmatycznej wyizolowanej z komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90), (kontrola pozytywna)

**7** – 5 µl frakcji fimbrii Dr wyizolowanych z komórek bakterii *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90DraDmut)

**8** – 15 µl frakcji periplazmatycznej wyizolowanej z komórek bakterii *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90DraDmut).

Zaobserwowano ekspresję fimbrii Dr w przypadku szczepów *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90) oraz BL21(DE3)-(pCC90DraDmut), będącą w obu przypadkach na jednakowym poziomie. Stwierdzono także obecność białka DraE w frakcji periplazmatycznej wyizolowanej z komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90DraCmut)

(brak powierzchniowej ekspresji fimbrii Dr ze względu na wprowadzoną mutację w obrębie genu *draC*). Nie stwierdzono ekspresji fimbrii Dr w przypadku komórek *E. coli* BL21(DE3) oraz BL21(DE3)-(pCC90D54stop).

### **Podsumowanie**

Uzyskane wyniki wskazują na brak roli białka DraD w biogenezie fimbrii Dr.

#### **4.2.2. Immunodetekcja białka inwazyjności DraD oraz adhezyny DraE z wykorzystaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej**

Detekcję białka DraD oraz adhezyny DraE na powierzchni komórki bakteryjnej przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w Metodach, pkt 3.17. Hodowle bakteryjne przygotowano według procedury przedstawionej w Metodach, pkt 3.13.

Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych *E. coli* określonych szczepów z wykorzystaniem pierwotnych przeciwciał anti-DraD oraz wtórnych przeciwciał anti-króliczych znakowanych TRITC, pozwoliła na stwierdzenie obecności białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych plazmidami: pCC90 (**Rysunek 20A**), pCC90D54stop (mutacja w obrębie genu *draE*) (**Rysunek 20E**), pCC90DraCmut (mutacja w obrębie genu *draC*) (**Rysunek 20M**), pBJN406 (**Rysunek 20C**), pBJN17 (insercja transpozona w obrębie genu *draE*) (**Rysunek 20G**) oraz pBJN417 (insercja transpozona w obrębie genu *draC*) (**Rysunek 20O**), a także na powierzchni klinicznego szczepu *E. coli* DR14 (mutacja w obrębie genu *draC*) (**Rysunek 20T**). Obecności białka nie stwierdzono w przypadku komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych plazmidami: pCC90DraDmut (mutacja w obrębie genu *draD*) (**Rysunek 20I**) oraz pBJN4 (insercja transpozona w obrębie genu *draD*) (**Rysunek 20K**).

Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych *E. coli* określonych szczepów z wykorzystaniem pierwotnych przeciwciał anti-Dr oraz wtórnych przeciwciał anti-króliczych znakowanych FITC, pozwoliła na stwierdzenie obecności białka DraE na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych plazmidami: pCC90 (**Rysunek 20B**), pCC90DraDmut (**Rysunek 20J**), pBJN406 (**Rysunek 20D**) oraz pBJN4 (**Rysunek 20L**). Obecności białka DraE nie stwierdzono natomiast w przypadku komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych plazmidami: pCC90D54stop (**Rysunek 20F**), pCC90DraCmut (**Rysunek 20N**), pBJN17 (**Rysunek**

**20H)** oraz pBJN417 (**Rysunek 20P**), a także na powierzchni klinicznego szczepu *E. coli* DR14 (**Rysunek 20U**).

Występowania białka DraD oraz DraE nie stwierdzono również w przypadku komórek *E. coli* BL21(DE3) (**Rysunek 20R i S**) – kontrola negatywna prowadzonych badań. Wyklucza to niespecyficzną reakcję stosowanych przeciwciał z białkami komórkowymi. Uzyskane wyniki umieszczono w **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Powierzchniowa ekspresja białka DraD oraz fimbrii Dr w rekombinantowych szczepach *E. coli*.

<i>Szczep bakteryjny</i>	<i>Plazmid/wprowadzona mutacja</i>	<i>Powierzchniowa ekspresja białka DraD</i>	<i>Powierzchniowa ekspresja fimbrii Dr</i>
<i>E. coli</i>			
BL21(DE3)	-	-	-
BL21(DE3)pCC90	pCC90	+	+
BL21(DE3)pCC90D54stop	pCC90D54stop::Dr-D54stop	+	-
BL21(DE3)pCC90DraDmut	pCC90DraDmut::ΔdraDstop	-	+
BL21(DE3)pCC90DraCmut	pCC90DraCmut::DraC-K15stop	+	-
BL21(DE3)pBJN406	pBJN406	+	+
BL21(DE3)pBJN17	pBJN17::Dr-TnPhoA	+	-
BL21(DE3)pBJN4	pBJN4::DraD-TnPhoA	-	+
BL21(DE3)pBJN417	pBJN417::DraC-Tn5	+	-
DR14	Insercja w obrębie genu <i>draC</i>	+	-

### **Podsumowanie**

Uzyskane wyniki świadczą o niezależnej sekrecji białek DraD oraz DraE na powierzchni komórek bakteryjnych. Wskazuje to na brak roli białka DraD w biogenezie fimbrii Dr.

### **4.3. Zdefiniowanie roli systemu sekrecji typu II w procesie transportu białka DraD na powierzchnię komórek *E. coli* Dr<sup>+</sup>**

Do jednych z najszerzej rozpowszechnionych wśród bakterii systemów transportu należy szlak sekrecji typu II (T2SS). System ten odpowiedzialny jest za sekrecję wielu białek (toksyn, enzymów hydrolitycznych), pośród których obecne są czynniki wirulentne warunkujące patogenność danego drobnoustroju. Sekrecja przy udziale systemu T2SS obejmuje translokację białek poprzez dwie błony komórkowe. Białka ulegające sekrecji przy udziale T2SS posiadają N-kończącą sekwencję

sygnałną, umożliwiającą ich translokację poprzez błonę wewnętrzną za pośrednictwem systemu Sec. Po przetransportowaniu białka przez błonę wewnętrzną następuje odcięcie peptydu sygnałnego przez zlokalizowaną w błonie peptydazę sygnałną. Następnym etapem jest poprawne złożenie i uwolnienie białka do przestrzeni periplazmatycznej. Na tym etapie białka mogą ulegać dalszym modyfikacjom, takim jak tworzenie mostków disiarczkowych lub łączenie się podjednostek białkowych. Transport białek na powierzchnię komórki bakteryjnej poprzez system sekrecji typu II różni się od pozostałych systemów sekrecji tym, że transportowane białko jest poprawnie i w pełni złożone. Cechą wspólną wielu białek transportowanych za pośrednictwem systemu sekrecji typu II, jest stosunkowo wysoka zawartość  $\beta$ -harmonijek w strukturze trzeciorzędowej (Sandkvist, 2001). W związku z powyższym system ten wydaje się być idealnym systemem transportu dla białka DraD posiadającego N-terminalną sekwencję sygnałną (**Rysunek 23**), umożliwiającą translokację do periplazmy za pośrednictwem systemu Sec oraz posiadającego klasyczną strukturę immunoglobulino-podobną, zbudowaną z 6 antyrównoległych  $\beta$ -harmonijek (**Rysunek 5**) (Jędrzejczak i wsp., 2006).

**MNGSIRKMMRVTCGMLLMVMSGV**SQA**ELHLESRGGSGTQLRDGAKVATGR  
IICREAHTGFHVWMNERQVDGRAERYVVQSKDGRHELVRTGGDGWSPVKG  
EGGKGVSRRPGQEEQVFFDVMADGNQDIAPGEYRFSVGG ACVVPQE**

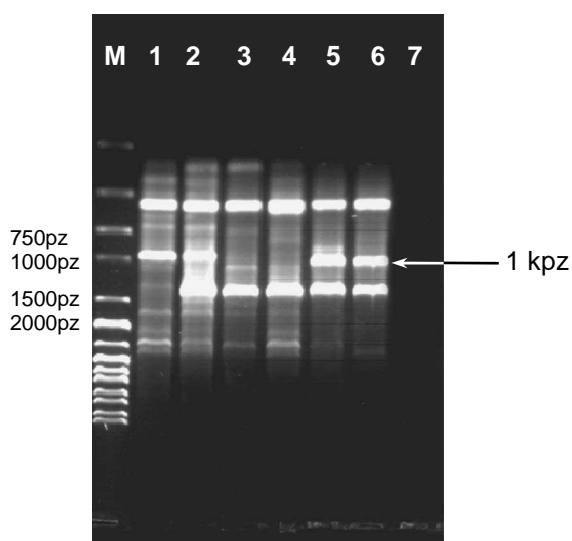
**Rys.23.** Sekwencja aminokwasowa białka DraD.

Kolorem zielonym zaznaczono N-terminalną sekwencję sygnałną, umożliwiającą transport białka DraD do przestrzeni periplazmatycznej za pośrednictwem systemu Sec; kolorem niebieskim zaznaczono sekwencję (Ser-Gln-Ala) rozpoznawaną przez peptydazę sygnałną I; kolorem czerwonym zaznaczono pierwszy aminokwas (Ala) w dojrzałym białku inwazyjnym DraD po odcięciu sekwencji sygnałnej.

#### **4.3.1. Identyfikacja operonu *gsp* w badanych szczepach *E. coli***

W celu określenia obecności operonu *gsp* w analizowanych szczepach laboratoryjnych i klinicznych, przeprowadzono analizę DNA genomowego szczepów *E. coli* za pomocą techniki PCR, z wykorzystaniem starterów P78 i P109, umożliwiających amplifikację fragmentu genu *gspD* o wielkości 1 kbp oraz starterów P5 i P12, umożliwiających amplifikację fragmentu genu *gspK* o wielkości 1,2 kbp (Tauschek i wsp., 2002).

W wyniku amplifikacji DNA genomowego szczepów *E. coli* z wykorzystaniem starterów P78 i P109 (Materiały, pkt 2.12), specyficzne produkty PCR o wielkości 1 kpz uzyskano dla szczepów bakteryjnych *E. coli* BL21(DE3), H10407 (kontrola pozytywna obecności genu *gspD*), IH11128 oraz DR14 (**Rysunek 24**). W przypadku szczepów *E. coli* K-12 oraz MT13 (kontrola negatywna obecności genu *gspD*) nie zaobserwowano amplifikacji specyficznych fragmentów DNA.



**Rys.24.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów P78 oraz P109 na matrycy genomowego DNA badanych szczepów *E. coli*.

**M** – marker wielkości DNA 1 kpz (Fermentas):

**1** – *E. coli* BL21(DE3)

**2** – *E. coli* H10407 (kontrola pozytywna obecności genu *gspD*)

**3** – *E. coli* MT13 (kontrola negatywna obecności genu *gspD*)

**4** – *E. coli* K-12

**5** – *E. coli* IH11128

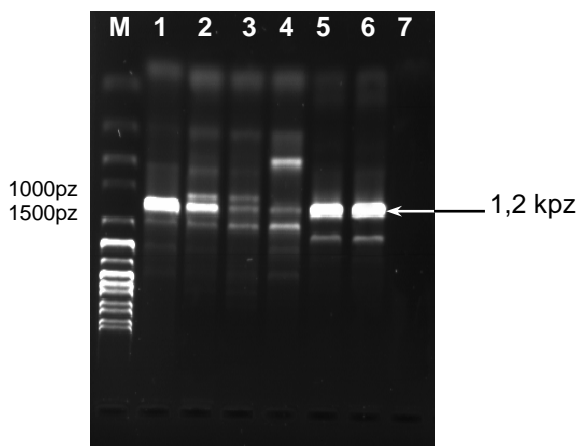
**6** – *E. coli* DR14

**7** – kontrola czystości odczynników

W wyniku amplifikacji DNA genomowego analizowanych szczepów *E. coli* z wykorzystaniem starterów P5 i P12 (Materiały, pkt 2.12) oraz odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego (Metody, pkt 3.7), uzyskano specyficzne produkty PCR o wielkości 1,2 kpz w przypadku wszystkich analizowanych szczepów bakteryjnych *E. coli* (**Rysunek 25**).

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na obecność w analizowanych szczepach genów *gspD* oraz *gspK* kodujących białka należące do systemu sekrecji typu II.





**Rys.25.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów P5 oraz P12 na matrycy genomowego DNA badanych szczepów *E. coli*.

**M** – marker wielkości DNA 1 kbp (Fermentas)

**1** – *E. coli* BL21(DE3)

**2** – *E. coli* H10407

**3** – *E. coli* MT13

**4** – *E. coli* K-12

**5** – *E. coli* IH11128

**6** – *E. coli* DR14

**7** – kontrola negatywna

### 4.3.2. Identyfikacja rodzaju genów *gspD* w badanych szczepach *E. coli*

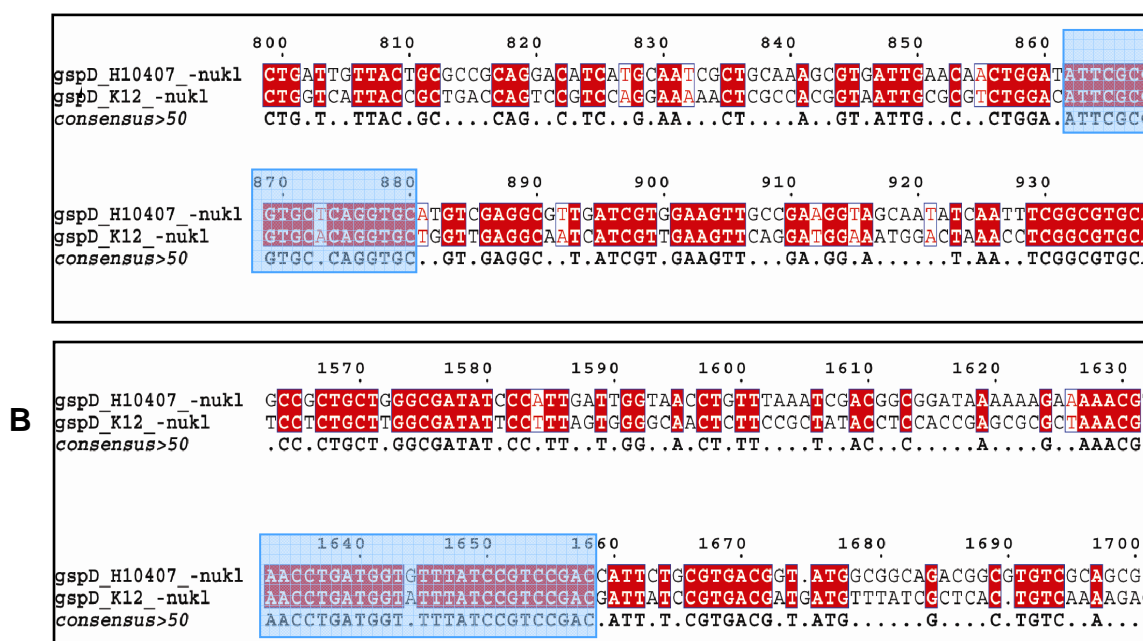
Istotnym elementem systemu sekrecji typu II jest białko kanałowe GspD, tworzące w błonie zewnętrznej duży oligomer, zbudowany z 12-14 podjednostek. W literaturze opisano dwie odmiany białek GspD, pochodzących ze szczepów *E. coli*, należących do systemu sekrecji typu II. Jest to białko GspD pochodzące z enterotoksycznego szczepu *E. coli* H10407 (GeneBank accession no. AF426313) (Tauschek i wsp., 2002) oraz białko GspD pochodzące z niepatogennego szczepu *E. coli* K-12 (GeneBank accession no. NP\_417784.4) (Blattner i wsp., 1997). Białka te różnią się między sobą wielkością (białko GspD pochodzące ze szczepu *E. coli* H10407 zbudowane jest z 616 reszt aminokwasowych – 66,35 kDa, natomiast białko GspD pochodzące ze szczepu K-12 z 650 reszt aminokwasowych – 70,69 kDa) oraz w znacznej mierze składem aminokwasowym.

Do przeprowadzenia analizy sekwencji nukleotydowych genów kodujących białka GspD pochodzących ze szczepów *E. coli* H10407 oraz K-12, wykorzystano program komputerowy Clustax 1.8. Stwierdzono 50,7% identyczności sekwencji nukleotydowej analizowanych genów. Białka kodowane przez obie odmiany genów wykazują 53,8% identyczności sekwencji aminokwasowej.

Analiza porównawcza sekwencji nukleotydowych genów *gspD* pochodzących ze szczepów *E. coli* H10407 oraz K-12 umożliwiła wytypowanie najbardziej zakonserwowanych regionów w sekwencji nukleotydowej obu genów. Pozwoliło to

na zaprojektowanie starterów umożliwiających amplifikację fragmentu DNA obu odmian genu *gspD* (**Rysunek 26**).

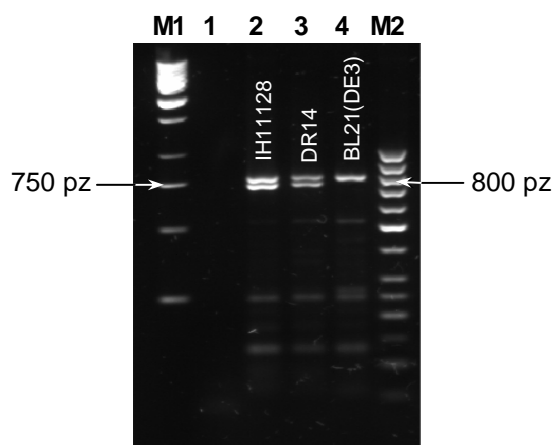
W celu określenia która odmiana genu kodującego białko GspD (charakterystyczna dla szczepu *E. coli* K-12, czy H10407) występuje w szczepie laboratoryjnym *E. coli* BL21(DE3) oraz szczepach klinicznych *E. coli* IH11128 (uropatogenny szczep *E. coli* eksprymujący fimbrie Dr) i DR14 (uropatogenny szczep *E. coli* niosący operon *dra* z mutacją insercyjną w obrębie genu *draC*), wykonano analizę DNA genomowego za pomocą techniki PCR, przy wykorzystaniu starterów GspD-1 oraz GspD-2 (Materiały, pkt 2.12), umożliwiających amplifikację fragmentu DNA genu *gspD* charakterystyczną zarówno dla szczepu H10407 jak i K-12. Przewidywane wielkości produktu PCR wynosiły: dla szczepu *E. coli* H10407 – 799 pz, a dla szczepu *E. coli* K-12 – 749 pz.



**Rys. 26.** Fragment analizy porównawczej sekwencji nukleotydowych genów kodujących białka GspD pochodzące ze szczepów *E. coli* H10407 oraz K-12. Niebieskimi ramkami oznaczono najbardziej zakonserwowane fragmenty w sekwencji DNA obu genów, do których ustalone zostały sekwencje starterów umożliwiające amplifikację fragmentu DNA genu *gspD*.

W wyniku amplifikacji DNA genomowego szczepów *E. coli* BL21(DE3), IH11128 oraz DR14 z wykorzystaniem powyższych starterów oraz odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego (Metody, pkt 3.8.7), uzyskano specyficzne produkty PCR (**Rysunek 27**): dla szczepu *E. coli* BL21(DE3) – produkt o wielkości

799 pz, dla szczepu *E. coli* IH11128 – produkty o wielkości 749 oraz 799 pz, dla szczepu *E. coli* DR14 – produkty o wielkości 749 oraz 799 pz.



**Rys.27.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów GspD-1 oraz GspD-2 na matrycy genomowego DNA badanych szczepów *E. coli*.

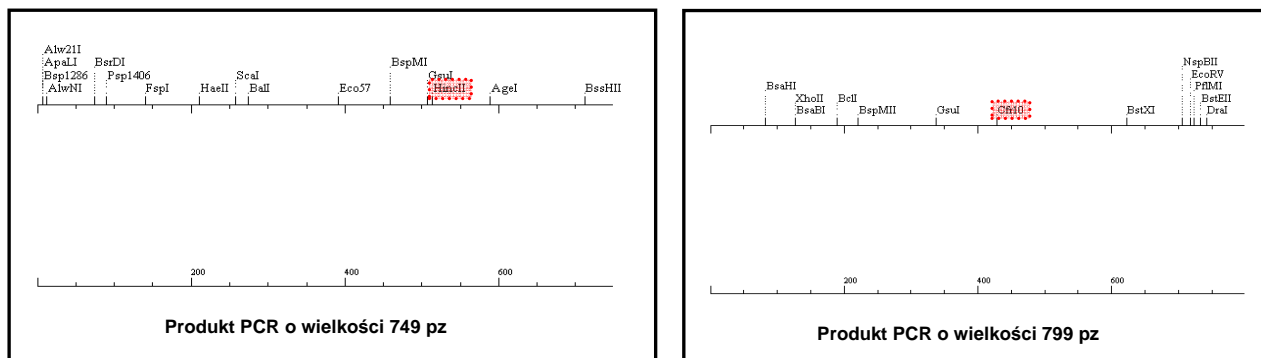
- 1 – kontrola negatywna
  - 2 – *E. coli* IH11128
  - 3 – *E. coli* DR14
  - 4 – *E. coli* BL21(DE3) – szczep laboratoryjny
- M1 – marker wielkości DNA 1 kbp (Fermentas)  
M2 – marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas).

Obecność dwóch produktów amplifikacji, w przypadku klinicznych szczepów *E. coli* IH11128 i DR14, może świadczyć o występowaniu dwóch odmian genu *gspD*, charakterystycznych dla szczepów referencyjnych *E. coli* H10407 oraz K-12.

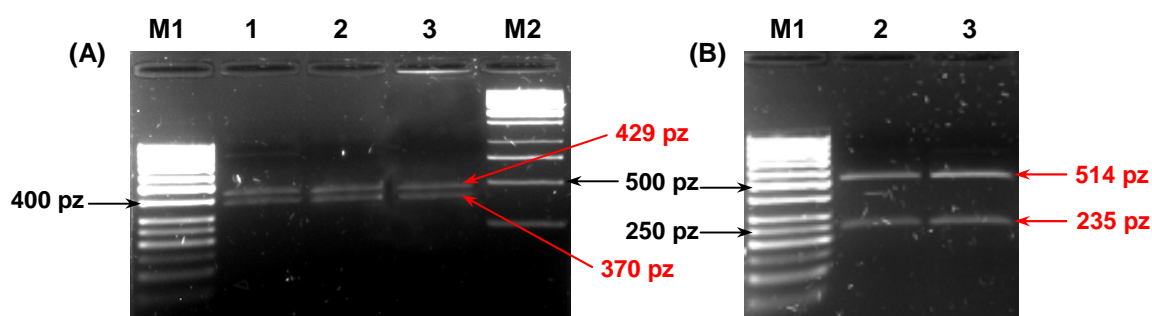
Uzyskane specyficzne produkty PCR o wielkości 749 oraz 799 pz, analizowano restrykcyjnie z wykorzystaniem odpowiednich enzymów: HincII – w przypadku produktu PCR o wielkości 749 pz oraz Cfr10I – w przypadku produktu PCR o wielkości 799 pz. Przewidywane wielkości uzyskanych fragmentów DNA po reakcji trawienia zostały wyznaczone na podstawie teoretycznej analizy restrykcyjnej fragmentów DNA genu *gspD* w szczepach referencyjnych *E. coli* H10407 oraz K-12 (**Rysunek 28**). Przewidywane wielkości fragmentów restrykcyjnych wynosiły: 514 pz i 235 pz dla fragmentu DNA genu *gspD* o wielkości 749 pz, trawionego enzymem restrykcyjnym HincII oraz 370 pz i 429 pz dla fragmentu DNA genu *gspD* o wielkości 799 pz, trawionego enzymem restrykcyjnym Cfr10I.

W wyniku trawienia produktów PCR odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi uzyskano fragmenty o wielkościach zgodnych z wielkościami obliczonymi przy użyciu programu komputerowego (**Rysunek 29**).

Uzyskane produkty PCR poddano również sekwencjonowaniu, potwierdzając obecność jednej odmiany genu *gspD* w szczepie laboratoryjnym *E. coli* BL21(DE3) oraz dwóch odmian genu *gspD* w szczepach klinicznych *E. coli* IH11128 oraz DR14.



**Rys.28.** Komputerowa analiza restrykcyjna DNA produktów PCR o wielkości: 749 pz (fragment DNA charakterystyczny dla szczepu *E. coli* K-12) oraz 799 pz (fragment DNA charakterystyczny dla szczepu *E. coli* H10407) (Clone 1.8).



**Rys.29.** Analiza restrykcyjna produktów reakcji PCR, uzyskanych z użyciem starterów GspD-1 i GspD-2, o wielkości 799 pz trawionych enzymem restrykcyjnym Cfr10I **(A)** oraz o wielkości 749 pz trawionych enzymem restrykcyjnym HincII **(B)**.

**M1** – marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas)

**M2** – marker wielkości DNA 1 kpz (Fermentas)

**1** – szczep *E. coli* BL21(DE3)

**2** – szczep *E. coli* IH11128

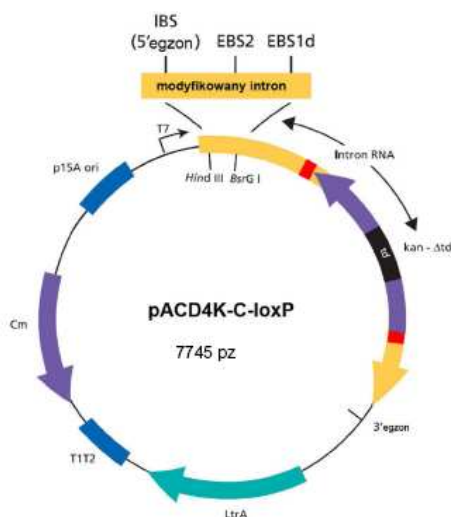
**3** – szczep *E. coli* DR14.

Przeprowadzone doświadczenia trawienia enzymem restrykcyjnym oraz sekwencjonowanie produktów PCR potwierdziły obecność jednej odmiany genu

*gspD* w szczepie laboratoryjnym *E. coli* BL21(DE3) oraz dwóch odmian genu *gspD* w szczepach klinicznych *E. coli* IH11128 oraz DR14.

### 4.3.3. Konstrukcja nokautowych szczepów w genie *gspD* (*E. coli* BL21(DE3)*gspD*mut oraz DR14*gspD*mut)

W celu określenia roli zewnątrz błonowego białka kanałotwórczego GspD w transporcie białka DraD na powierzchnię komórek *E. coli* Dr<sup>+</sup> wykonano nokaut genu *gspD* szczepu laboratoryjnego *E. coli* BL21(DE3) oraz klinicznego szczepu *E. coli* DR14. Do przeprowadzenia nokautu genowego wykorzystany został komercyjnie dostępny zestaw TrageTron<sup>TM</sup> Gene Knockout System (Sigma), zapewniający efektywną i szybką inaktywację wybranych genów, polegającą na insercji intronu RNA grupy II (kodowanego przez plazmid pACD4K-C-loxP) (**Rysunek 30**). Intron RNA, ulegający insercji, w obrębie specyficznej sekwencji docelowej, zawiera w swojej sekwencji gen oporności na kanamycynę, umożliwiającą późniejszą identyfikację szczepów rekombinantowych.

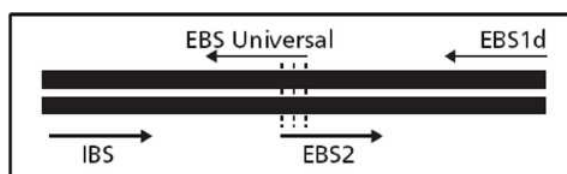


**Rys.30.** Mapa plazmidu pACD4K-C-loxP, wektora w systemie TargeTron® Gene Knockout System. Kolorem żółtym oznaczono insert RNA, w obrębie którego znajduje się sekwencja genu oporności na kanamycynę (kolor fioletowy) inaktywowana przez intron grupy I (kolor czarny), kolorem czerwonym oznaczono sekwencje loxP rozpoznawane przez rekombinazę Cre, kolorem jasnoniebieskim sekwencję genu kodującą białko LtrA, natomiast kolorem ciemnoniebieskim origin replikacji p15A oraz terminator transkrypcji genu oporności na chloramfenikol T1/T2. Gen oporności na chloramfenikol (kolor fioletowy) warunkuje selekcję i propagację plazmidu w komórkach bakteryjnych. Po insercji intronu RNA grupy II w obrębie docelowej sekwencji DNA, aktywowany gen oporności na kanamycynę umożliwia selekcję mutantów z inaktywowanym genem.

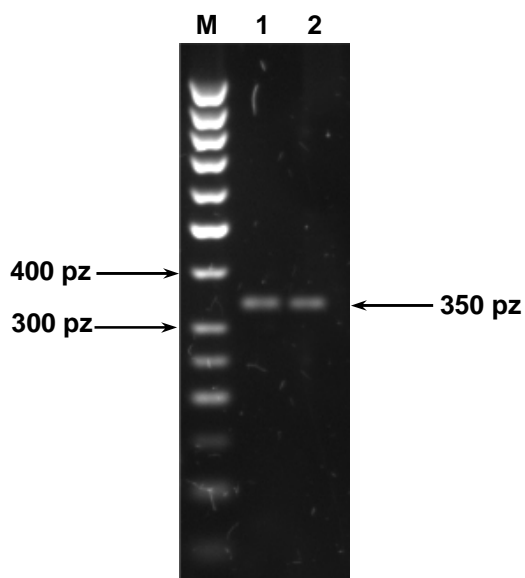
#### *Modyfikacja fragmentu intronu RNA grupy II przy użyciu reakcji PCR*

Wybór miejsca insercji intronu RNA grupy II jest możliwy dzięki modyfikacji DNA kodującego fragment intronu RNA, przeprowadzonej za pomocą reakcji PCR z odpowiednio dobranymi starterami (Metody, pkt 2.12). Startery zostały

zaprojektowane na podstawie wybranej sekwencji (fragment DNA genu *gspD* o wielkości 799 pz) oraz specjalnego algorytmu umożliwiającego odszukanie potencjalnych miejsc insercji intronu RNA grupy II w obrębie docelowej sekwencji DNA (Perutka i wsp., 2004). Matrycą DNA w reakcji PCR był fragment intronu RNA (Materiały, pkt 2.14). Zastosowanie do reakcji PCR odpowiednio zaprojektowanych, komplementarnych starterów IBS, EBS1d, EBS2 i EBS Universal (**Rysunek 31**) (Materiały, pkt 2.12) oraz odpowiedniego profilu temperaturowo – czasowego (Metody, pkt 3.8.1), umożliwiło otrzymanie właściwego produktu PCR o wielkości 350 pz, stanowiącego odpowiednio zmodyfikowany fragment genu kodującego intron grupy II (**Rysunek 32**).



**Rys.31.** Schemat modyfikacji DNA kodującego fragment intronu RNA grupy II za pomocą reakcji PCR przy użyciu starterów IBS, EBS1d, EBS2 i EBS Universal.



**Rys.32.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów IBS, EBS1d, EBS2 oraz EBS Universal na matrycy DNA kodującego fragment intronu grupy II.

**M** – marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas)  
**1 i 2** - fragmenty DNA o długości 350 pz, stanowiące odpowiednio zmodyfikowany fragment intronu RNA grupy II.

### *Modyfikacja fragmentu intronu grupy II w celu wprowadzenia promotora *spc**

W celu przeprowadzenia nokautu genowego w szczepie klinicznym *E. coli* DR14 (brak możliwości ekspresji w układzie Tabora-Studiera), konieczne było przeprowadzenie dodatkowej modyfikacji RNA intronu grupy II mającej na celu

wprowadzenie promotora (w tym przypadku promotora *spc*) (Liang i wsp., 1998; 1999), umożliwiającego konstytutywną ekspresję genu kodującego RNA intronu grupy II.

Zastosowanie do reakcji PCR odpowiednio zaprojektowanych, komplementarnych starterów *spc*-starter i EBS1d (Materiały, pkt 2.12) oraz odpowiedniego profilu temperaturowo – czasowego (Metody, pkt 3.8.2), umożliwiło otrzymanie właściwego produktu PCR o wielkości 410 pz, stanowiącego odpowiednio zmodyfikowany fragment genu kodującego intron grupy II pod kontrolą promotora *spc*.

#### *Konstrukcja plazmidu pACD4K-C-loxP-gspDmut oraz pACD4K-C-loxP-gspDmut-spc*

Celem tego etapu było uzyskanie plazmidów rekombinantowych *pACD4K-C-loxP-gspDmut* oraz *pACD4K-C-loxP-gspDmut-spc*, zawierających odpowiednie modyfikacje intronu RNA grupy II, umożliwiające jego rekombinację w obrębie sekwencji genu *gspD*.

Oczyszczone produkty PCR o wielkości 350 i 410 pz (DNA zmodyfikowanych fragmentów intronu RNA grupy II), poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi HindIII i BsrGI w odpowiednim buforze (Metody, pkt 3.8.3). W wyniku trawienia uzyskano DNA insertów zawierające kohezyjne końce, co umożliwiło ligację DNA insertów z wektorem *pACD4K-C-loxP* w odpowiedniej orientacji.

Liniowe cząsteczki DNA insertów (stanowiące odpowiednio zmodyfikowane DNA fragmentu genu kodującego intron grupy II, trawione odpowiednimi restryktazami) i wektora (wektor w formie liniowej, trawiony enzymami HindIII i BsrGI dostarczony w ramach zestawu TargeTron Gene Knockout System) (Materiały, pkt 2.14), poddane zostały reakcji ligacji w układzie na „lepko” (Metody, pkt. 3.8.4). Uzyskano plazmidy *pACD4K-C-loxP-gspDmut* oraz *pACD4K-C-loxP-gspDmut-spc*, które wykorzystano następnie do konstrukcji nokautowych szczepów *E. coli*.

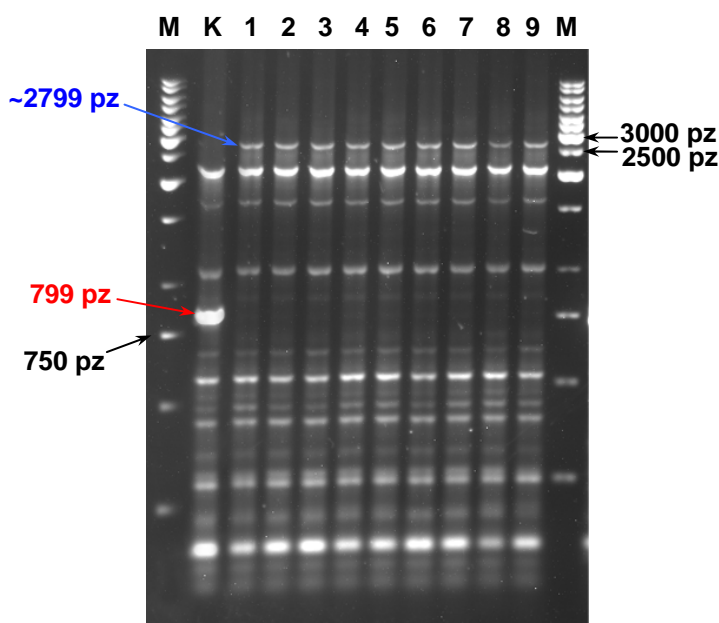
#### *Nokaut genu gspD w szczepie laboratoryjnym E. coli BL21(DE3)*

W celu przeprowadzenia nokautu genu *gspD* wykonano transformację komórek *E. coli* BL21(DE3) przy użyciu DNA mieszaniny ligacyjnej oraz ekspresję RNA intronu grupy II (Metody pkt., 3.8.5). W tym przypadku ekspresja genu kodującego intron RNA grupy II odbywa się w układzie Tabora-Studiera.

W celu identyfikacji rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)*gspDmut*, przeprowadzono reakcję PCR, z wykorzystaniem starterów GspD-1 i GspD-2

(Materiały, pkt 2.12), na matrycy DNA genomowego wyizolowanego z potencjalnych szczepów rekombinantowych (Metody, pkt 3.3). Przewidywana wielkość DNA produktu PCR wynosiła ~2799 pz (wielkość intronu ~2000 pz + wyjściowa wielkość amplifikowanego fragmentu genu *gspD* 799 pz = ~2799 pz).

Jak pokazano na **Rysunku 33**, uzyskano specyficzne produkty PCR o przewidywanej wielkości ~2799 pz. Na elektroforogramie obrazującym rozdział DNA produktów PCR, można stwierdzić (w przypadku potencjalnych rekombinantów) brak prążka DNA o wielkości 799 pz, odpowiadającego fragmentowi genu *gspD* (produkt widoczny w przypadku kontroli pozytywnej reakcji amplifikacji na matrycy DNA genomowego szczepu *E. coli* BL21(DE3), z wykorzystaniem starterów GspD-1 oraz GspD-2). Widoczny jest natomiast prążek DNA o wielkości ~2799 pz odpowiadający fragmentowi genu *gspD* z wbudowanym intronem grupy II. Widoczna na rysunku znaczna ilość niespecyficznych produktów reakcji amplifikacji, wynika najprawdopodobniej z faktu użycia do reakcji PCR genomowego DNA. Zwiększa to prawdopodobieństwo niespecyficznej (częściowej) hybrydyzacji zastosowanych starterów.



**Rys.33.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów GspD-1 oraz GspD-2 na matrycy genomowego DNA potencjalnych rekombinantowych szczepów *E. coli*.  
**M** – marker wielkości DNA 1 kbp (Fermentas)  
**K** – kontrola pozytywna reakcji PCR na matrycy genomowego DNA szczepu *E. coli* BL21(DE3)  
**1 – 9** – produkty reakcji PCR na matrycy genomowego DNA rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)*gspD*mut zawierających inaktywowany gen *gspD*

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na uzyskanie rekombinantowego szczepu *E. coli* BL21(DE3)*gspD*mut, zawierającego inaktywowany gen *gspD*.

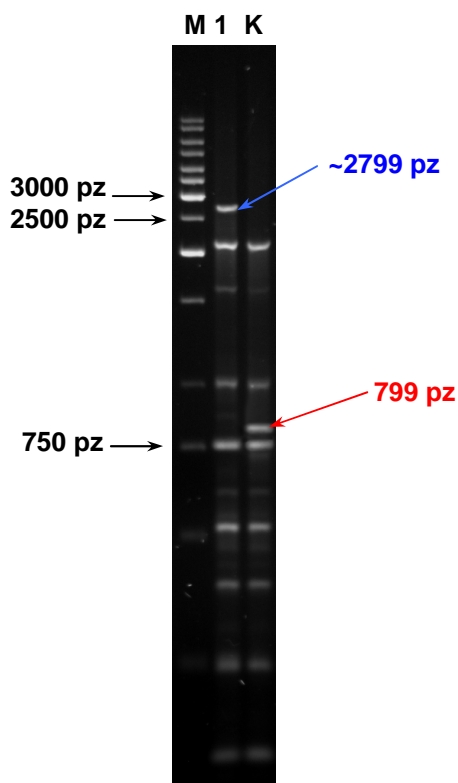


### Nokaut genu *gspD* szczepu *E. coli* DR14

Jako cel molekularny do przeprowadzenia nokautu wybrano odmianę genu *gspD*, charakterystyczną dla szczepu referencyjnego *E. coli* H10407. Wykonano transformację komórek *E. coli* DR14 przy użyciu DNA mieszaniny ligacyjnej oraz ekspresję RNA intronu grupy II (Metody pkt., 3.8.6).

W celu identyfikacji rekombinantowych szczepów *E. coli* DR14gspDmut, przeprowadzono reakcję PCR, z wykorzystaniem starterów GspD-1 i GspD-2 (Materiały, pkt 2.12), na matrycy DNA genomowego wyizolowanego z potencjalnych szczepów rekombinantowych (Metody, pkt 3.3).

Uzyskano specyficzne produkty PCR o przewidywanej wielkości ~2799 pz (**Rysunek 34**). Podobnie jak w przypadku szczepu *E. coli* BL21(DE3)gspDmut na elektroforogramie obrazującym rozdział DNA produktów PCR, można zaobserwować (w przypadku potencjalnego szczepu rekombinantowego) brak prążka DNA o wielkości 799 pz, odpowiadającego fragmentowi genu *gspD* (produkt widoczny w przypadku kontroli pozytywnej reakcji amplifikacji na matrycy DNA genomowego szczepu *E. coli* DR14). Widoczny jest natomiast prążek DNA o wielkości ~2799 pz odpowiadający fragmentowi genu *gspD* z wbudowanym intronem grupy II.



**Rys.34.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów GspD-1 oraz GspD-2 na matrycy genomowego DNA potencjalnych rekombinantowych szczepów *E. coli*.

**M** – marker wielkości DNA 1 kpz (Fermentas)

**K** – kontrola pozytywna reakcji PCR na matrycy genomowego DNA szczepu *E. coli* DR14

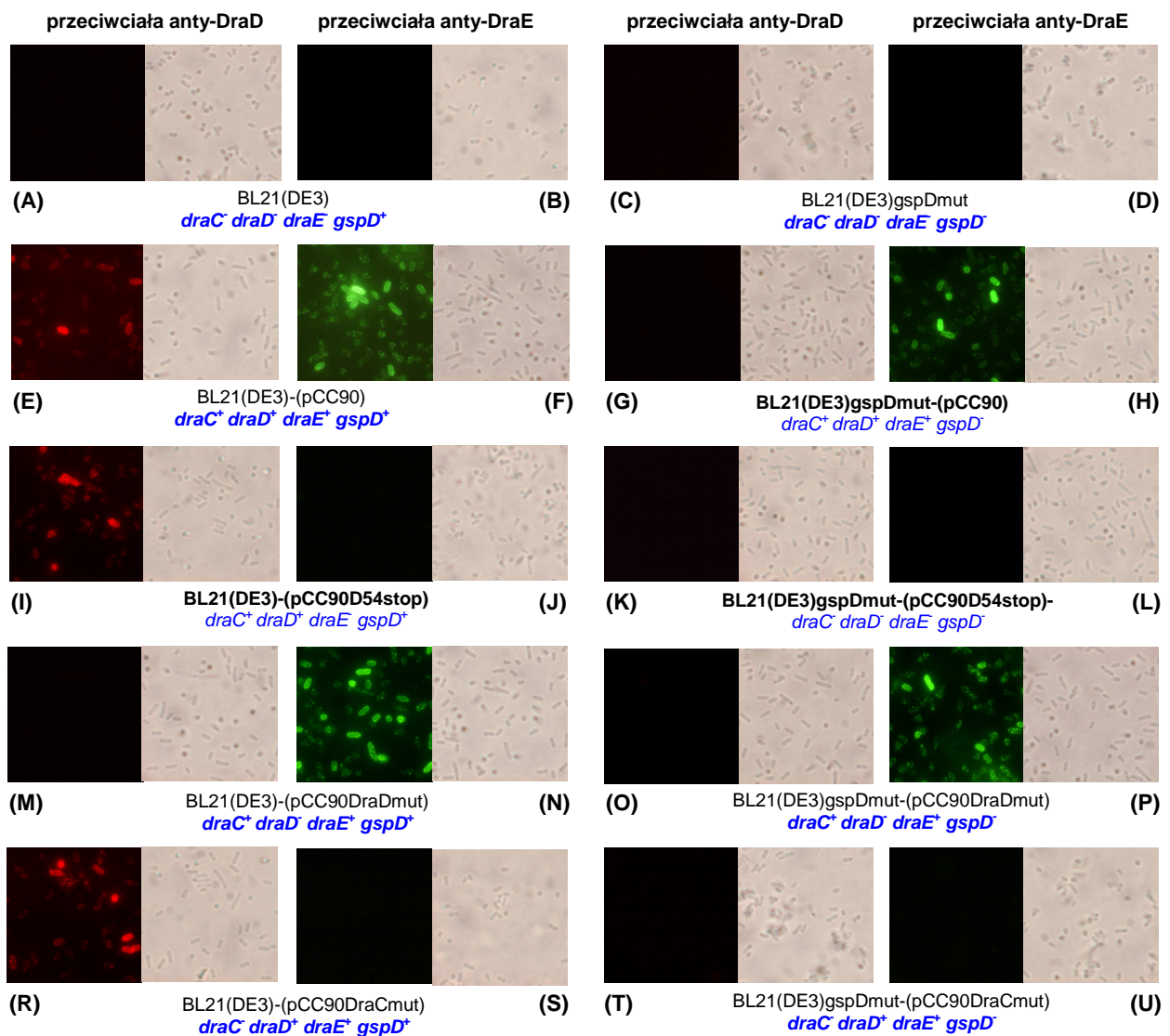
**1** – produkty reakcji PCR na matrycy genomowego DNA rekombinantowego szczepu *E. coli* DR14gspDmut zawierającego inaktywowany gen *gspD*

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na uzyskanie rekombinantowego szczepu *E. coli* DR14gspDmut, zawierającego inaktywowany gen *gspD* (odmiana charakterystyczna dla szczepu referencyjnego *E. coli* H10407).

#### **4.3.4. Określenie roli zewnątrz błonowego, kanałotwórczego białka GspD, w transporcie inwazyjnego DraD na powierzchnię komórek *E. coli* ekspresujących fimbrie typu Dr (*E. coli* Dr<sup>+</sup>)**

*Badanie rekombinantowych szczepów E. coli z zastosowaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej*

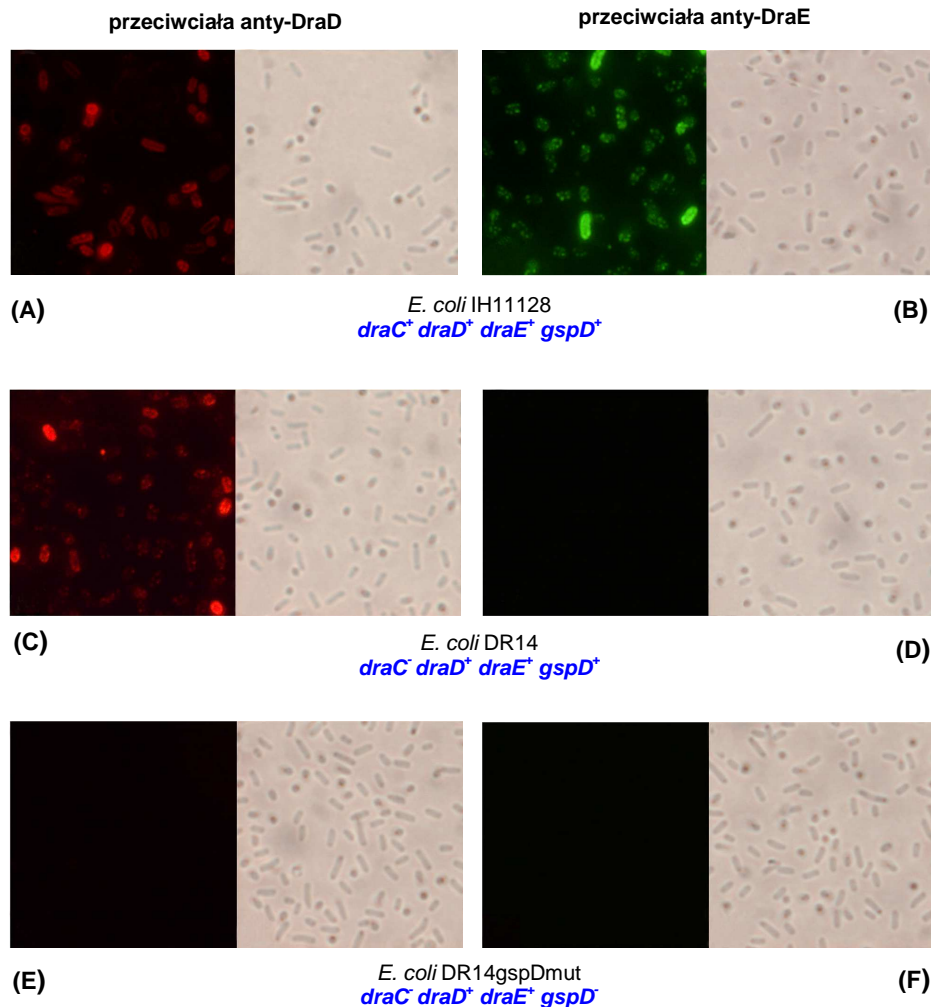
Komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmut transformowane plazmidami pCC90, pCC90DraDmut, pCC90D54stop oraz pCC90DraCmut analizowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (Metody, pkt 3.19). Kontrolę pozytywną obecności białka DraD na powierzchni komórek bakteryjnych stanowiły szczepy: *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90) (**Rysunek 35E**), zawierający operon *dra*; BL21(DE3)-(pCC90D54stop), zawierający mutację w obrębie genu *draE* (brak ekspresji fimbrii Dr) (**Rysunek 35I**) oraz BL21(DE3)-(pCC90DraCmut), zawierający mutację w obrębie genu *draC* kodującego zewnątrz błonowe białko DraC, biorące udział w transporcie białka DraE na powierzchnię komórek bakteryjnych (**Rysunek 35R**). Kontrolę negatywną doświadczenia stanowiły komórki *E. coli* transformowane plazmidem pCC90DraDmut zawierającym mutację w obrębie genu *draD* (brak ekspresji genu kodującego białko DraD) (**Rysunek 35M i O**), komórki *E. coli* BL21(DE3) (**Rysunek 35A**) oraz komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmut (**Rysunek 35C**). Do określenia lokalizacji białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* wykorzystane zostały królicze przeciwciała I rzędowe specyficzne dla białka DraD oraz przeciwciała II rzędowe znakowane izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC) (Materiały, pkt 2.18). Kontrolę poprawności wykonywanego doświadczenia, stanowiła powierzchniowa lokalizacja podjednostek fimbrialnych za pomocą króliczych przeciwciał I rzędowych specyficznych dla białka adhezyny DraE oraz przeciwciał II rzędowych znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) (**Rysunek 35B, D, F, H, J, N, L, P, S, U**) (Materiały, pkt 2.18).



**Rys. 35.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21(DE3) (A i B), BL21(DE3)gspDmut (C i D), BL21(DE3)-(pCC90) (E i F), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90) (G i H), BL21(DE3)-(pCC90D54stop) (I i J), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop) (K i L), BL21(DE3)-(pCC90DraDmut) (M i N), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut) (O i P), BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) (R i S) oraz BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut) (T i U) inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anti-DraD i anti-króliczymi znakowanymi TRITC (A, C, E, G, I, K, M, O, R, T) oraz przeciwciałami króliczymi anti-DraE i anti-króliczymi znakowanymi FITC (B, D, F, H, J, L, N, P, S, U) w połączeniu z mikrofotografiami w świetle widzialnym komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie x 10 000, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

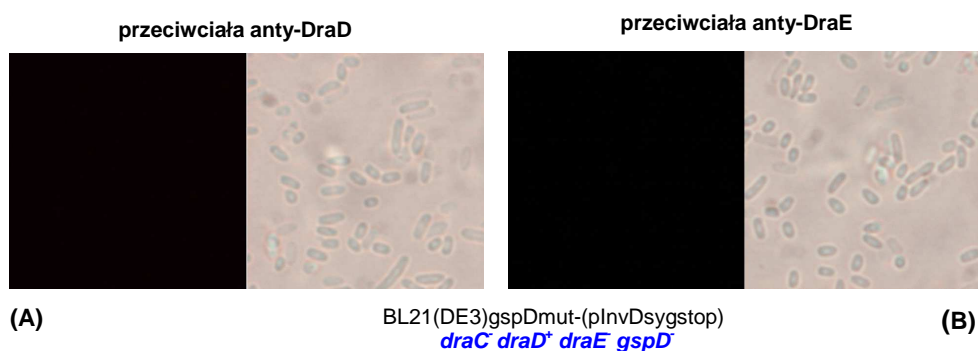
Identyczne eksperymenty przeprowadzono z użyciem klinicznych szczepów *E. coli* IH11128 (kontrola pozytywna powierzchniowej obecności białek DraE i DraD), DR14 (insercja w obrębie genu kodującego białko DraC – brak powierzchniowej obecności białka DraE) oraz DR14gspDmut (insercja w obrębie genów kodujących

zewnątrzbłonowe białka DraC i GspD) (**Rysunek 36**). Uzyskane wyniki zamieszczono także w **Tabeli 6**.



**Rys. 36.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu IH11128 (**A i B**), DR14 (**C i D**) oraz DR14gspDmut (**E i F**) inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anti-DraD i anti-króliczymi znakowanymi TRITC (**A, C, E**) oraz przeciwciałami króliczymi anti-DraE i anti-króliczymi znakowanymi FITC (**B, D, F**) w połączeniu z mikrofotografiami w świetle widzialnym komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie x 10 000, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

Przeprowadzono również doświadczenia ekspresji genu kodującego periplazmatyczną formę białka DraD w rekombinantowym szczepie BL21(DE3)gspDmut-(pInvDsygstop) - układ bez obecności białka DraC oraz GspD (**Rysunek 37**) (Materiały, pkt 2.2) (Metody, pkt 3.11). Obecność białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)gspDmut-(pInvDsygstop) analizowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (Metody, pkt 3.19).



**Rys. 37.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21(DE3)-(pInvDsygstop) inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anti-DraD i anti-króliczymi znakowanymi TRITC **(A)** oraz przeciwciałami króliczymi anti-DraE i anti-króliczymi znakowanymi FITC **(B)** w połączeniu z mikrofotografiami w świetle widzialnym komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie x 10 000, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

**Tabela 6.** Powierzchniowa ekspresja białka DraD oraz fimbrii Dr w rekombinantowych szczepach *E. coli* zawierających mutację w obrębie genu *gspD*

Szczep bakteryjny	Plazmid/wprowadzona mutacja	Powierzchniowa	Powierzchniowa
		ekspresja białka <i>DraD</i>	ekspresja fimbrii <i>Dr</i>
<i>E. coli</i>			
BL21(DE3)gspDmut	-	-	-
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90)	pCC90	-	+
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop)	pCC90D54stop::Dr-D54stop	-	-
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut)	pCC90DraDmut::ΔdraDstop	-	+
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut)	pCC90DraCmut::DraC-K15stop	-	-
DR14gspDmut	Insercja w obrębie genu <i>draC</i>	-	-
BL21(DE3)gspDmut-(pInvDsygstop)	-	-	-

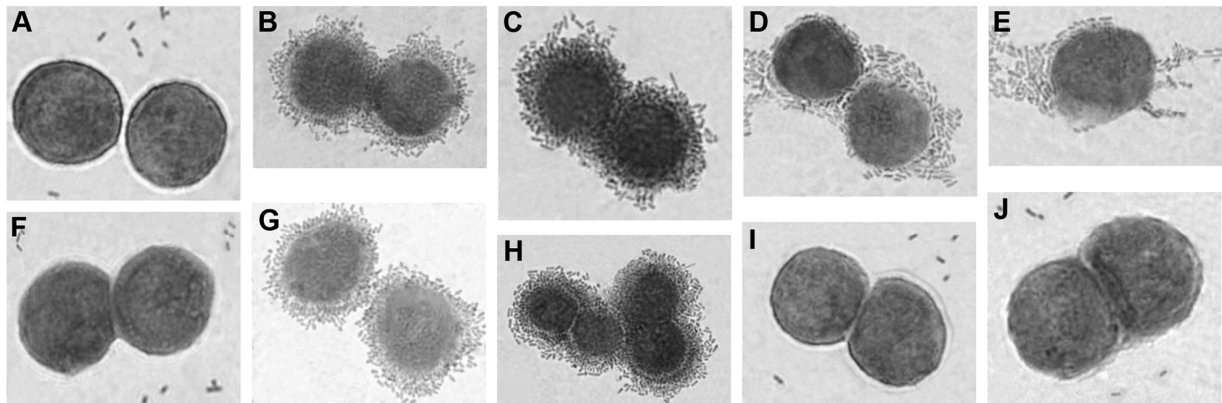
Dzięki przeprowadzonym eksperymentom nie stwierdzono obecności białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* szczepów zawierających inaktywowany gen *gspD* [BL21(DE3)gspDmut-(pCC90)] **(Rysunek 35G)** oraz w szczepach z inaktywowanym genem *gsp* i genem *draE* [BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop)] **(Rysunek 35K)** lub *draC* [BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut)] **(Rysunek 35T)**. Obecności białka DraD nie stwierdzono również w przypadku klinicznego szczepu *E. coli* DR14gspDmut zawierającego insercję w obrębie genu *gspD* **(Rysunek 36E)** oraz w rekombinantowym szczepie *E. coli* BL21(DE3)gspDmut-(pInvDsygstop) **(Rysunek 37A)**. Równocześnie nokaut genu kodującego zewnątrz błonowe białko kanałotwórcze GspD nie wpłynął na sekrecję białka DraE na bazie

homooligomerycznego kanału DraC na powierzchnię komórki bakteryjnej (**Rysunek 35H i P**).

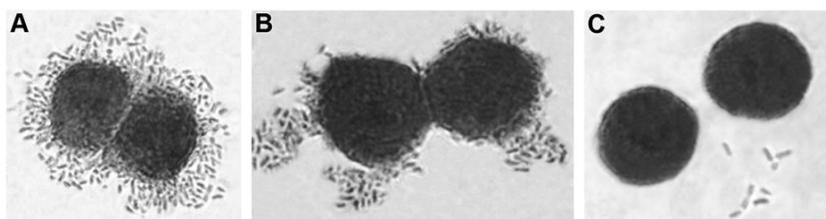
*Badanie adhezji komórek rekombinantowych szczepów E. coli do komórek linii HeLa*

Obecność białka DraD na powierzchni komórek bakteryjnych badano również poprzez ich adhezję do komórek linii HeLa (niosących na swojej powierzchni receptor  $\alpha_5\beta_1$  rozpoznawany przez białko DraD) (**Rysunek 38**). Do badań wykorzystano komórki HeLa przesiane do sześć dołkowych płytek (zaopatrzonych w szkiełka mikroskopowe) oraz hodowle bakteryjne *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90) – kontrola pozytywna powierzchniowej ekspresji białek DraE i DraD (adhezja do komórek linii HeLa) (**Rysunek 38B**), BL21(DE3)-(pCC90D54stop) – kontrola pozytywna powierzchniowej ekspresji białka DraD (adhezja do komórek linii HeLa) (**Rysunek 38D**), BL21(DE3)-(pCC90DraDmut) – kontrola pozytywna powierzchniowej ekspresji białka DraE (adhezja do komórek linii HeLa) (**Rysunek 38C**), BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) – kontrola pozytywna powierzchniowej ekspresji białka DraD (adhezja do komórek linii HeLa) (**Rysunek 38E**), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut) oraz BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut) (Metody, pkt 3.20). Kontrolę negatywną prowadzonych badań stanowiły komórki *E. coli* BL21(DE3) (**Rysunek 38A**) oraz BL21(DE3)gspDmut (**Rysunek 38F**) (brak adhezji do komórek linii HeLa). Obecność związanych z komórkami linii HeLa komórek badanych szczepów bakteryjnych analizowano z wykorzystaniem mikroskopu Olympus BX-60.

Identyczne doświadczenia wykonano z użyciem szczepów klinicznych *E. coli* IH11128 – kontrola pozytywna powierzchniowej ekspresji białka DraE i DraD (adhezja do komórek linii HeLa) (**Rysunek 39A**), DR14 (insercja w obrębie genu *draC*) – kontrola pozytywna powierzchniowej ekspresji białka DraD (adhezja do komórek linii HeLa) (**Rysunek 39B**) oraz DR14gspDmut (insercja w obrębie genu *draC* oraz *gspD*). Uzyskane wyniki zebrano także w **Tabeli 7**.



**Rys. 38.** Adhezja komórek rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3) **(A)**, BL21(DE3)-(pCC90) **(B)**, BL21(DE3)-(pCC90DraDmut) **(C)**, BL21(DE3)-(pCC90D54stop) **(D)**, BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) **(E)**, BL21(DE3)gspDmut **(F)**, BL21(DE3)gspDmut-(pCC90) **(G)**, BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut) **(H)**, BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop) **(I)** oraz BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut) **(J)** do komórek linii HeLa.



**Rys. 39.** Adhezja komórek klinicznych szczepów *E. coli* IH11128 **(A)**, DR14 **(B)** oraz DR14gspDmut **(C)** do komórek linii HeLa.

Stwierdzono zahamowanie zdolności do adhezji komórek szczepów bakteryjnych *E. coli* BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop) **(Rysunek 38I)**, BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut) **(Rysunek 38J)** oraz klinicznego szczepu DR14gspDmut **(Rysunek 39C)** do komórek linii HeLa. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na to, iż białko GspD, będące elementem systemu sekrecji typu II, bierze udział w transporcie białka DraD z perioplazmy na powierzchnię komórki bakteryjnej.



**Tabela 7.** Adhezja komórek rekombinantowych szczepów *E. coli* do komórek linii HeLa

Szczep bakteryjny	Plazmid/wprowadzona mutacja	Obecność/brak		Adhezja do komórek linii HeLa
		badanych białek		
		w komórce		
		DraE	DraD	
<i>E. coli</i>				
BL21(DE3)	-	-	-	-
BL21(DE3)-(pCC90)	pCC90	+	+	+
BL21(DE3)-(pCC90D54stop)	pCC90D54stop::Dr-D54stop	-	+	+
BL21(DE3)-(pCC90DraDmut)	pCC90DraDmut::ΔdraDstop	+	-	+
BL21(DE3)-(pCC90DraCmut)	pCC90DraCmut::DraC-K15stop	+	+	+
BL21(DE3)gspDmut	-	-	-	-
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90)	pCC90	+	+	+
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop)	pCC90D54stop::Dr-D54stop	-	+	-
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut)	pCC90DraDmut::ΔdraDstop	+	-	+
BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut)	pCC90DraCmut::DraC-K15stop	+	+	-
IH11128	-	+	+	+
DR14	Insercja w obrębie genu <i>draC</i>	+	+	+
DR14gspDmut	Insercja w obrębie genu <i>draC</i>	+	+	-

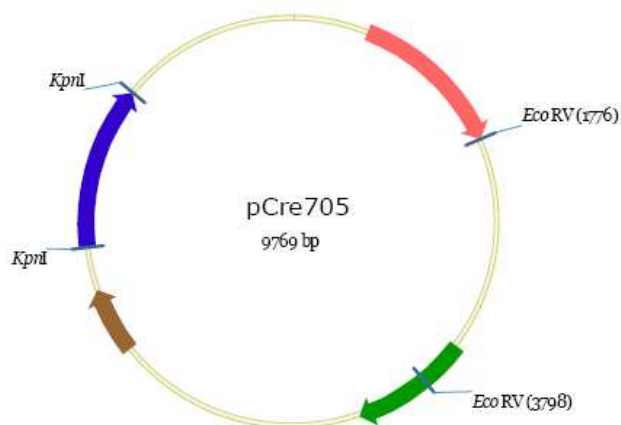
#### 4.3.5. Komplementacja *in trans* zmutowanego genu *gspD* i określenie zdolności transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej

Wycięcie genu oporności na kanamycynę przy użyciu rekombinacji *Cre-loxP* zależnej

Uzyskane szczepy *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut zawierają w obrębie sekwencji DNA genomowego, wprowadzony wraz z intronem grupy II, gen oporności na kanamycynę (*kanR*) (zlokalizowany w obrębie genu *gspD*). Obecność genu *kanR* uniemożliwia transformację komórek rekombinantowych szczepów *E. coli* z inaktywowanym genem *gspD* plazmidami zawierającymi gen oporności na kanamycynę jako marker selekcyjny. Ponieważ sekwencja genu *kanR* „flankowana” jest przez sekwencje *loxP* istnieje możliwość wycięcia genu oporności na kanamycynę w procesie miejscowo specyficznej rekombinacji katalizowanej przez białko Cre. Zastosowano plazmid pCre705 niosący gen kodujący rekombinazę Cre (Materiały, pkt 2.2) (**Rysunek 40**). Rekombinaza Cre jest powszechnie wykorzystywana do modyfikacji genomów bakteryjnych i chromosomów eukariotycznych. Warunkuje ona wprowadzanie indukcyjnych mutantów genowych



(Jones i wsp., 2005), co umożliwia badanie efektów wyłączenia ekspresji genów w poszczególnych tkankach (Anton i wsp., 1995; Vooijs i wsp., 2001). Rekombinaza Cre służy także do wycinania niepożądanych fragmentów DNA, jak np. genów oporności na antybiotyki (Dale i wsp., 1991).



**Rys. 40.** Mapa plazmidu rekombinantowego pCre705. Kolorem czerwonym oznaczono sekwencję DNA genu *repA*, kolorem zielonym sekwencję DNA genu oporności na chloramfenikol *Cm*, kolorem brązowym sekwencję DNA temperaturo-wrażliwego promotora *cI857*, kolorem niebieskim sekwencję DNA genu *cre*.

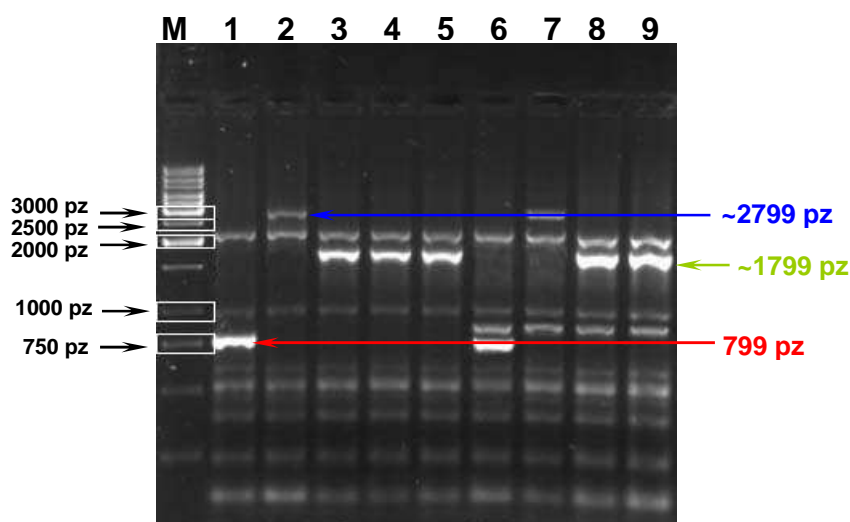
Komórki kompetentne szczepu *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz DR14gspDmut transformowano plazmidem pCre705 (Metody, pkt 3.10), a następnie przeprowadzano ekspresję genu *cre* (Metody, pkt 3.15).

Otrzymane rekombinantowe szczepy *E. coli*, nazwane *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup> i DR14gspDmutKn<sup>-</sup>, wykazujące oporność na chloramfenikol i wrażliwość na kanamycynę, poddane zostały analizie za pomocą reakcji PCR przy użyciu starterów GspD-1 i GspD-2 (Materiały, pkt 2.12), w celu potwierdzenia wycięcia genu *kanR*. Przewidywana wielkość fragmentów DNA uzyskanych w wyniku reakcji PCR wynosi: 799 pz dla szczepów *E. coli* BL21(DE3) i DR14, ~2799 pz dla szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmut i DR14gspDmut oraz ~1799 pz dla szczepu *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup> i DR14gspDmutKn<sup>-</sup> (wielkość amplifikowanego fragmentu DNA genu *gspD* wraz z insertem RNA grupy II pomniejszona o wielkość genu *kanR*, ~1000 pz).

W wyniku reakcji PCR, przeprowadzonej na matrycy genomowego DNA rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup> i DR14gspDmutKn<sup>-</sup>,

przy użyciu starterów GspD-1 oraz GspD-2 oraz zastosowaniu odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego (Metody, pkt 3.8.7), uzyskano fragmenty DNA o przewidywanych wielkościach (**Rysunek 41**).

Na elektroforogramie widoczne są prążki odpowiadające produktom PCR otrzymanym w wyniku amplifikacji fragmentu DNA genu *gspD* szczepów *E. coli* BL21(DE3) i DR14 (799 pz), *E. coli* BL21(DE3)*gspDmut* i DR14*gspDmut* z inaktywowanym genem *gspD* w wyniku insercji intronu RNA grupy II (~2799 pz) oraz *E. coli* BL21(DE3)*gspDmutKn<sup>r</sup>* i DR14*gspDmutKn<sup>r</sup>* z inaktywowanym genem *gspD* i wyciętym genem oporności na kanamycynę w procesie rekombinacji zależnej od białka Cre (~1799 pz, wielkość zamplifikowanego fragmentu DNA genu *gspD* wraz z intronem RNA pomniejszona o fragment DNA genu *kanR*). Wykonana analiza potwierdziła uzyskanie rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)*gspDmutKn<sup>r</sup>* oraz DR14*gspDmutKn<sup>r</sup>* z wyłączoną aktywnością genu *gspD* i wyciętym genem oporności na kanamycynę.



**Rys. 41.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów GspD-1 i GspD-2 na matrycy genomowego DNA badanych szczepów *E. coli*.

**M** – marker wielkości DNA 1 kbp (Fermentas)

**1** – kontrola pozytywna reakcji PCR na matrycy genomowego DNA szczepu *E. coli* BL21(DE3)

**2** – kontrola pozytywna reakcji PCR na matrycy genomowego DNA szczepu *E. coli* BL21(DE3)*gspDmut*

**3 – 5** – produkty reakcji PCR na matrycy genomowego DNA rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)*gspDmutKn<sup>r</sup>*

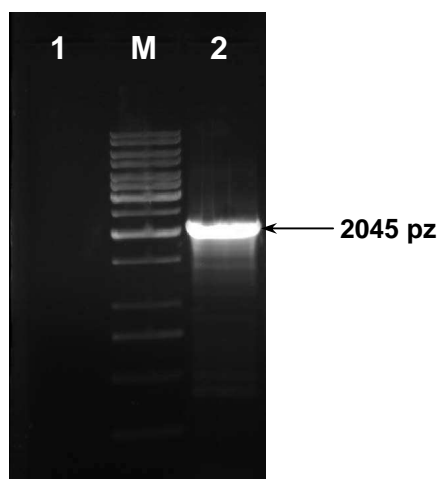
**6** – kontrola pozytywna reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *E. coli* DR14

**7** – kontrola pozytywna reakcji PCR na matrycy genomowego DNA szczepu *E. coli* DR14*gspDmut*

**8 – 9** – produkty reakcji PCR na matrycy genomowego DNA rekombinantowych szczepów *E. coli* DR14*gspDmutKn<sup>r</sup>*.

### *Konstrukcja plazmidu pET30gspD zawierającego gen kodujący zewnątrzłonowe białko kanałowe GspD*

Jako źródło matrycy do reakcji amplifikacji zastosowano DNA genomowe wyizolowane z komórek *E. coli* BL21(DE3) (Materiały, pkt 2.1) (Metody, pkt 3.3). Zastosowanie do reakcji PCR odpowiednio zaprojektowanych, komplementarnych starterów SPC-Sph oraz gspDHind (Materiały, pkt. 2.12), oraz odpowiedniego profilu temperaturowo – czasowego (Metody, pkt 3.9.1), umożliwiło otrzymanie właściwego produktu PCR o wielkości 2045 pz (**Rysunek 42**). Do produktu PCR wprowadzone zostały miejsca rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych: na końcu 5' miejsce rozpoznania dla restryktazy SphI, na końcu 3' miejsce rozpoznania dla restryktazy HindIII. Dodatkowo na 5' końcu produktu PCR wprowadzona została sekwencja promotora spc, umożliwiającego konstytutywną ekspresję genu *gspD*.



**Rys. 42.** Rozdział elektroforetyczny produktów PCR uzyskanych z użyciem starterów SPC-Sph oraz gspDHind na matrycy genomowego DNA *E. coli* BL21(DE3).

**M** – marker wielkości DNA 1 kpz (Fermentas)

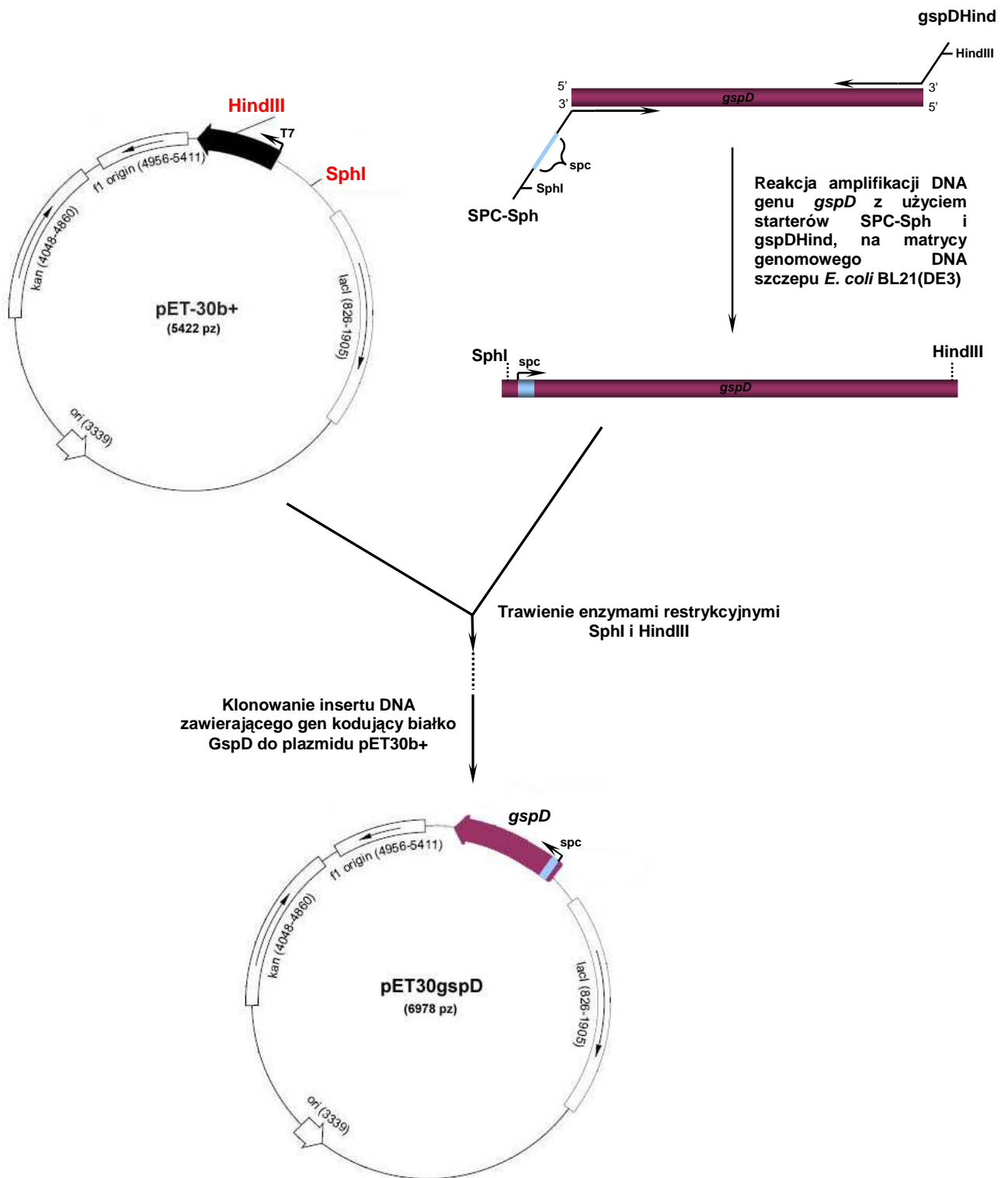
**1** – kontrola negatywna reakcji PCR

**2** – 10  $\mu$ l DNA produktu reakcji amplifikacji o wielkości około 2045 pz.

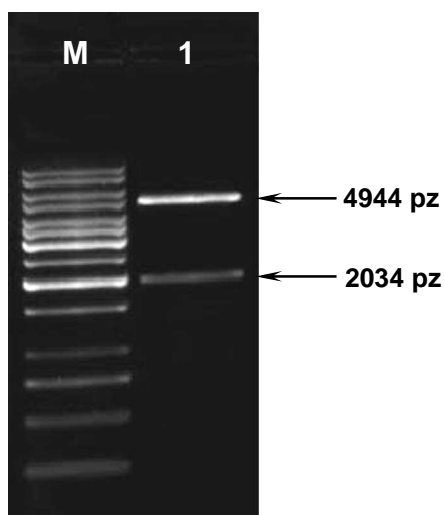
Produkt PCR o wielkości 2045 pz zawierający DNA genu kodującego białko GspD poddano reakcji trawienia restryktazami SphI oraz HindIII w odpowiednim buforze reakcyjnym (Materiały, pkt 2.11), przez 1 h, w temperaturze 37°C (Metody, pkt 3.9.2). Po reakcji trawienia, DNA oczyszczono z mieszaniny reakcyjnej i zawieszono w buforze TE. W rezultacie otrzymano cząsteczki DNA zawierające „lepkie” końce. Plazmid pET30b+ trawiono restryktazami SphI i HindIII. Trawienie wektora przeprowadzono w odpowiednim buforze (Materiały, pkt 2.11) przez jedną godzinę, w temperaturze 37°C (Metody, pkt 3.9.2). Po przeprowadzeniu trawienia DNA oczyszczono i zawieszono w buforze TE, a wydajność trawienia sprawdzono elektroforetycznie (plazmid w formie liniowej). Liniowe cząsteczki DNA insertu (zawierającego gen kodujący białko GspD) i wektora, trawione odpowiednimi

restryktazami, poddane zostały reakcji ligacji w układzie na „lepko” (Metody, pkt. 3.9.3). Komórki kompetentne *E. coli* TOP10F' transformowano DNA mieszaniny ligacyjnej (Metody, pkt. 3.10). W wyniku transformacji komórek kompetentnych *E. coli* Top10F' mieszaniną ligacyjną na płytkach Petriego z podłożem LA zawierającym kanamycynę i tetracyklinę (Materiały, pkt 2.4) otrzymano 26 białych kolonii, które przesiano na nowe płytki LA z kanamycyną i tetracykliną oraz zaszczerpiono do pożywki płynnej LB z tymi samymi antybiotykami i hodowano przez 18 h w wytrząsarce, w temperaturze 37°C. Następnie hodowle odwirowano w probówkach Eppendorfa i wyizolowano plazmidowe DNA metodą lizy alkalicznej (Materiały, pkt 2.8) (Metody, pkt. 3.2). Wyniki izolacji obserwowano podczas rozdziału plazmidów w 1% żelu agarozowym w obecności natywnego plazmidu pET30b+ (w celu porównania wielkości plazmidów rekombinantowych). Schemat klonowania genu *gspD* do wektora pET30b+ przedstawiono na **Rysunku 43**.

W celu stwierdzenia, który z plazmidów wytypowanych na podstawie różnicy w wielkości w stosunku do natywnego plazmidu pET30b+ jest plazmidem rekombinantowym, zawierającym gen kodujący białko GspD, przeprowadzono analizę restrykcyjną. Plazmidowe DNA, wyizolowane z otrzymanych klonów, poddano trawieniu restryktazami SphI i HindIII. Przewidywane wielkości fragmentów restrykcyjnych wynosiły 2034 i 4944 pz. Wyniki trawienia obserwowano w 1% żelu agarozowym po przeprowadzonej elektroforezie (**Rysunek 44**).



Rys. 43. Schemat klonowania genu *gspD*.



**Rys. 44.** Rozdział elektroforetyczny DNA plazmidów rekombinantowych pET30gspD izolowanych z otrzymanych klonów, trawionych enzymami restrykcyjnymi SphI i HindIII.

Ścieżki:

**M** – marker wielkości DNA 1 kpz (Fermentas)

**1** – DNA plazmidu rekombinantowego otrzymanego w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi SphI i HindIII, na żel naniesiono 30 µl próbki.

Przeprowadzona analiza restrykcyjna potwierdziła poprawność skonstruowanego plazmidu rekombinantowego pET30gspD, zawierającego DNA kodujące zewnątrz błonowe białko GspD.

#### *Badanie komplementacji in trans zmutowanego genu gspD przy zastosowaniu mikroskopii immunofluorescencyjnej*

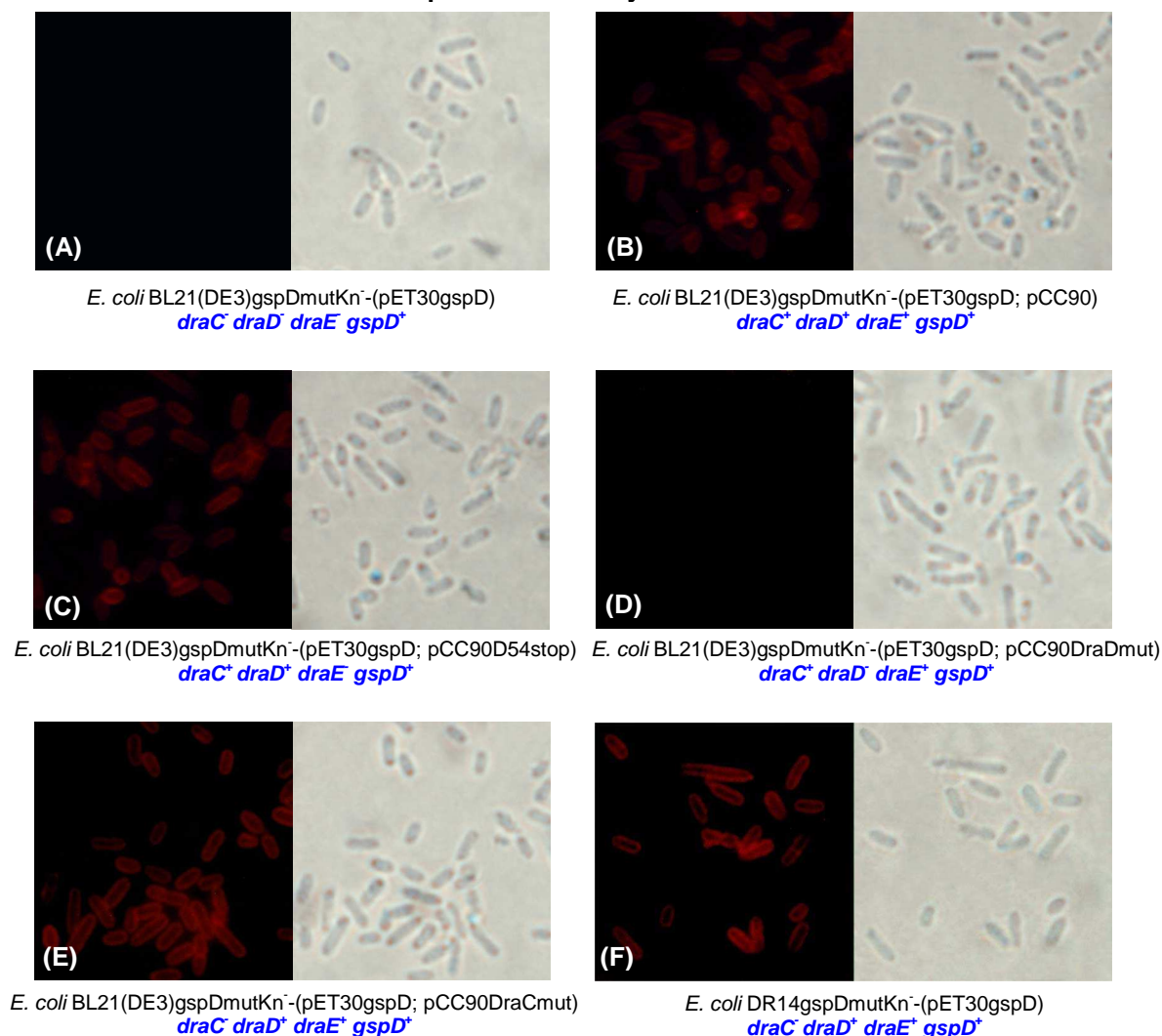
W celu potwierdzenia zdolności do transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej *E. coli* poprzez system sekrecji typu II przeprowadzono transformację komórek *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) następującymi plazmidami: pCC90, pCC90D54stop, pCC90DraDmut oraz pCC90DraCmut (Materiały, pkt 2.2). Komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) transformowane wyżej wymienionymi plazmidami analizowano przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (Metody, pkt 3.19).

Komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD), transformowane plazmidem pCC90DraDmut zawierającym mutację w obrębie genu *draD* (brak ekspresji genu kodującego białko DraD) (**Rysunek 45D**) oraz komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) (**Rysunek 45A**), stanowiły kontrolę negatywną przeprowadzonego doświadczenia.

Do określenia lokalizacji białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* wykorzystane zostały królicze przeciwciała I rzędowe specyficzne dla białka DraD oraz przeciwciała II rzędowe znakowane izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC) (Materiały, pkt 2.18).

Identyczne eksperymenty przeprowadzono z użyciem klinicznego szczepu *E. coli* DR14gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD). Uzyskane wyniki zebrano także w **Tabeli 8**.

**przeciwciała anty-DraD**



**Rys.45.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD) **(A)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90) **(B)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90D54stop) **(C)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90DraDmut) **(D)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90DraCmut) **(E)** oraz DR14gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD) **(F)** inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anty-DraD i anty-króliczymi znakowanymi TRITC w połączeniu z mikrofotografiami w świetle widzialnym komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie x 10 000, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

Stwierdzono obecność białka inwazyjnego DraD na powierzchni komórek *E. coli* szczepu BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90) **(Rysunek 45B)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90D54stop) **(Rysunek 45C)**,

BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraCmut) (**Rysunek 45E**) oraz DR14gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) (**Rysunek 45F**).

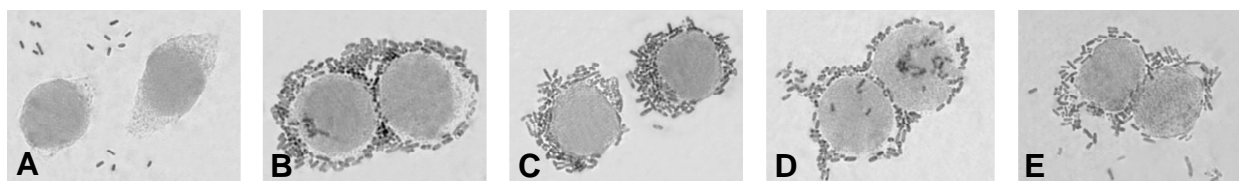
**Tabela 8.** Powierzchniowa ekspresja białka DraD w rekombinantowych szczepach *E. coli* BL21(DE3) w teście komplementacji *in trans* zmutowanego genu *gspD*

Szczep bakteryjny	Plazmid/wprowadzona mutacja	Obecność/brak badanych białek w komórce		Powierzchnio wa ekspresja białka DraD
		DraE	DraD	
<i>E. coli</i>				
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD)	-	-	-	-
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90)	pCC90	+	+	+
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90D54stop)	pCC90D54stop::Dr-D54stop	-	+	+
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90DraDmut)	pCC90DraDmut::ΔdraDstop	+	-	-
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90DraCmut)	pCC90DraCmut::DraC-K15stop	+	+	+
DR14gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD)	Insercja w obrębie genu <i>draC</i>	+	+	+

*Badanie komplementacji in trans zmutowanego genu gspD przy zastosowaniu testu adhezji komórek szczepów E. coli do komórek linii HeLa*

Obecność białka DraD na powierzchni komórek bakteryjnych określono również w doświadczeniach adhezji pomiędzy komórkami linii HeLa (niosącymi na swojej powierzchni receptor  $\alpha_5\beta_1$  rozpoznawany przez białko DraD), a uzyskanymi szczepami rekombinantowymi. Do badań wykorzystano komórki HeLa przesiane do sześćć dołkowych płytek (zaopatrzonych w szkiełka mikroskopowe) oraz hodowle bakteryjne *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90) – kontrola pozytywna adhezji do komórek linii HeLa (**Rysunek 46B**), BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90D54stop), BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraDmut) – kontrola pozytywna adhezji do linii komórkowej HeLa (**Rysunek 46C**) oraz BL21(DE3)gspDmut-(pET30gspD;pCC90DraCmut), w których przeprowadzono ekspresję genu kodującego białko GspD (Metody, pkt 3.20). Jako kontrolę negatywną zastosowano komórki *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) – brak adhezji do linii komórkowej HeLa (**Rysunek 46A**). Obecność związanych z komórkami linii HeLa szczepów bakteryjnych, analizowano z wykorzystaniem mikroskopu Olympus BX-60. Uzyskane wyniki umieszczono w **Tabeli 9**.





**Rys. 46.** Adhezja komórek rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) **(A)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90) **(B)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraDmut) **(C)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90D54stop) **(D)** oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraCmut) **(E)** do komórek linii HeLa.

Dzięki przeprowadzonym doświadczeniom stwierdzono zdolność do adhezji komórek szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90D54stop) **(Rysunek 46D)** oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraCmut) **(Rysunek 46E)** do komórek linii HeLa.

**Tabela 9.** Adhezja komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmut w teście komplementacji *in trans* zmutowanego genu *gspD* do komórek linii HeLa

Szczep bakteryjny	Plazmid/wprowadzona mutacja	Obecność/brak badanych białek w komórce		Adhezja do linii komórkowej HeLa
		DraE	DraD	
<i>E. coli</i>				
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD)	-	-	-	-
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90)	pCC90	+	+	+
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90D54stop)	pCC90D54stop::Dr-D54stop	-	+	+
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90DraDmut)	pCC90DraDmut::ΔdraDstop	+	-	+
BL21(DE3)gspDmutKn <sup>-</sup> -(pET30gspD;pCC90DraCmut)	pCC90DraCmut::DraC-K15stop	+	+	+

#### *Analiza frakcji pożywek po ekspresji genu kodującego białko DraD w rekombinantowych szczepach E. coli*

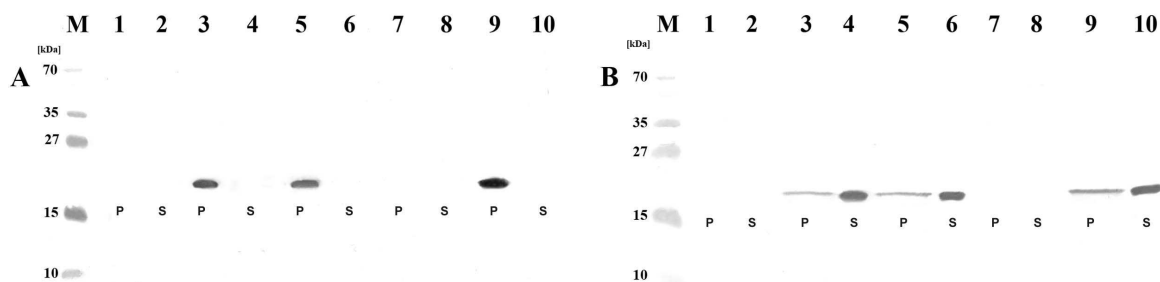
Opublikowane doniesienia (dotyczące białek AfaE - białko różniące się od białka DraE trzema resztami aminokwasowymi oraz AfaD - homolog białka DraD) wskazują na zdolność do uwalniania białka AfaD z powierzchni komórki bakteryjnej do supernatantu (Jouve i wsp., 1997). Operon *afa-3* determinuje powstawanie na powierzchni komórki bakteryjnej otoczki adhezyjnej zbudowanej z białek AfaE oraz AfaD. Analiza (przy użyciu techniki Western blotting z zastosowaniem specyficznych przeciwciał) osadu komórkowego oraz pożywek po ekspresji genów kodujących oba te białka w rekombinantowym szczepie *E. coli* wykazała, iż białko AfaE, związane

jest w głównej mierze z osadem komórkowym, natomiast białko AfaD, na skutek uwalniania z powierzchni komórki, zlokalizowane jest również w pożywce uzyskanej po ekspresji (Jouve i wsp., 1997). W związku z powyższym przeprowadzono podobne doświadczenia z wykorzystaniem frakcji periplazmatycznych oraz supernatantów (pożywek) po ekspresji genu kodującego białko DraD w rekombinantowych szczepach *E. coli* (Metody, pkt. 3.12; 3.13).

Do doświadczenia wykorzystano szczepy *E. coli* BL21(DE3)gspDmut (nokaut w obrębie genu *gspD* powodujący inaktywację systemu sekrecji typu II) oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) (komplementacja *in trans* genu *gspD* powodująca przywrócenie funkcjonalności systemu sekrecji typu II) transformowane następującymi plazmidami: pCC90, pCC90D54stop, pCC90DraDmut oraz pCC90DraCmut.

Po przeprowadzonej ekspresji genów kodujących zewnątrz błonowe białko GspD oraz natywne białka DraD i DraE w komórkach *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) transformowanych odpowiednimi plazmidami (Metody, pkt. 3.12; 3.13), wykonano precypitację uzyskanych supernatantów (Metody, pkt. 3.21). Osad bakteryjny ze 100 ml hodowli komórek *E. coli* BL21(DE3)gspDmut oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) wykorzystano do izolacji frakcji periplazmatycznej metodą szoku osmotycznego według procedury przedstawionej przez Jędrzejczaka i wsp., 2006. Uzyskane frakcje analizowano za pomocą elektroforezy poliakryloamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i techniki immunoblottingu z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla białka DraD (**Rysunek 47**) (Metody, pkt 3.17).

Kontrolę negatywną obecności białka DraD w supernatancie stanowiły szczepy *E. coli* BL21(DE3)gspDmut (**Rysunek 47A, ścieżka 2**), BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD) (**Rysunek 47B, ścieżka 2**), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90) (**Rysunek 47A, ścieżka 4**), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90D54stop) (**Rysunek 47A, ścieżka 6**), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut) (**Rysunek 47A, ścieżka 8**), BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraDmut) (**Rysunek 47B, ścieżka 8**) oraz BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraCmut) (**Rysunek 47A, ścieżka 10**). Równocześnie szczepy *E. coli* BL21(DE3)gspDmut, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD), BL21(DE3)gspDmut-(pCC90DraDmut) oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraDmut) stanowiły kontrolę negatywną obecności białka DraD w periplazmie (**Rysunek 47A i B, ścieżki 1 i 6**).



**Rys. 47.** Immunoidentyfikacja białka DraD we frakcjach periplazmatycznych i supernatantach rekombinowanych szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmut **(A)** oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD) **(B)** za pomocą techniki Western blotting z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał anti-DraD.

**M** – marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting (Fermentas) – 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 i 10 kDa

**1** – frakcja periplazmatyczna rekombinantowego szczepu *E. coli*

**2** – supernatant po ekspresji w rekombinantowym szczepie *E. coli*

**3** – frakcja periplazmatyczna rekombinantowego szczepu *E. coli* transformowanego plazmidem pCC90

**4** – supernatant po ekspresji w rekombinantowym szczepie *E. coli* transformowanym plazmidem pCC90

**5** – frakcja periplazmatyczna rekombinantowego szczepu *E. coli* transformowanego plazmidem pCC90D54stop

**6** – supernatant po ekspresji w rekombinantowym szczepie *E. coli* transformowanym plazmidem pCC90D54stop

**7** – frakcja periplazmatyczna rekombinantowego szczepu *E. coli* transformowanego plazmidem pCC90DraDmut

**8** – supernatant po ekspresji w rekombinantowym szczepie *E. coli* transformowanym plazmidem pCC90DraDmut

**9** – frakcja periplazmatyczna rekombinantowego szczepu *E. coli* transformowanego plazmidem pCC90DraCmut

**10** – supernatant po ekspresji w rekombinantowym szczepie *E. coli* transformowanym plazmidem pCC90DraCmut.

Oznaczenia:

P – periplazma; S – supernatant.

Dzięki przeprowadzonym eksperymentom stwierdzono obecność białka DraD w periplazmie i supernatancie uzyskanym po ekspresji w szczepach *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90) **(Rysunek 47B, ścieżki 3 i 4)**, BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90D54stop) **(Rysunek 47B, ścieżki 5 i 6)** oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>(pET30gspD;pCC90DraCmut) **(Rysunek 47B, ścieżki 9 i 10)**. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość komplementacji *in trans*

zmutowanego genu *gspD* przez plazmid pET30gspD, skutkiem czego jest przywrócenie funkcjonalności systemu sekrecji typu II i transport białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej za pośrednictwem tego systemu sekrecji.

### **Podsumowanie**

Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90), BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraDmut), BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90D54stop) oraz BL21(DE3)gspDmutKn<sup>-</sup>-(pET30gspD;pCC90DraCmut), przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej oraz testu adhezji do linii komórkowej HeLa, a także analiza frakcji supernatantów uzyskanych po ekspresji w rekombinantowych szczepach *E. coli*, potwierdziły wcześniej uzyskane wyniki, świadczące o tym, iż białko GspD będące istotnym elementem systemu sekrecji typu II, bierze udział w transporcie białka DraD z periplazmy na powierzchnię komórki bakteryjnej.

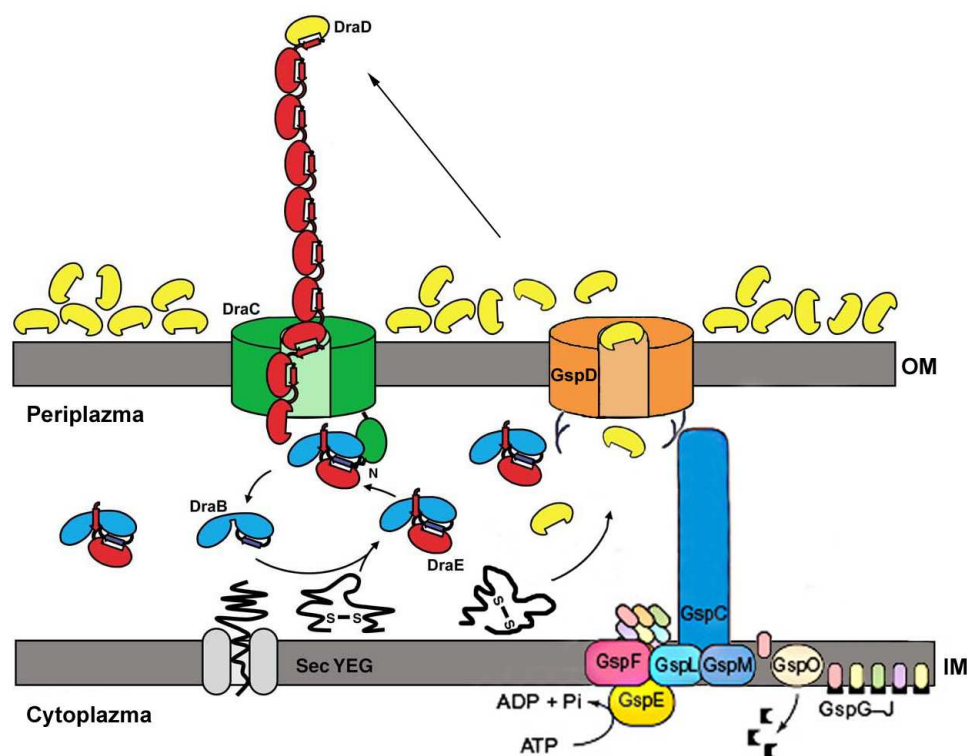
## 5. DYSKUSJA I WNIOSKI KOŃCOWE

Transport białka DraE na powierzchnię komórek bakteryjnych odbywa się na drodze systemu sekrecji typu "chaperone/usher" (Piątek i wsp., 2005). Zarówno białko opiekuńcze („chaperone”) DraB, jak i zewnątrz błonowe białko kanałowe („usher”) DraC są niezbędne do biogenezy fimbrii Dr. Fimbrie Dr to homopolimery zbudowane z powtarzających się monomerów podjednostki fimbrialnej, białka adhezyny DraE. W jednym z opublikowanych doniesień (Anderson i wsp., 2004) zasugerowano, iż białko DraD może stanowić podjednostkę fimbrialną zlokalizowaną na szczycie fimbrialnego polimeru. Można jednak zaproponować kilka alternatywnych scenariuszy. Jedną z hipotetycznych możliwości, to założenie iż białko DraD nie stanowi komponentu fimbrii Dr i tworzy niezależne struktury powierzchniowe. Alternatywne założenie to możliwość występowania białka DraD w dwóch formach – związanej ze strukturą fimbrialną oraz tworzącej afimbrialną otoczkę na powierzchni komórki bakteryjnej. Uzyskane w przedłożonej rozprawie doktorskiej wyniki pozwoliły na weryfikację powyższych hipotez i zaproponowanie przybliżonego modelu mechanizmu transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej, uwiarygodnionego wieloma eksperymentami (**Rysunek 48**).

Przeprowadzone badania umożliwiły między innymi, określenie roli zewnątrz błonowego białka DraC (kodowanego przez operon *dra*) w transporcie białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej. W tym celu skonstruowano, z wykorzystaniem techniki mutagenезы ukierunkowanej, plazmid pCC90DraCmut, kodujący operon *dra* ze zmutowanym genem *draC* (trójkę nukleotydów kodującą lizynę (Lys-11) zastąpiono kodonem stop). Wprowadzona mutacja uniemożliwia ekspresję genu kodującego zewnątrz błonowe, kanałotwórcze białko DraC, konsekwencją czego jest brak powierzchniowej ekspresji fimbrii typu Dr i akumulacja kompleksów białko opiekuńcze DraB – podjednostka fimbrialna DraE w periplazmie. Uzyskany wynik potwierdzony został przy użyciu techniki immunodetekcji Western blotting oraz przy użyciu techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla białka adhezyny DraE.

Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej, przy użyciu króliczych przeciwciał anti-Dr (anti-Dr-anty-FITC) oraz anti-DraD (anti-DraD-anty-TRITC), umożliwiły wykrycie na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90DraCmut), jedynie białka DraD. Nie zaobserwowano na powierzchni komórek obecności białka DraE. Jednakowe wyniki

uzyskane zostały dla komórek *E. coli* BL21(DE3) transformowanych plazmidem pBJN417 oraz dla klinicznego szczepu *E. coli* DR14, zawierających cały operon *dra* z insercją transpozonoową w obrębie genu *draC* (brak ekspresji genu kodującego białko DraC).



**Rys. 48.** Hipotetyczny model najbardziej prawdopodobnego mechanizmu transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej.

W pierwszej kolejności następuje transport białka DraD poprzez błonę wewnętrzną do przestrzeni perioplazmatycznej za pośrednictwem systemu Sec. Tu następuje poprawne złożenie białka. Kolejny etap obejmuje transport białka DraD poprzez błonę zewnętrzną na powierzchnię komórki bakteryjnej za pośrednictwem systemu transportu typu II. Przy odpowiednim stężeniu białka DraD w otoczkowej następuje związanie się białka ze szczytową podjednostką DraE fimbrii Dr.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że białko DraC, tworzące kanał w zewnętrznej błonie komórkowej, umożliwiający transport i polimeryzację podjednostki fimbrialnej, białka DraE, nie bierze udziału w sekrecji białka DraD na powierzchnię komórek uropatogennych szczepów *E. coli*.

W celu potwierdzenia zaproponowanej hipotezy, przeprowadzono badania z wykorzystaniem rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)-(pInvDsyg-C-His) oraz BL21(DE3)-(pInvDsygstop), eksprymujących geny kodujące odpowiednio białko DraD z domeną polihistydynową oraz natywne białko DraD bez domen fuzyjnych

(zarówno plazmid pInvDsyg-C-His jak i pInvDsygstop nie zawierają w swojej sekwencji pozostałych genów operonu *dra*). W wyniku przeprowadzenia doświadczeń z wykorzystaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej, stwierdzono obecność białka DraD na powierzchni komórek analizowanych szczepów bakteryjnych. Wskazuje to na transport białka DraD na powierzchnię komórki bez udziału białka DraC, co sugeruje udział innego zewnątrzłonowego białka kanałowego.

W celu zdefiniowania roli białka DraD w procesie biogenezy fimbrii Dr zbudowanych z podjednostek białka DraE przeprowadzono ekspresję fimbrii Dr w komórkach transformowanych plazmidami pCC90 (plazmid zawierający operon *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych), pCC90DraDmut (plazmid zawierający operon *dra* z mutacją w obrębie genu *draD*) oraz pCC90D54stop (plazmid zawierający operon *dra* z mutacją w obrębie genu *draE*). Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (przy użyciu przeciwciał anti-Dr oraz anti-DraD) oraz immunoblottingu (przy użyciu przeciwciał anti-Dr). Obserwowany poziom ekspresji genu kodującego białko DraE zarówno w komórkach *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90) jak i BL21(DE3)-(pCC90DraDmut) był na jednakowym poziomie. Mikroskopia immunofluorescencyjna z użyciem przeciwciał anti-DraD (anti-DraD-anty-TRITC) wykazała obecność białka DraD na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)-(pCC90D54stop) oraz BL21(DE3)-(pBJN17). Świadczy to o niezależnej sekrecji obu tych białek na powierzchnię komórek bakteryjnych oraz o tym, że białko DraD nie bierze udziału w biogenezie fimbrii Dr. Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem rekombinantowych szczepów *E. coli* z mutacją w obrębie genu *draD* (szczep *E. coli* BL21(DE3) transformowany odpowiednio DNA plazmidu pCC90DraDmut lub pBJN4) oraz *draE* (szczep *E. coli* BL21(DE3) transformowany odpowiednio DNA plazmidu pCC90D54stop lub pBJN17) wskazują również na to, że ekspresja genu kodującego jedno z tych białek nie wpływa na ekspresję drugiego.

Natywne białko DraD zawiera N-terminalną sekwencję sygnałną, dzięki której następuje transport tego białka z cytoplazmy do przestrzeni periplazmatycznej poprzez system Sec. Na tej podstawie można było wywnioskować, że transport białka DraD na powierzchnię komórki odbywa się poprzez dwuetapowy system sekrecji, w którym w pierwszej kolejności następuje transport białka do przestrzeni periplazmatycznej z wykorzystaniem systemu Sec, a następnie translokacja przez

blonę zewnętrzną na powierzchnię komórki. Warunki te spełniają szlaki transportu głównego systemu sekrecji białek (ang. General Secretary Pathway - GSP) do którego zaliczamy szlak sekrecji typu II, szlak sekrecji „chaperone/usher”, oraz szlak sekrecji typu V (autotransporterzy). Jako drogę transportu białka DraD wykluczyć można sekrecję typu V, gdyż inwazyjna DraD nie spełnia warunków stawianych dla tego typu transportu (Desvaux i wsp., 2004): jest to białko małe (13,6 kDa), posiadające wprawdzie sekwencję sygnałną, nie posiadające jednak charakterystycznej dla autotransporterów C-terminalnej  $\beta$ -domeny. W związku z tym, iż zewnątrzblonowe białko DraC jest elementem systemu sekrecji „chaperone/usher”, a w toku badań stwierdzono iż białko DraD może ulegać translokacji poprzez błonę zewnętrzną niezależnie od białka DraC, odrzucić można również ten system sekrecji. W związku z powyższym wydaje się, iż jedynym systemem, który może brać udział w sekrecji białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej, jest szlak sekrecji typu II. W celu ostatecznej weryfikacji drogi transportu białka DraD niezbędne było skonstruowanie komórek *E. coli* zawierających mutacje w obrębie genów kodujących białka szlaku sekrecji typu II.

Jako cel molekularny dalszych badań, zmierzających do określenia drogi transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej, wybrano białko GspD będące istotnym elementem systemu sekrecji typu II. Zewnątrzblonowe białko GspD, tworzy duży oligomer, zbudowany z 12-14 podjednostek, stanowiący kanał transportujący białka przez błonę zewnętrzną na powierzchnię komórki (Sandkvist, 2001). W literaturze opisano dwie odmiany białek GspD, pochodzących ze szczepów *E. coli*, należących do systemu sekrecji typu II. Jest to białko GspD pochodzące ze szczepu *E. coli* H10407 (Tauschek i wsp., 2002) oraz białko GspD pochodzące ze szczepu *E. coli* K-12 (Blattner i wsp., 1997). Białka te różnią się między sobą wielkością (białko GspD pochodzące ze szczepu *E. coli* H10407 zbudowane jest z 616 reszt aminokwasowych – 66,35 kDa, natomiast białko GspD pochodzące ze szczepu K-12 z 650 reszt aminokwasowych – 70,69 kDa) oraz w znacznej mierze składem aminokwasowym. Białka kodowane przez obie odmiany genów wykazują 53,8% identyczności sekwencji aminokwasowej. Stwierdzono także 50,7% identyczności sekwencji nukleotydowej analizowanych genów *gspD*.

Wykorzystanie powszechnie stosowanej techniki laboratoryjnej, którą jest reakcja PCR, umożliwiło stwierdzenie obecności systemu sekrecji typu II w szczepie laboratoryjnym *E. coli* BL21(DE3) oraz w klinicznych szczepach *E. coli* IH11128



(uropatogenny szczep *E. coli* ekspresyjny fimbrie Dr) i DR14 (uropatogenny szczep *E. coli* niosący operon *dra*, z mutacją insercyjną w obrębie genu *draC*). Dodatkowo w szczepach klinicznych IH11128 i DR14 stwierdzono obecność dwóch odmian genu *gspD* charakterystycznych zarówno dla szczepu *E. coli* H10407 jak i K-12.

W celu określenia roli zewnątrz błonowego białka GspD, należącego do systemu sekrecji typu II, w transporcie białka inwazyjnego DraD na powierzchnię komórki, skonstruowano szczepy *E. coli* BL21(DE3)*gspD*mut oraz DR14*gspD*mut, posiadające inaktywowany gen *gspD*. Wykorzystano w tym celu technikę nokautu genowego, wykorzystującą zdolność intronów grupy II (po odpowiedniej ich modyfikacji) do rekombinacji w ściśle określonym miejscu docelowym w sekwencji DNA. Wprowadzenie intronu grupy II do sekwencji DNA genu *gspD*, uniemożliwia ekspresję genu kodującego zewnątrz błonowe, kanałotwórcze białko GspD, a tym samym powoduje inaktywację szlaku sekrecji typu II.

Do określenia obecności białka DraD na powierzchni komórek bakteryjnych z inaktywowanym genem *gspD*, wykorzystano technikę mikroskopii immunofluorescencyjnej. Do doświadczeń użyte zostały królicze przeciwciała I rzędowe specyficzne dla białka DraD oraz przeciwciała II rzędowe znakowane izotiocyanianem tetrametylorodaminy (TRITC). Jako kontrolę poprawności wykonywanego doświadczenia, określono powierzchniową lokalizację podjednostek fimbrialnych za pomocą króliczych przeciwciał I rzędowych specyficznych dla białka adhezyny DraE oraz przeciwciał II rzędowych znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC).

Przeprowadzone eksperymenty umożliwiły stwierdzenie, iż na powierzchni komórek *E. coli* szczepów BL21(DE3)*gspD*mut-(pCC90), BL21(DE3)*gspD*mut-(pCC90D54stop), BL21(DE3)*gspD*mut-(pCC90DraCmut), BL21(DE3)*gspD*mut-(pInvDsygstop) oraz DR14*gspD*mut nie występuje białko DraD.

Obecność białka DraD na powierzchni komórek bakteryjnych określano również dzięki doświadczeniom adhezji komórek uzyskanych szczepów rekombinantowych do komórek linii HeLa (niosących na swojej powierzchni receptor  $\alpha_5\beta_1$  rozpoznawany przez białko DraD). Dzięki wykonanym doświadczeniom stwierdzono brak adhezji komórek rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)*gspD*mut-(pCC90D54stop) i BL21(DE3)-(pCC90DraCmut) oraz klinicznego szczepu *E. coli* DR14*gspD*mut do komórek linii HeLa. Przeprowadzone

eksperymenty mogą wskazywać na udział zewnątrzłonowego homooligomeru GspD w transporcie białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej.

Aby potwierdzić uzyskane wyniki przeprowadzono doświadczenie komplementacji *in trans* zmutowanego genu *gspD*. W tym celu komórki *E. coli* BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>* oraz DR14*gspDmutK<sup>n-</sup>* transformowano DNA wcześniej skonstruowanego plazmidu pET30*gspD*, umożliwiającego ekspresję genu kodującego zewnątrzłonowe kanałowe białko GspD w sposób konstytutywny. Tak uzyskany szczep *E. coli* BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*) transformowano następnie plazmidami pCC90, pCC90D54stop, pCC90DraDmut oraz pCC90DraCmut. Aby określić zdolność do transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej *E. coli*, skonstruowane szczepy bakteryjne analizowano z wykorzystaniem techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej przy użyciu przeciwciał specyficznych dla białka DraD. Stwierdzono obecność białka inwazyjnego DraD na powierzchni komórek *E. coli* szczepu BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*;pCC90), BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*;pCC90D54stop), BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*;pCC90DraCmut) oraz DR14*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*). Sekrecja białka DraD w analizowanych szczepach *E. coli* zawierających inaktywowany gen *gspD*, została przywrócona w wyniku ekspresji genu kodującego białko GspD.

Skonstruowane szczepy bakteryjne wykorzystano następnie w teście adhezji do komórek linii HeLa. Stwierdzono zdolność komórek rekombinantowych szczepów *E. coli* BL21(DE3)*gspDmut*-(pET30*gspD*;pCC90D54stop) oraz BL21(DE3)*gspDmut*-(pET30*gspD*;pCC90DraCmut) adhezji do komórek linii HeLa.

W celu ostatecznej weryfikacji uzyskanych wyników przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem frakcji periplazmatycznych oraz supernatantów po ekspresji genu kodującego białko DraD w rekombinantowych szczepach *E. coli* BL21(DE3)*gspDmut* oraz BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*) transformowanych plazmidami: pCC90, pCC90D54stop, pCC90DraDmut oraz pCC90DraCmut. Stwierdzono obecność białka DraD we frakcjach periplazmatycznych i supernatantach uzyskanych po ekspresji w szczepach *E. coli* BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*;pCC90), BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*;pCC90D54stop) oraz BL21(DE3)*gspDmutK<sup>n-</sup>*-(pET30*gspD*;pCC90DraCmut). Komplementacja *in trans* zmutowanego genu *gspD* przez plazmid pET30*gspD*, przywraca funkcjonalność systemu sekrecji typu II czego konsekwencją jest transport białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej.

Przeprowadzone doświadczenia jednoznacznie wskazują na to, iż sekrecja białka DraD odbywa się poprzez zewnątrz błonowe białko kanałowe GspD będące kluczowym elementem systemu sekrecji typu II. Można zatem wyciągnąć wniosek, iż system sekrecji typu II bierze udział w transporcie białka DraD z periplazmy na powierzchnię komórki bakteryjnej.

Uzyskane wyniki są niezwykle istotne z punktu widzenia molekularnych podstaw patogenezy infekcji dróg moczowych wywoływanych przez uropatogenne szczepy *E. coli* Dr<sup>+</sup>. Niezależny transport białka DraD poprzez system sekrecji typu II może mieć wpływ na stężenie białka DraD na powierzchni komórki bakteryjnej, które może być istotne dla efektywnego procesu inwazji do wnętrza komórki eukariotycznej. Efektywność internalizacji komórek linii HeLa jest wprost proporcjonalna do stężenia białka DraD na powierzchni komórki bakteryjnej (im większe stężenie białka DraD tym efektywniejszy proces internalizacji) (Jouve i wsp., 1997). Być może odpowiednio wysokie stężenie białka DraD na powierzchni komórki bakteryjnej sprzyja także wiązaniu z podjednostką DraE zlokalizowaną na szczycie fimbrii Dr („capping” struktury fimbrialnej). Uzyskane wyniki upoważniają do wskazania najbardziej prawdopodobnego mechanizmu transportu białka DraD na powierzchnię komórki bakteryjnej oraz stwierdzenia występowania na powierzchni komórki białka DraD w dwóch formach – związanej ze strukturą fimbrialną oraz tworzącej afimbrialną otoczkę (**Rysunek 48**). Potwierdzona niezależna ekspresja genów kodujących białka DraE i DraD może mieć również wpływ na przeżywalność komórek bakteryjnych wewnątrz komórek eukariotycznych. Dodatkowo zdolność białka DraD do uwalniania się z powierzchni komórki bakteryjnej może stanowić molekularną podstawę mechanizmu wywoływania chronicznych i nawracających infekcji dróg moczowych.

## 6. DOROBEK NAUKOWY. GRANTY

### Publikacje:

- 1) Zalewska B., Piątek R., **Bury K.**, Samet A., Nowicki B., Nowicki S., Kur J. A surface-exposed DraD protein of uropathogenic *Escherichia coli* bearing Dr fimbriae may be expressed and secreted independently from DraC usher and DraE adhesin. *Microbiol.* **2005**; 151: 2477-2486.
- 2) Piątek R., Zalewska B., **Bury K.**, Kur J. The chaperone-usher pathway of bacterial adhesin biogenesis -- from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta Biochim. Pol.* **2005**; 52: 639-646.
- 3) Jedrzejczak R., Dauter Z., Dauter M., Piątek R., Zalewska B., Mróz M., **Bury K.**, Nowicki B., Kur J. Structure of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli*: a dimer with swapped beta-tails. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**; 62: 157-164.
- 4) Zalewska B., Stangret J., **Bury K.**, Wojciechowski M., Kur J., Piątek R. DAF- and collagen-binding properties of chimeric Dr fimbriae. *Microbiol.* **2007**; 153: 2733-2742.
- 5) Zalewska B., **Bury K.**, Piątek R., Bruździak P., Kur J. Type II secretory pathway for surface secretion of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strain. *J. Bacteriol.* **2008** (Epub 28 Maj 2008).

### Doniesienia zjazdowe

- 1) **Bury K.**, Zalewska B, Piątek R, Mróz M, Holec L, Gąsior A, Kur J. Construction and analysis of DraE-AfaE-III hybrids – identification of amino acids responsible for different morphological structures. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 33. ISBN 83-922424-1-6.
- 2) **Bury K.**, Zalewska B, Piątek R, Kur J. DraD mutants for determination of the functional region. I Polski Kongres Genetyki. 2004.
- 3) Zalewska B, Piątek R, **Bury K.**, Mróz M, Holec L, Gąsior A, Kur J. Display of Pk epitope of Simian Virus 5 by chimeric Dr fimbriae – construction of a potential vaccine. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 26. SBN 83-922424-1-6.

- 4) Zalewska B, Piątek R, **Bury K**, Mróz M, Kur J. Molekularne aspekty zjadliwości uropatogennych szczepów *Escherichia coli* DR+. (I Konferencja Naukowa Komitetu Mikrobiologii PAN pt. W.J.H. Kunicki-Goldfinger mikrobiolog – filozof – mistrz, 22 X 2005). 2005: 80.
- 5) Zalewska B, Piątek R, **Bury K**, Kur J. Białko inwazyjny DraD – czynnik adhezyjny i inwazyjny uropatogennych szczepów *Escherichia coli* Dr<sup>+</sup>. Postępy mikrobiologii. 2004, tom 43, suplement 1: 120. XXV Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.
- 6) Zalewska B, Piątek R, **Bury K**, Kur J. Chimeric Dr-HSV fimbriae as a model of recombinant vaccine. International Review Conference, Biotechnology, Vienna. 2004. Udział w konferencji uwieńczony publikacją: The chaperone-usheer pathway of bacterial adhesin biogenesis - from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. Piątek R, Zalewska B, **Bury K**, Kur J (specjalny numer Acta Biochimica Polonica poświęcony polskiej biotechnologii).
- 7) Piątek R, Zalewska B, **Bury K**, Mróz M, Holec L, Gašior A, Kur J. Analysis of interaction between DraD invasin and DraE adhesin encoded by a *dra* gene cluster of uropathogenic *E. coli* Dr<sup>+</sup> strain. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 21. ISBN 83-922424-1-6.
- 8) Gašior A, Holec L, Piątek R, Zalewska B, **Bury K**, Mróz M, Kur J. Chimeric Dr fimbriae with a GRA1 *Toxoplasma gondii* epitope – construction of a potential vaccine. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk 14-15 X 2005). 2005: 13. ISBN 83-922424-1-6.
- 9) Mróz M, Piątek R, Zalewska B, **Bury K**, Holec L, Gašior A, Kur J. Fimbriae biogenesis – study of interaction between DraE adhesin, DraD invasin and usheer DraC. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 20. ISBN 83-922424-1-6.
- 10) Holec L, Gašior A, Zalewska B, Piątek R, **Bury K**, Mróz M, Kur J. Construction of expression systems and production of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (MIC3, GRA4, GRA9) for the serodiagnosis of toxoplasmosis. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 40. ISBN 83-922424-1-6.

### Wnioski grantowe

Projekt nr 2P05A 119 27 pt.: „Inwazyjna DraD uropatogennych szczepów *Escherichia coli* Dr<sup>+</sup> - badanie struktury, funkcji, mechanizmu transportu na powierzchnię komórki i roli w procesie polimeryzacji struktur fimbrialnych”. Grant własny (wykonany; 14.04.2006) – główny wykonawca.

Projekt nr 2P04A 039 27 pt.: „Molekularny mechanizm patogenności szczepów *Escherichia coli* Dr<sup>+</sup> - badanie inicjacji biogenezy fimbrii Dr i oddziaływań pomiędzy kluczowymi białkami kodowanymi przez operon *dra*”. Grant własny (wykonany; 24.11.2006) – wykonawca.

Projekt nr N401 156 32/3040 pt.: „Białko DraD jako powierzchniowo ekspresowany czynnik inwazyjny uropatogennych szczepów *Escherichia coli* Dr<sup>+</sup> - identyfikacja systemu sekrecji oraz determinacja minimalnego fragmentu białka niezbędnego w procesie inwazji.” Grant własny (w trakcie realizacji) – główny wykonawca.

## LITERATURA

- [1] Anderson K.L., Billington J., Pettigrew D., Cota E., Simpson P., Roversi P., Chen H.A., Urvil P., du Merle L., Barlow P.N., Medof M.E., Smith R.A., Nowicki B., Le Bouguéne C., Lea S.M., Matthews S. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. *Mol. Cell.* **2004**; 15: 647-657.
- [2] Anton M., Graham F.L. Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J. Virol.* **1995**; 69: 4600-4606.
- [3] Blattner F.R., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **1997**; 277: 1453-1474.
- [4] Carnoy Ch., Moseley S.L. Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins. *Mol. Microbiol.* **1997**; 23: 365-379.
- [5] Cianciotto N.P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiol.* **2005**; 13: 581-588.
- [6] Connolly A. & Thorp J.M. Urinary tract infections in pregnancy. *Urol. Clin. North. Am.* **1999**; 26: 779-787.
- [7] Dalbey R.E. & Von Heijne G. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes – a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* **1992**; 17: 474-478.
- [8] Dale E.C., Ow D.W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**; 88: 10558-10562.
- [9] Danese P.N. & Silhavy T.J. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **1998**; 32: 59-94.
- [10] Desvaux M., Parham N.J., Henderson I.R. The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.* **2004**; 155: 53-60.
- [11] Evans D.G., Evans D.J. & Pierce N.F. Differences in the Response of Rabbit Small Intestine to Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1973**; 7: 873-880.
- [12] Foxman B., Zhang L., Tallman P., Palin K., Rode C., Bloch C., Gillespie B., Marrs C.F. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J. Infect. Dis.* **1995**; 172: 1536-1541.

- [13] Gaillard J.L., Berche P., Frehel C., Gouin E., Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell*. **1991**; 65: 1127-1141.
- [14] Garcia M.I., Labigne A., La Bouguéneq Ch. Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking IS1 insertion sequences. *J. Bacteriol.* **1994**; 176: 7601-7613.
- [15] Garcia M.I., Gounon P., Courcoux P., Labigne A., Le Bouguéneq Ch. The afimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Mol. Microbiol.* **1996**; 19: 683-693.
- [16] Garcia M.I., Jouve M., Nataro I.P., Gounon P., La Bouguéneq Ch. Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. *FEBS*. **2000**; 479: 111-117.
- [17] Ghosh P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**; 64: 771-794.
- [18] Goluszko P., Moseley S. L., Truong L. D., Kaul A., Williford J. R., Selvarangan R., Nowicki S., Nowicki B. Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75 : K5 : H-bearing Dr fimbriae. *J. Clin. Invest.* **1997a**; 99: 1662–1672.
- [19] Goluszko P., Popov V., Selvarangan R., Nowicki S., Pham T., Nowicki B. Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion of the HeLa epithelial cell line. *J. Infect. Des.* **1997b**; 176: 158-167.
- [20] Goluszko P., Selvarangan R., Popov V., Pham T., Wen J.W., Singhal I. Decay-accelerating factor and cytoskeletal redistribution pattern in HeLa cells infected with recombinant *Escherichia coli* strains expressing Dr family of adhesins. *Infect. Immun.* **1999**; 67: 3989-3997.
- [21] Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Nataro J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **1998**; 6: 370-378.
- [22] Hiroyuki M. & Koreaki I. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* **2001**; 9: 494-500.
- [23] Invitrogen, Catalog 2000.
- [24] Isberg R.R., Nhieu G.T. The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol.* **1995**; 5: 120-124.



- [25] Jędrzejczak R., Dauter Z., Dauter M., Piątek R., Zalewska B., Mróz M., Bury K., Nowicki B., Kur J. Structure of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli*: a dimer with swapped beta-tails. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**; 62: 157-164.
- [26] Jones III J.P., Kierlin M.N., Coon R.G., Perutka J., Lambowitz A.M., Sullenger B.A. Retargeting mobile group II introns to repair mutant genes. *Mol. Ther.* **2005**; 11: 687-694.
- [27] Jouve M., Garcia M.I., Courcoux P., Labigne A., Gounon P. & Le Bouguenec C. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect. Immun.* **1997**; 65: 4082-4089.
- [28] Kostakioti M., Newman C.L., Thanassi D.G., Stathopoulos C. Mechanism of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* **2005**; 187: 4306-4314.
- [29] Książek A. & Rutkowski B. Nefrologia, wydanie I, Lublin 2004.
- [30] Liang S.T., Dennis P.P. & Bremer H. Expression of *lacZ* from the Promoter of the *Escherichia coli* *spc* operon cloned into vectors carrying the W205 *trp-lac* fusion. *J Bacteriol.* **1998**; 180: 6090–6100.
- [31] Liang S.T., Bipatnath M., Xu Y.C., Chen S.L., Dennis P., Ehrenberg M. & Bremer H. Activities of Constitutive Promoters in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **1999**; 292: 19-37.
- [32] Lory S. & Strom M.S. Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene.* **1997**; 192: 117-121.
- [33] Mistry D., Stockley R.A. IgA1 protease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**; 38: 1244-1248.
- [34] Mol O. & Oudega B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **1996**; 19: 25-52.
- [35] Mühldorfer J., Ziebuhr W., Hacker J. *Escherichia coli* and urinary tract infections. Academic Press, Germany 2001.
- [36] Normark S. Anfinsen comes out of the cage during assembly of the bacterial pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**; 97: 7670-7672.
- [37] Novagen, Catalog **2002**.

- [38] Nowicki B.J., Holthöfer H., Saraneva T., Rhen M., Väisänen-Rhen V., Korhonen T.K. Location of adhesion sites for P-fimbriated and for O75X-positive *Escherichia coli* in the human kidney. *Microb. Pathog.* **1986**; 1: 169–180.
- [39] Nowicki B., Svanborg-Eden C., Hull R., Hull S. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1989**; 57: 446-451.
- [40] Nowicki B., Selvarangan R., Nowicki S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J. Infect. Dis.* **2001**; 183: 24-27.
- [41] Orłowski T. Choroby nerek. PZWL, 1998.
- [42] Perutka J., Wang W., Goerlitz D., Lambowitz A.M. Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. *J. Mol. Biol.* **2004**; 336: 421-439.
- [43] Pham T., Goluszko P., Popov V., Nowicki S., Nowicki B.J. Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decay-accelerating factor. *Infect. Immun.* **1997**; 65: 4309-4318.
- [44] Piątek R., Zalewska B., Kolaj O., Ferens M., Nowicki B., Kur J. Molecular aspects of biogenesis of *Escherichia coli* Dr fimbriae: characterization of DraB-DraE complexes. *Infect. Immun.* **2005**; 73: 135-145.
- [45] Plançon L., Du Merle L., Le Friec S., Gounon P., Jouve M., Guignot J., Servin A., Le Bouguéne C. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell. Microbiol.* **2003**; 5: 681-693.
- [46] Pugsley A.P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **1993**; 57: 50-108.
- [47] Russel M. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* **1998**; 279:485-499.
- [48] Sambrook J., Manniatis T., Fritsch E.F. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Manniatis T and Sambrook Editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press Edit Second Edition. New York: **1989**.
- [49] Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **2001**; 40: 271-283.
- [50] Sankaran K. & Wu H.C. Bacterial prolipoprotein signal peptidase. *Methods Enzymol.* **1995**; 248: 169-80.

- [51] Sauer F.G., Knight S.D., Waksman G.J., Hultgren S.J. PapD-like chaperones and pilus biogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2000**; 11: 27-34.
- [52] Saulino E.T., Bullitt E., Hultgren S.J. Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**; 97: 9240-9245.
- [53] Sharff A, Fanutti C, Shi J, Calladine C, Luisi B. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur. J. Biochem.* **2001**; 268: 5011-5026.
- [54] Sobel J.D. Pathogenesis of urinary tract infection. Role of host defenses. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **1997**; 11: 531-549.
- [55] Stryer L. Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa **1997**.
- [56] Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **1990**; 185: 60-89.
- [57] Svanborg C. & Godaly G. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **1997**; 11: 513-529.
- [58] Tampakaki A.P., Fadouloglou V.E., Gazi A.D., Panopoulos N.J., Kokkinidis M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* **2004**; 6: 805-816.
- [59] Thanassi D.G., Saulino E.T, Hultgren S.J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**; 1: 223-231.
- [60] Thanassi D.G., Hultgren S.J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**; 12: 420-430.
- [61] Tauschek M., Gorrell R.J., Strugnell R.A., Robins-Browne R. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Microbiol.* **2002**; 99: 7066-7071.
- [62] Van Loy C.P., Sokurenko E.V., Samudrala R., Moseley S.L. Identification of amino acids in the Dr adhesin required for binding to decay-accelerating factor. *Mol. Microbiol.* **2002**; 45: 439-452.
- [63] Vooijs M., Jonkers J., Berns A. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that *LoxP* recombination is position dependent. *EMBO Rep.* **2001**; 2: 292-297.
- [64] Zalewska B., Piątek R., Bury K., Samet A., Nowicki B., Nowicki S., Kur J., A surface-exposed DraD protein of uropathogenic *Escherichia coli* bearing Dr

fimbriae may be expressed and secreted independently from DraC usher and DraE adhesin. *Microbiol.* **2005**; 151: 2477-2486.

- [65] Zalewska-Piątek B., Bury K., Piątek R., Bruździak P., Kur J. Type II secretory pathway for surface secretion of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strain. *J. Bacteriol.* **2008** (Epub 23 Maj 2008).