



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Justyna Pilipczuk
Dyscyplina naukowa: Nauki chemiczne - biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Molekularne aspekty biogenezy fimbrii Dr uropatogennych szczepów *Escherichia coli* – reakcje komplementacji i wymiany nici donorowych w kontekście przynależności do rodziny FGL struktur adhezyjnych

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Molecular aspects of biogenesis of uropathogenic *Escherichia coli* Dr fimbriae – donor strand complementation and exchange reactions in the context of belonging to the FGL family of adhesive structures

Promotor prof. <i>podpis</i>
prof. dr hab. Józef Kur
Promotor pomocniczy <i>Podpis</i>
dr inż. Rafał Piątek

Gdańsk, rok 2015

Tadeuszowi, Rodzicom i Siostrze

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, panu profesorowi Józefowi Kur za życzliwą atmosferę i cenne porady.

Panu Rafałowi Piątek za opiekę podczas całego Studium Doktoranckiego i pomoc merytoryczną w redagowaniu niniejszej pracy oraz jej wnikliwą korektę.

Pani Beacie Zalewskiej-Piątek za liczne wskazówki i wsparcie.

Rodzicom i Siostrze za ciągłe motywowanie do pracy.

Tadeuszowi za nieustającą wiarę we mnie i pogodę ducha.

Spis treści

1	STRESZCZENIE	6
2	CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	8
2.1	STRUKTURY ADHEZYJNE BAKTERII - FUNKCJA I ZRÓŻNICOWANIE	8
2.1.1	Czynniki wirulencji uropatogennych szczepów <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.1.1	Powierzchniowe czynniki wirulencji	16
2.1.1.2	Wydzielane czynniki wirulencji.....	19
2.2	DROGI BIOGENEZY STRUKTUR ADHEZYJNYCH BAKTERII GRAM- UJEMNYCH.....	20
2.2.1	Mechanizm ogólnej sekrecji (ang. <i>general secretion pathway</i>) – pile typu IV	22
2.2.2	Mechanizm sekrecji typu III (T3SS, ang. <i>type III secretion system</i>).....	23
2.2.3	Mechanizm sekrecji typu IV (ang. <i>type IV secretion system</i>).....	24
2.2.4	Mechanizm pozakomórkowej precypitacji zarodkowej (ang. <i>nucleation precipitation pathway</i>) – agregujące fimbrie.....	24
2.3	KLASYCZNY MECHANIZM CHAPERONE-USHER.....	27
2.3.1	Morfologia struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher	27
2.3.2	Biogeneza struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher.....	29
2.3.3	Białka podjednostkowe budujące struktury systemu chaperone-usher.....	32
2.3.4	Struktura i funkcja białek opiekuńczych systemu chaperone-usher	34
2.3.5	Białka opiekuńcze FGA	42
2.3.6	Białka usher – struktura i działanie, reakcja DSE.....	45
2.3.7	Energetyka reakcji DSC i DSE	48
2.3.8	Mostek disiarczkowy podjednostek	52
2.4	ADHEZYJNY RODZINY DR	53
2.4.1	Fimbrie Afa/Dr.....	55
2.4.2	Fimbrie F1845.....	62
2.4.3	Agregacyjne fimbrie AAF	64
2.5	KLASYFIKACJA FILOGENETYCZNA ELEMENTÓW SZLAKU CHAPERONE- USHER	69
2.6	PILICYDY.....	74
3	CEL PRACY.....	79
4	MATERIAŁY	80
4.1	Szczepy bakteryjne.....	80
4.2	Linie komórkowe	80
4.3	Materiał genetyczny	80
4.4	Podłoża	82
4.5	Antybiotyki.....	83
4.6	Odczynniki i roztwory podstawowe.....	83
4.7	Elektroforeza agarozowa.....	84

4.8	Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	84
4.9	Odczynniki do przygotowania komórek kompetentnych <i>E. coli</i> i transformacji.....	85
4.10	Materiały i odczynniki do izolacji czystego plazmidowego DNA	85
4.11	Odczynniki i materiały do mutagenyzy miejscowo specyficznej	86
4.12	Odczynniki i materiały do techniki Western Blotting.....	86
4.13	Odczynniki do wykrywania mostków disiarczkowych.....	87
4.14	Odczynniki do izolacji frakcji fimbrialnej	87
4.15	Odczynniki do izolacji białek z frakcji periplazmatycznej	87
4.16	Odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej (immunodetekcji fimbrii Dr)	87
4.17	Odczynniki do hodowli linii komórkowych.....	88
4.18	Odczynniki i materiały stosowane w barwieniu metodą Giemsy	88
4.19	Odczynniki i materiały do testu adherencji do linii komórkowej CHO.....	88
4.20	Odczynniki i materiały do testu hemaglutynacji.....	88
4.21	Odczynniki i materiały do testu wiązania kolagenu.....	89
4.22	Odczynniki i materiały do analizy densytometrycznej	89
4.23	Odczynniki i bufony do chromatograficznego oczyszczania białek na kolumnie niklowej	89
4.24	Bufory i materiały do dializy preparatów białkowych.....	90
4.25	Odczynniki i materiały do chromatografii rozmiarów wykluczających	90
4.26	Aparatura.....	90
5	METODY	92
5.1	Hodowle bakteryjne	92
5.2	Hodowla i pasażowanie linii komórkowych CHO.....	92
5.3	Izolacja plazmidowego DNA	92
5.4	Przygotowanie komórek kompetentnych i ich transformacja DNA plazmidowym	93
5.5	Ekspresja genów w szczepie bakteryjnym <i>E. coli</i> BL21(DE3)	93
5.6	Izolacja frakcji fimbrialnej.....	93
5.7	Izolacja frakcji periplazmatycznej	94
5.8	Oczyszczanie białek metodą chromatografii metalopowinowactwa	95
5.9	Dializa preparatów białkowych.....	96
5.10	Chromatografia rozmiarów wykluczających	96
5.11	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	96
5.12	Test retardacji białek w żelu SDS-PAGE	97
5.13	Detekcja mostków disiarczkowych.....	97
5.14	Analiza Western Blot	97
5.15	Mikroskopia immunofluorescencyjna.....	98
5.16	Kalorymetria.....	99
5.17	Synteza pilicydów	101
5.18	Test adherencji szczepów <i>E. coli</i> DR+ do komórek linii CHO	101
5.19	Test hemaglutynacji	102
5.20	Test wiązania kolagenu	103

5.21	Analiza densytometryczna frakcji fimbrialnych rozdzielonych za pomocą SDS-PAGE	103
6	OPIS WYNIKÓW I DYSKUSJA	105
6.1	Fimbrie DR jako typowy przedstawiciel grupy FGL	106
6.2	Wpływ zakonserwowanego mostka disiarczowego białek podjednostkowych na reakcję komplementacji nici donorowych	108
6.3	Analiza stopnia oligomeryzacji białka DraE-ΔSS w obrębie periplazmy	111
6.4	Wpływ braku mostka disiarczowego w białku DraE na proces włączania podjednostek w fimbrię	113
6.5	Określenie potencjalnej roli mostka disiarczowego białek podjednostek adhezyjnych z rodziny Dr w procesie fałdowania	117
6.5.1	Analiza struktur podjednostek układów adhezyjnych rodziny Dr dla białek produkowanych w cytoplazmie i periplazmie	117
6.5.1.1	Założenia analizy	117
6.5.1.2	Analiza porównawcza dróg fałdowania białek rodziny Dr o różnej konstrukcji	118
6.5.1.3	Wnioski z analizy strukturalnej adhezyn z rodziny Dr	120
6.5.1.4	Białko N-Nte-DraE-C-Nte tworzy w periplazmie stabilne monomery	123
6.5.1.5	Szczelina akceptorowa białka N-Nte-DraE-C-Nte jest stabilizowana przez C-terminalną nić donorową	124
6.6	Mechanizm oddziaływania pilicydów na biogenezę fimbrii Dr	128
6.6.1	Wpływ pilicydów na biogenezę fimbrii Dr	129
6.6.2	Wpływ pilicydów na zależną od fimbrii Dr adhezję komórek bakteryjnych	132
6.6.3	Test ELISA – ocena zdolności produkcji fimbrii Dr w obecności pilicydów	135
6.6.4	Ocena ilości produkowanych w obecności pilicydów fimbrii Dr – analiza densytometryczna frakcji fimbrialnych	136
6.6.5	Określenie potencjalnego spektrum działania pilicydów względem układów adhezyjnych typu FGL i FGS	140
7	PODSUMOWANIE	141
8	BIBLIOGRAFIA	143
9	OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	153
10	DORÓBEK NAUKOWY	155

1 STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy doktorskiej była próba określenia, w jakim stopniu podział struktur adhezyjnych typu chaperone-usher bakterii Gram-ujemnych na rodziny FGS i FGL, który bazuje na aspekcie strukturalnym, przekłada się na różnice w mechanizmie biogenezy tych struktur. Badania koncentrowały się na kluczowych dla biogenezy tych struktur etapach – reakcjach komplementacji i wymiany nici donorowych i opierały się na porównaniu

dostępnych w literaturze danych dotyczących przedstawicieli grupy FGS – pili typu 1 i P – z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi dla modelowego przykładu struktur FGL – fimbrii Dr. Analiza oddziaływań pomiędzy białkiem opiekuńczym zaangażowanym w budowę struktur adhezyjnych a podjednostką budulcową, mających miejsce podczas reakcji komplementacji nici donorowych, skupiła się na zweryfikowaniu w przypadku fimbrii Dr występowania potwierzonego literaturowo dla pili typu 1 i P systemu kontroli jakości polegającego na wprowadzaniu w obręb dojrzewającej fimbrii jedynie tych podjednostek budulcowych, które wyposażone są w mostek disiarczkowy. W tym celu skonstruowano szczepy produkujące białko podjednostkowe DraE z mutacjami Cys→Ala i porównano poziom obecności oligomerycznych form białka w obrębie periplazmy oraz efektywność produkcji fimbrii Dr na powierzchni komórki w stosunku do szczepu kontrolnego. Uzyskane wyniki świadczą jednoznacznie, że pozbawione mostka disiarczkowego białko DraE nie stanowi substratu dla białka opiekuńczego, wobec czego nie wchodzi w skład funkcjonalnej struktury fimbrialnej Dr.

Badania drugiego kluczowego etapu biogenezy, reakcji wymiany nici donorowych, a więc reakcji zachodzącej pomiędzy kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka a białkiem kanałotwórczym, obejmowały sprawdzenie działania specyficznych inhibitorów tej reakcji skutecznych dla struktur typu FGS – pilicydów – na biogenezę fimbrii Dr. W tym celu przeanalizowano skuteczność hamowania produkcji fimbrii Dr dla wybranych pilicydów pierwszej generacji. Porównano poziom adherencji wzrastających w obecności pilicydów bakterii produkujących fimbrie do komórek CHO-DAF+ w stosunku do bakterii niesuplementowanych, a także ich zdolność do aglutynacji ludzkich erytrocytów. Wykonano również ocenę ilościową powstających na powierzchni komórek bakteryjnych fimbrii w przypadku obecności w pożywce wspomnianych związków. Wykazano jednoznacznie, że pilicydy wyraźnie hamują wzrost fimbrii Dr, co sugeruje potencjalnie szerokie spektrum działania tych związków, niezależne od różnic strukturalnych obserwowanych dla różnych białek opiekuńczych biorących udział w biogenezie struktur adhezyjnych typu chaperone-usher bakterii Gram-ujemnych.

2 CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1 Struktury adhezyjne bakterii - funkcja i zróżnicowanie

Niezwykłe zróżnicowanie powierzchniowych struktur adhezyjnych bakterii koreluje z ich zdolnością do zasiedlania środowisk o dużej różnorodności, wliczając w to ciało człowieka. Bakterie chorobotwórcze w toku ewolucji wykształciły wyspecjalizowane taktyki umożliwiające im pokonanie naturalnych barier i mechanizmów obronnych organizmu ludzkiego. Proces kolonizacji komórek gospodarza jest utrudniony przez występowanie przeciwnie naładowanych ładunków powierzchniowych pomiędzy komórkami bakterii i gospodarza (Donnenberg, 2002). Również inne czynniki i procesy zachodzące w organizmie, np. wywierany na obecne w układzie moczowym bakterie stres ścinający towarzyszący mikcji, perystaltyka układu pokarmowego, czy ciśnienie krwi w obrębie układu krwionośnego - wymusza na bakteriach wytworzenie skutecznych strategii umożliwiających opanowanie wybranych nisz środowiskowych. Dlatego też większość bakterii Gram-ujemnych i niektóre Gram-dodatnie wyposażona jest w specyficzne systemy sekrecji służące do tworzenia na swojej powierzchni struktur, umożliwiających adhezję do receptorów komórkowych gospodarza. Szczególnie fascynującym przykładem ewolucyjnego przystosowania jest *Escherichia coli*, która przez produkcję różnych kombinacji tych struktur zdolna jest do wywoływania różnych jednostek chorobowych: enteropatogenne *E. coli* (EPEC, ang. *enteropathogenic Escherichia coli*) niszcząc powłokę ochronną mikroosmków prowadzą do biegunki, enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC, ang. *enterohaemorrhagic Escherichia coli*) wywołują krwotoczne zapalenie jelita grubego, szczepy enterotoksyczne (ETEC, ang. *enterotoxic Escherichia coli*) są przyczyną krwawych biegunek o możliwych poważnych powikłaniach (zespół hemolityczno-mocznicowy), szczepy enteroinwazyjne (EIEC, ang. *enteroinvasive Escherichia coli*) namnażając się w jelitach powodują ich owrzodzenia, enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC, ang. *enteroaggregative Escherichia coli*) są przyczyną przewlekłych biegunek, dyfuzyjoadhezyjne szczepy (DAEC, ang. *diffusely adhesive Escherichia coli*) przyczyniają się do występowania dziecięcych ostrych stanów biegunkowych, szczepy uropoagenne (UPEC, ang. *uropathogenic Escherichia coli*) wywołują infekcje górnych i dolnych dróg moczowych (Pizarro-Cerda, Cossart, 2006).

Przytwierdzenie bakterii do komórek gospodarza umożliwiają białka adhezyjne, które odpowiedzialne są za rozpoznawanie i wiązanie się do specyficznych receptorów gospodarza. Proces ten wyzwala odpowiedź zwrotną umożliwiającą bakteriom ominięcie obrony immunologicznej i rozpoczęcie kolonizacji (Zav'yalov *et al.*, 2010). Adhezyny bakterii Gram-ujemnych mogą występować w dwóch podstawowych formach morfologicznych. Część powierzchniowych struktur adhezyjnych obserwowana jest w obrazie mikroskopowym jakodługie, homo- lub heteropolimeryczne wypustki zwane piliami lub fimbriami zakotwiczone w błonie zewnętrznej bakterii. W tym przypadku białkowe podjednostki o funkcji adhezyny znajdują się na końcu fimbrii lub w wielokrotnych powtórzeniach wzdłuż jej osi. Niektóre struktury adhezyjne obecne są w formie morfologicznej przypominającej bezpostaciową otoczkę komórki (adhezyny niefimbrialne). Struktury fimbrialne bakterii Gram-ujemnych formowane są w większości przypadków przez liniową asocjację podjednostek budulcowych. Aby spełniać swoją funkcję, białka struktur adhezyjnych muszą zostać przetransportowane na powierzchnię komórki bakteryjnej. U bakterii Gram-ujemnych transport ten zachodzi według jednego z pięciu głównych systemów: mechanizmu „chaperone-usher” (CU, ang. *chaperone-usher pathway*), mechanizmu ogólnej sekrecji (GSP, ang. *general secretion pathway*), mechanizmu pozakomórkowej precypitacji zarodkowej, mechanizmu sekrecji typu III (T3SS, ang. *type III secretion system*), bądź sekrecji typu IV (T4SS, ang. *type IV secretion system*) (Fronzes *et al.*, 2008). Przegląd poznanych struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych wraz z odpowiadającym im systemem biogenezy zestawiony został w tabeli 1.

System biogrzezy	Struktura adhezyjna	Białka zaangażowane w biogrzezę	Mikroorganizm	Jednostka chorobowa związana z występowaniem struktury
Klasyczny chaperone-usher	Agregujące fimbrie adherentne typu II, AAF/II	AafD/AafC	<i>E. coli</i>	Biegunka
	BD	ACIAD0120/A CIAD0121	<i>Acinetobacter sp. szczepADP1</i>	BD
	Cienka pilia o zewnętrznej średnicy 2-3 nm	AcuD/AcuC	<i>Acinetobacter sp. szczep BD413</i>	BD
	Adhezyna afimbrialna AFA-III	Afa-3B/Afa-3C	<i>E. coli</i>	Biegunka, zapalenie pęcherza moczowego
	Adhezyna afimbrialna AFA-VIII	Afa-8B/Afa-8C	<i>E. coli</i>	Biegunka, posocznica
	Pile AF/R 1	AfrC/AfrB	<i>E. coli</i>	Biegunka u królików
	Agregujące fimbrie adherentne typu I, AAF-I	AggD/AggC	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Agregujące fimbrie adherentne typu III, AAF-III	Agg-3D/Agg-3C	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Fimbrie "ambient-temperature"	AtfB/AtfC	<i>P. mirabilis</i>	Infekcje układu moczowego
	Antygen otoczkowy F1	Caf1M/Caf1A	<i>Y. pestis</i>	Dżuma
	Czynnik kolonizujący 3, fimbrie CS-3	CS3-E/CS3-D	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Czynnik kolonizujący, CS6	CssC/CssD	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Fimbrie CS12	CswB/CswC	<i>E. coli</i>	Biegunka
Otoczkopodobny	ClpE/ClpD	<i>E. coli</i>	Biegunka	

antygen CS31A			
Fimbrialna adhezyna F1845 (DaaE)	DaaB/DaaC	<i>E. coli</i>	Biegunka
Fibrylarna adhezyna rozproszonej adhezji	DafaB/DafaC	<i>E. coli</i>	Biegunka
Elastyczne fimbrie hemaglutyniny Dr	DraB/DraC	<i>E. coli</i>	Odmiedniczkowe zapalenie nerek
Pile F17	F17D/F17C	<i>E. coli</i>	Biegunka
Fimbrie 987P	FasB/FasD	<i>E. coli</i>	Biegunka u prosiąt
Pile K99	FaeE/FaeD	<i>E. coli</i>	Biegunka u cieląt, jagniąt i prosiąt
Pile K88	FanE/FanD	<i>E. coli</i>	Biegunka u prosiąt
Pile typu 2 i 3	FimB/FimC	<i>B. pertussis</i>	Krztusiec
Pile typu 1	FimC/FimD	<i>E. coli</i>	Zapalenie pęcherza moczowego
Pile F1C	FocC/FocD	<i>E. coli</i>	Zapalenie pęcherza moczowego
Fimbrie CS18	FotB/FotD	<i>E. coli</i>	Biegunka
Fimbrie <i>H. influenzae</i> biogrupa aegyptius	HafB/HafE	<i>H. influenza</i>	Zapalenie opon mózgowych, gorączka plamicowa brazylijska
Fimbrie <i>H. influenzae</i>	HifB/HifC	<i>H. influenza</i> typ b	Zapalenie ucha środkowego
Adhezyna afimbrialna	LdaE	<i>E. coli</i>	Biegunka
Długie, polarne fimbrie	LpfB/LpfC	<i>S. typhimurium</i>	Nieżyt żołądka i jelit
Fimbrie mannozo-oporne	MrfD/MrfC	<i>P. temperata</i>	Patogen owadzi
Fimbrie typu 3	MrkB	<i>K. pneumoniae</i>	Zapalenie płuc
Pile mannozo-oporne/ pile <i>Proteus</i> -podobne MR/P	MrpD/MrpC	<i>P. mirabilis</i>	Szpitalne infekcje układu moczowego
Czynnik śluzujący <i>Yersinia</i> , fimbrie Myf	MyfB/MyfC	<i>Y. enterocolitica</i>	Zapalenie jelit
Adhezyna niefimbrialna, NFA-I	NfaE/NfaC	<i>E. coli</i>	Infekcje układu moczowego
Pile P	PapD/PapC	<i>E. coli</i>	Odmiedniczkowe zapalenie nerek lub zapalenie

				pęcherza
	Pile Pef	PefD/PefC	<i>S. typhimurium</i>	Nieżyt żołądka i jelit
	Pile PMF	PmfC/PmfD	<i>P. mirabilit</i>	Szpitalne infekcje układu moczowgo
	Fimbrialny antygen pH6	PsaB/PsaC	<i>Y. pestis, Y. pseudotuberculosis</i>	Dżuma, nieżyt żołądka i jelit
	Domniemana adhezyna	PSPPH_A0063 /PSPPH_A0064	<i>P. syringa</i>	Zaraza rdzy fasoli
	Fimbrie REPEC	RalE/RalD	<i>E. coli</i>	Biegunka u królików
	Nietypowe fimbrie Saf	SafB/SafC	<i>S. typhimurium</i>	Nieżyt żołądka i jelit
	Nietypowe domniemane fimbrie	SafB/SafC	<i>S. typhi</i>	Dur brzuszny
	Nietypowe domniemane fimbrie	SafB/SafC	<i>S. choleraesuis</i>	Posocznica, ostre pozajelitowe infekcje
	Nietypowe domniemane fimbrie	SafB/SafC	<i>S. paratyphi A</i>	Dur brzuszny
	Fimbrio-podobne włókniste struktury SEF14/18	SefB/SefC	<i>S. enteritidis</i>	Nieżyt żołądka i jelit
	Domniemane fimbrie	SefB/SefC	<i>S. typhi</i>	Dur brzuszny
	Domniemane fimbrie	SefB/SefC	<i>S. paratyphi A</i>	Dur brzuszny
	Pile S	SfaE/SfaF	<i>E. coli</i>	Infekcje układu moczowego
	Fimbrie Sfp	SfpD/SfpC	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Fimbrie Stf	StfD/StfC	<i>S. typhimurium</i>	Śmiertelne zakażenie w chowie wsobnym myszy
Alternatywny chaperone-usher	Pile CS1	CooB/CooC	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile CS2	CotB/CotC	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile CS4	BD	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile CS14	BD	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile CS17	BD	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile CS19	BD	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile CFA/I	CfaA/CfaC	<i>E. coli</i>	Biegunka
	Pile typu II	CblB/CblC	<i>B. cepacia</i>	Infekcje oportunistyczne u pacjentów z

				mukowiscydozą
Pozakomórkowa precypitacja zarodkowa	Fimbrie agregujące	CsgG/CsgE/CsgF	<i>E. coli</i> <i>S. enteritidis</i>	Sepsa
Ogólna sekrecja GSP	Pile typu IV	Aparatura ogólnej sekrecji	<i>Neisseria</i> sp.	Rzeżączka
			<i>P. aeruginosa</i> <i>V. cholerae</i> <i>M. bovis</i> <i>D. nodosus</i> <i>E. corrodens</i>	Cholera
	Pile tworzące wiązki		<i>E. coli</i>	Biegunka
Sekrecja typu III	Struktura igłowa	System sekrecji Sec	<i>Salmonella typhimurium</i>	BD
Sekrecja typu IV	Pile Trw		<i>Bartonella</i>	Bakteriemia

Tabela 1. Bakteryjne struktury adhezyjne. W przypadku białek zaangażowanych w biogenezę struktur adhezyjnych powstających według mechanizmu chaperone-usheer w pierwszej kolejności wymieniono periplazmatyczne białko opiekuńcze, a po ukośniku – białko usheer. BD – brak danych (Soto i Hultgren, 1999, Zav’yalov *et al.*, 2010).

2.1.1 Czynniki wirulencji uropatogennych szczepów *Escherichia coli*

Zakażenia dróg moczowych (UTI, ang. *urinary tract infections*) należą do najczęstszych infekcji występujących w krajach rozwiniętych. Zdecydowana większość – ponad 80% - pozaszpitalnych infekcji dróg moczowych spowodowana jest przez *Escherichia coli*, natomiast inne gatunki odgrywają ważną rolę w szpitalnych zakażeniach układu moczowego. Wszystkie uropatogenne bakterie wyposażone są w liczne czynniki zjadliwości, najlepiej jak dotąd scharakteryzowane dla UPEC. W wyniku kolonizacji w normalnych warunkach sterylnego układu moczowego zostaje uruchomiona wrodzona odpowiedź immunologiczna gospodarza w postaci m.in. produkcji cytokin zapalnych i chemokin. Odpowiedź zapalna prowadzi do złuszczenia zakażonych komórek nabłonka pęcherza moczowego. Dlatego też czynniki zjadliwości muszą umożliwiać kolonizację i jednocześnie stanowić bakteryjną obronę przed wysoce skuteczną barierą immunologiczną gospodarza. Wywoływanie objawowych infekcji dróg moczowych przez bakterie *E. coli* związane jest bezpośrednio z ich zdolnością do produkcji szerokiego spektrum czynników wirulencji, z których bezdyskusyjnie adhezyny stanowią najbardziej kluczowe determinanty zjadliwości (Bien *et al.*, 2012). Ekspresja tych czynników warunkowana jest przez geny zlokalizowane na mobilnych elementach DNA zwanych wyspami patogenności (Wiles *et al.*, 2008). Czynniki związane z wywoływaniem UTI podzielić można na dwie grupy: elementy związane z powierzchnią komórki bakteryjnej oraz elementy wydzielane z komórki i eksportowane do miejsca docelowego. Tabele 2 i 3 przedstawiają podsumowanie elementów ekspresowanych przez szczepy *E. coli* związanych z wywoływaniem infekcji w obrębie układu moczowego.

Czynnik	Operon	Receptor	Funkcja
Pile typu 1	<i>fim</i>	Resyztz mannozy uroplakiny Ia i IIIa (UPIIIa)	Adhezja do nabłonka błony śluzowej pęcherza moczowego, formowanie biofilmu
Fimbie P	<i>pap</i>	Glikosfingolipidy z determinantą Gal α	Adhezja do nabłonka błony śluzowej nerek, indukcja cytokin
Fimbrie S	<i>sfa</i>	Reszty cukrowe kwasu sialowego	Adhezja do nabłonka i śródbłonka błony śluzowej nerek

Fimbrie F1C	<i>foc</i>	Reszty β -GalNac-1, 4b-Gal glikolipidów	Adhezja do komórek nabłonka kanalików dystalnych i kanałów zbiorczych nerek oraz komórek śródbłonka pęcherza i nerek
Fimbrie Dr	<i>dra</i>	Czynnik przyspieszający rozpad konwertaz układu dopełniacza (DAF), kolagen typu IV, antygeny karcynoembrionalne CEACAM	Adhezja do nabłonka i śródbłonka błony śluzowej nerek
Adhezyny Afa-III	<i>afa-III</i>	Czynnik przyspieszający rozpad konwertaz układu dopełniacza (DAF)	Adhezja do nabłonka pęcherza moczowego
Otoczka	<i>kps</i> (w przypadku otoczki K1)	BD	Działanie antyfagocytarne i przeciw układowi dopełniacza
Lipopolisacharyd	<i>rfa, rfb</i>	Kompleks receptora LPS (CD14/TLR/MD2)	Działanie endotoksyczne, antygen somatyczny, indukcja cytokin

Tabela 2. Powierzchniowe czynniki wirulencji uropatogennych szczepów *Escherichia coli*. BD – brak danych (Emody *et al.*, 2002, Bien *et al.*, 2012).

Czynnik	Receptor	Funkcja
α -hemolizyna	β_2 -integryna w leukocytach lub glikoforyna w erytrocytach	Cytotoksyczność, hemoliza
Cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1	Białko prekursora receptora lamininy (LRP)	Stymulacja apoptozy komórek nabłonka
Siderofory	Receptor żelaza aerobaktyny, enterobaktyny itd.	Wzrost w warunkach niedoboru żelaza

Tabela 3. Wydzielane czynniki wirulencji uropatogennych szczepów *Escherchia coli* (Emody *et al.*, 2002, Bien *et al.*, 2012).

2.1.1.1 Powierzchniowe czynniki wirulencji

Ekspresja powierzchniowych adhezyn jest najważniejszą determinantą patogenności uropatogennych szczepów *E. coli*. Przyczyniają się one do zwiększenia zjadliwości poprzez inicjację pierwotnego kontaktu komórki bakteryjnej z komórką gospodarza, bezpośrednie wspieranie inwazji bakterii oraz ułatwianie dostarczenia bakteryjnych toksyn do komórek docelowych.

Do najważniejszych czynników należą pile typu 1, które wiążą się poprzez szczytową adhezynę FimH do mannoooligosacharydów obecnych na powierzchni cząsteczek glikoprotein związanych z powierzchnią komórek nabłonka dróg moczowych. Udowodniono, że pod wpływem wzmożonej mikcji są one zdolne do rozciągnięcia się, co ułatwia bakteriom stawianie oporu silnemu przepływowi płynów (Rengel *et al.*, 2014). Występują one zarówno u szczepów patogennych jak i komensalnych. W badaniach na modelu mysim, obecność pili typu 1 stymuluje stan zapalny błony śluzowej dróg moczowych, a także umożliwia wzrost bakterii w postaci biofilmu (Bien *et al.*, 2012).

Drugim powszechnym czynnikiem wirulencji UPEC są pile P, odpowiedzialne szczególnie za wstępujące infekcje dróg moczowych oraz odmiedniczkowe zapalenie nerek. Rozpoznają one, poprzez adhezynę PapG, antygen P grupy krwi, obecny na powierzchni komórek nabłonka układu moczowego. Kontakt pomiędzy patogenem a błoną śluzową prowadzi do produkcji interleukin i w konsekwencji do rozwoju stanu zapalnego (Emody *et al.*, 2002). Pile P wykazują synergistyczne współdziałanie z piliami typu 1. W toku infekcji za

wczesną kolonizację nabłonka kanalików nerkowych odpowiedzialne są pile P, natomiast w późniejszym etapie ważną rolę odgrywają pile typu 1. Taka współpraca prowadzi do wytworzenia międzybakteryjnych wiązań i powstania heterogenicznego biofilmu zaburzającego filtrację i ostatecznie skutkuje niedrożnością nefronów i rozwojem odmiedniczkowego zapalenia nerek (Melican *et al.*, 2011). Pile P są szczególnie częstym czynnikiem wirulencji u pacjentów po przeszczepie nerki, a także u pacjentów z ostrymi zaburzeniami czynności nerek (Bien *et al.*, 2012).

Fimbrie S oraz F1C również powiązane są z UTI. Szczytowa adhezyna SfaS fimbrii S pośredniczy w interakcjach z resztami kwasu sialowego receptorów obecnych na komórkach tkanki nabłonkowej nerek oraz komórkach nerkowego śródbłonka naczyńniowego. Także główna podjednostka budująca fimbrie S – SfaA – ma właściwości adhezyjne i może wiązać się do glikolipidów komórek nabłonkowych oraz plazminogenu (Mulvey, 2002). Fimbrie S ułatwiają rozprzestrzenianie się bakterii w obrębie tkanek gospodarza i powiązane są ze szczepami odpowiedzialnymi za posocznicę, zapalenie opon mózgowych oraz wstępujące zakażenia dróg moczowych, w tym odmiedniczkowe zapalenie nerek (Bien *et al.*, 2012). Fimbrie F1C, genetycznie homologiczne do fimbrii S, rozpoznają reszty β -GalNac-1, 4b-Gal znajdujące się w strukturze glikolipidów komórek nabłonka kanalików dystalnych i kanałów zbiorczych nerek oraz komórek śródbłonka pęcherza i nerek (Mulvey, 2002). Fimbrie F1C występują u ok. 14% izolatów UPEC.

Ważną grupą powierzchniowych czynników wirulencji powiązanych z występowaniem m.in. odmiedniczkowego zapalenia nerek oraz nawracającego zapalenia pęcherza moczowego jest rodzina adhezyn Afa/Dr. Najlepiej poznanym receptorem wspólnym dla całej rodziny jest czynnik przyspieszający rozpad konwertaz układu dopełniacza (DAF, ang. *decay-accelerating factor*) występujący na powierzchni erytrocytów oraz komórek innych tkanek (np. nabłonka dróg moczowych). Oddziaływanie z tym receptorem w przypadku kodowanej przez operon *dra* adhezyny Dr (hemaglutyniny Dr) jest blokowane przez działanie chloramfenikolu. Adhezyna Dr posiada również inne unikalne w obrębie rodziny adhezyn Afa/Dr receptory. Jednym z nich jest domena 7s kolagenu typu IV, białka obecnego w błonie podstawnej. Rozpoznawanie kolagenu jest istotnym czynnikiem sprzyjającym infekcjom układu moczowego, gdyż wiązanie do tego receptora w obrębie nerek prowadzi do powstania trwałych osadów mezangialnych, a w konsekwencji do rozwoju przetrwałego

zakażenia nerek (Servin, 2005). Kolejnym poznany receptorem dla adhezyny Dr są karcynoembrionalne antygeny CEACAM, będące receptorami sygnałowymi, umożliwiającymi przyleganie do siebie komórek nabłonka i uruchomienie w nich sygnałów regulujących przemiany fizjologiczne. Związanie do tego receptora ułatwia bakteriom inwazję wewnątrz komórek nabłonka moczowego (Servin, 2005). Adhezyna Dr jest powiązana z kolonizacją wstępującą dróg moczowych oraz przewlekłą śródmiąższową infekcją nerek. Około połowa przypadków infekcji układu moczowego u dzieci i ponad 30% przypadków odmiedniczkowego zapalenia nerek u kobiet w ciąży związana jest z kolonizacją przez szczepy ekspresujące fimbrie Dr. Co istotne, zakażenie szczepami wykazującymi fimbrie tego typu wiąże się z dwukrotnym wzrostem ryzyka ponownego wystąpienia infekcji (Mulvey, 2002). Związanie z receptorem DAF prowadzi do internalizacji bakterii do komórek górnych odcinków układu moczowego, co sprawia, że szczepy ekspresujące ten czynnik są niezwykle trudne do usunięcia z organizmu – mogą pozostać w obrębie tkanki nerkowej przez ponad rok (Goluszko *et al.*, 1997). Operony *afa* kodują geny odpowiedzialne za syntezę należących do rodziny Afa/Dr adhezyn Afa, z których AfaE-I (32% podobieństwo sekwencyjne do adhezyny Dr) oraz AfaE-III (98% podobieństwo do adhezyny Dr) ekspresowane są przez uropatogenne szczepy *E. coli* wywołujące m.in. zapalenie pęcherza moczowego. Adhezyna AfaE-III, w przeciwieństwie do Dr, nie rozpoznaje kolagenu typu IV, rozpoznaje natomiast receptor DAF, jednak wiązanie to jest niewrażliwe na działanie chloramfenikolu (Servin, 2005).

Na powierzchni komórek UPEC obecne są także inne czynniki zjadliwości, takie jak składniki otoczki oraz lipopolisacharyd (LPS), powszechne wśród wszystkich bakterii Gramujemnych. Otoczka to przylegająca do zewnętrznej powierzchni ściany komórowej struktura polisacharydowa chroniąca bakterie przed fagocytozą oraz efektem bakteriobójczym wynikającym z działania układu dopełniacza. Bakterie *E. coli* zdolne są do wytwarzania ponad 80 różnych antygenów otoczkowych. Niektóre rodzaje otoczek, występujące również u szczepów UPEC (np. K1), wykazują naśladownictwo w stosunku do składników tkanek gospodarza, co dodatkowo ochrania bakterie przed reakcją układu immunologicznego (Bien *et al.*, 2012). U około 63% przypadków pacjentek z odmiedniczkowym zapaleniem nerek zaobserwowano występowanie szczepów *E. coli* z otoczką K1 bądź K5. Otoczka K1 występuje częściej u pacjentów z infekcjami górnych odcinków układu moczowego.

Stwierdzono również, że szczepy K1 produkujące zwiększoną ilość polisacharydu otoczkowego związane są z bardziej ostrymi formami UTI (Cisowska, 2003).

LPS, integralny element ściany komórkowej wszystkich bakterii Gram-ujemnych, u szczepów UPEC odpowiedzialny jest za aktywację odpowiedzi prozapalnej w przypadkach nieskomplikowanych infekcji układu moczowego. Stymuluje on produkcję cytokin (IL-1, TNF α) i pobudza stan zapalny, a także indukuje syntezę przeciwciał specyficznych dla antygeny somatycznego. Na modelu zwierzęcym wykazano, że związana z LPS ostra niewydolność nerek zależy od ogólnoustrojowej odpowiedzi na ten czynnik i nie wpływa na nią ekspresja TLR4 – nerkowego receptora LPS. Jednakże, receptor ten eksprymowany jest w nabłonku nerkowym oraz w miedniczkach nerkowych, co sugeruje, że wstępująca infekcja bakteriami Gram-ujemnymi, a więc i prezentacja LPS, może stymulować wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Odpowiedź taka występuje często u pacjentów z odrzutami po przeszczepie nerki (Emody *et al.*, 2002).

2.1.1.2 Wydzielane czynniki wirulencji

Spośród czynników wirulencji wydzielanych poza komórkę bakteryjną do najważniejszych należy kodowana przez gen *hly* lipoproteina α -hemolizyna (HlyA), związana z infekcjami górnych odcinków dróg moczowych. Około 50% przypadków odmiedniczkowego zapalenia nerek spowodowanych jest przez szczepy wydzielające HlyA. Spektrum komórek docelowych tego czynnika obejmuje erytrocyty, leukocyty i komórki nerkowej tkanki śródbłonkowej i nabłonkowej. Receptorem dla HlyA jest glikoporyna, integralne białko błony erytrocytów. W wysokich stężeniach toksyna ta jest zdolna do wywoływania lizy erytrocytów i innych komórek, co sprzyja wnikaniu patogenów, takich jak UPEC, poprzez błony śluzowe i pokonaniu mechanizmów obronnych układu odpornościowego. W niskich stężeniach HlyA może wywoływać apoptozę komórek gospodarza i stanowić bodziec do złuszczenia nabłonka, a także zaburza równowagę jonów Ca²⁺ w komórkach nabłonka nerek (Bien *et al.*, 2008).

Drugim ważnym czynnikiem wirulencji, który jest wydzielany przez niektóre uropatogenne szczepy *E. coli* jest kodowany przez pojedynczy gen *cnf1* cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1 (CNF1), obecny u około 1/3 wszystkich szczepów odpowiedzialnych za odmiedniczkowe zapalenie nerek. Jego działanie podczas infekcji nie

zostało do końca poznane, w badaniach *in vitro* wykazano, że narusza on błonę komórek gospodarza, pozwalając na wniknięcie do nich bakterii. Prawdopodobnie jego działanie *in vivo* polega na stymulowaniu złuszczenia nabłonka pęcherza, a w konsekwencji na ułatwianiu dostępu bakterii do nowej warstwy nabłonka (Bien *et al.*, 2008).

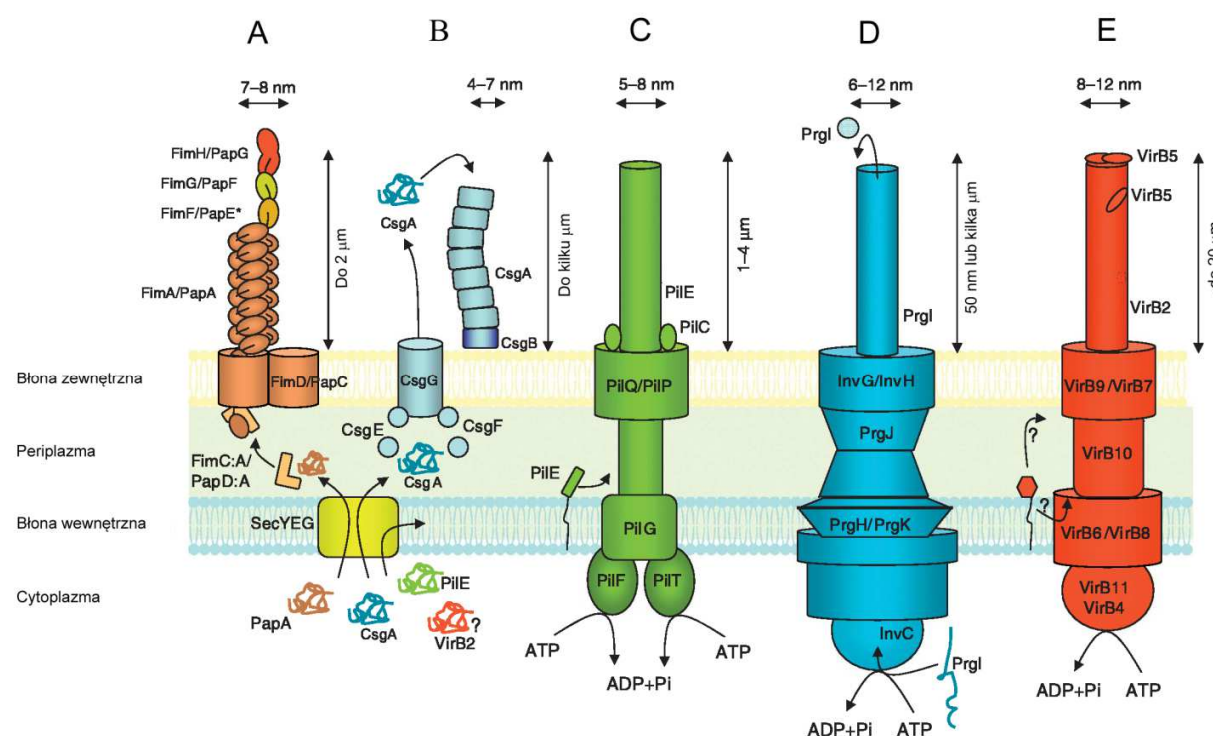
U około 30-60% UPEC obserwuje się zdolność eksportowania sideroforów (np. aerobaktyna, enterobaktyna), niskocząsteczkowych związków chemicznych, których funkcją jest wiązanie jonów Fe^{3+} ze związków chelatujących żelazo występujących w komórkach gospodarza. Jony żelaza są następnie transportowane do receptorów w błonie zewnętrznej, gdzie następuje ich wchłanianie (Guerinot, 1994).

2.2 Drogi biogenezy struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych

Główną barierą przy transporcie elementów struktur adhezyjnych na powierzchnię komórek bakterii Gram-ujemnych jest fakt posiadania przez nie dwóch błon komórkowych rozdzielonych przestrzenią periplazmatyczną. Przestrzeń ta wykazuje utleniający potencjał oksydoredukcyjny, dlatego pozbawiona jest źródeł energii takich jak ATP. Konieczna jest wobec tego transdukcja energii z cytoplazmy, gdzie panuje potencjał redukcyjny. Bakterie wykształciły dwie strategie umożliwiające im pokonanie tego problemu. Pierwsza z nich zakłada wykorzystanie dużych transportujących kompleksów białkowych spinających obie błony ze sobą. Takie systemy białkowe wykorzystują zlokalizowane w błonie wewnętrznej ATPazy, które wychwytyują cytoplazmatyczne ATP. Strategia ta często zakłada polimeryzację podjednostek budujących strukturę adhezyjną już w obrębie kompleksu transportującego i „osadzenie” rosnącej pili w nim na czas przejścia przez przestrzeń periplazmatyczną. Umożliwia to np. kurczenie struktury adhezyjnej (np. w przypadku pili typu IV), bądź przeniesienie cząsteczek efektorowych poprzez pilię do komórki docelowej (w przypadku struktury igłowej budowanej za pomocą systemu sekrecji typu III). Wadą tej drogi transportu jest jej stosunkowo wysoki koszt energetyczny oraz konieczność syntezy dużych kompleksów transportowych.

Drugą metodą pokonania bariery błona wewnętrzna-periplazma-błona zewnętrzna jest sposób wykorzystywany w mechanizmie chaperone-usher oraz pozakomórkowej precypitacji zarodkowej. Wykorzystuje on istniejące w komórce ogólne drogi transportu (np. system

sekrecji Sec) w celu przeniesienia podjednostek struktur adhezyjnych do przestrzeni periplazmatycznej, po czym katalizuje ich polimeryzację w obrębie błony zewnętrznej bez udziału dodatkowych źródeł energii. Synteza pili odbywa się z wykorzystaniem wewnętrznej energii podjednostek zgromadzonej w ich strukturze na etapie procesu fałdowania w periplazmie (np. wysokoenergetyczny stan podjednostki piliowej w kompleksie z specyficznym periplazmatycznym białkiem opiekuńczym kodowanym przez ten sam operon co podjednostka), bądź poprzez wykorzystanie gradientu stężeń podjednostek pomiędzy periplazmą a powierzchnią komórki (w przypadku pozakomórkowej precypitacji zarodkowej) (Allen *et al.*, 2012).



Rys. 1. Mechanizmy biogenezy struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych. A: Mechanizm chaperone-usher na przykładzie pili typu 1 i pili P *Escherichia coli* (* pilia P posiada 5-10 podjednostek PapE, natomiast pilia typu 1 posiada tylko jedną analogiczną podjednostkę FimE; pilia typu 1 nie posiada adaptora analogicznego do PapK, znajdującego się pomiędzy PapA i PapE), B: Mechanizm pozakomórkowej precypitacji zarodkowej na przykładzie fimbrii agregujących *E. coli*. C: Mechanizm ogólnej sekrecji na przykładzie pili typu IV *Neisseria gonorrhoeae*, D: System sekrecji typu III na przykładzie struktury igłowej *Salmonella typhimurium*, E: System sekrecji typu IV na przykładzie pili *Agrobacterium tumefaciens* (Fronzes *et al.*, 2008).

2.2.1 Mechanizm ogólnej sekrecji (ang. *general secretion pathway*) – pile typu IV

Do struktur adhezyjnych powstających na drodze mechanizmu ogólnej sekrecji należą pile typu IV, które zaobserwować można u wielu Gram-ujemnych bakterii, takich jak *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* czy enteropatogenne szczepy *E. coli*. Organella te osiągają długość 1-4 μm i średnicę 5-8 nm (Fronzes *et al.*, 2008). Budowane są jako homopolimer pojedynczego białka, np. PilA u *Pseudomonas aeruginosa* czy PilE u *Neisseria* spp. (Rys. 1C). W obrębie struktury obecne jest również białko o funkcji adhezyny - w przypadku szczepów *Neisseria* jest to najprawdopodobniej PilC, wiążąca się do receptorów CD46 w komórkach nabłonka i śródbłonka układu urogenitalnego (Proft, Baker, 2009). Najbardziej charakterystyczną cechą pili typu IV jest ich unikalna zdolność do generowania ruchu drgającego bakterii, wspomagającego ich przemieszczanie, np. w obrębie nabłonka błon śluzowych. Ruch ten jest skutkiem kurczenia się (depolimeryzacji) pili po przytwierdzeniu ich końca do powierzchni docelowej i wymaga obecności ATPazy w błonie wewnętrznej (Meier *et al.*, 2004)

Wszystkie podjednostki budujące pile typu IV u różnych mikroorganizmów syntetyzowane są jako prekursorzy (prepiliny) z hydrofilowym peptydem liderowym, odcinanym przez specyficzną peptydazę liderową. Na podstawie długości tego peptydu, a co za tym idzie, długości dorosłej formy piliny, podjednostki pili typu IV dzieli się na dwie grupy: IVa oraz IVb. Piliny z grupy IVa posiadają peptyd liderowy o długości nie przekraczającej 10 reszt aminokwasowych, podczas gdy same osiągają długość 150-160 reszt. U pilin z grupy IVb peptyd liderowy ma od 15 do 30 reszt a dorosła podjednostka jest albo bardzo krótka (40-50 reszt) albo długa (180-200 reszt). W biogenezę pili tego typu zaangażowanych jest kilkanaście białek. Dla wszystkich mikroorganizmów wykorzystujących ten typ biogenezy struktur adhezyjnych wspólne są podstawowe elementy składające się na niego. Są to: główna podjednostka pilinowa, wspomniana już peptydaza odcinająca peptyd liderowy z prepiliny, napędzająca biosyntezę pili ATPaza, która dokowana jest do błony wewnętrznej przez specyficzne białko wiążące ATPazy oraz sekretyna w błonie zewnętrznej, odpowiedzialna za wyeksportowanie pili na powierzchnię komórki. Prepiliny syntetyzowane są w cytoplazmie, skąd za pomocą mechanizmu Sec są

przenoszone przez błonę wewnętrzną do periplazmy, czemu towarzyszy obcięcie peptydu sygnałnego i dodanie grupy metylowej na N-końcu. Tam następuje fałdowanie i wprowadzenie mostków disiarczkowych stabilizujących strukturę. W przypadku *N. gonorrhoeae* proces polimeryzacji następuje na platformie składającej się z białka błony wewnętrznej (PilG) oraz ATPazy (PilF) napędzającej biogenezę. Pile umożliwiające generowanie ruchu drgającego wymagają także obecności ATPazy PilT odpowiedzialnej za depolimeryzację pili. Dorosła pila wydostaje się poza błonę zewnętrzną poprzez sekretynę PilE (Fronzes *et al.*, 2008, Proft i Baker, 2009) (Rys. 1C). Szczegółowy mechanizm molekularny biogenezы nie został do tej pory dokładnie objaśniony (Craig *et al.*, 2006).

2.2.2 Mechanizm sekrecji typu III (T3SS, ang. *type III secretion system*)

Główną i najlepiej poznaną funkcją systemu sekrecji typu III (Rys. 1D) jest sekrecja białek efektorowych przez podwójną błonę bakteryjną do komórki gospodarza (Fronzes *et al.*, 2008). T3SS może jednak również przyczyniać się do adhezji do komórek gospodarza, co zostało wykazane u bakterii z rodzaju *Salmonella*. Składniki T3SS występujące u tego patogena – translokazy SipB, SipC oraz SipD – umożliwiają ścisłe umocowanie *S. typhimurium* do komórek docelowych (Lara-Tejero, Galan, 2009, Shippy *et al.*, 2013).

Głównym składnikiem systemu sekrecji typu III jest tzw. kompleks igło-podobny (ang. *needle complex, injectisome*), który funkcjonuje jako kanał, przez który wydzielane białka przedostają się przez bakteryjne błony. Inne istotne elementy tego systemu to kompleks białek zlokalizowanych w błonie wewnętrznej, współpracujący z systemem ATPazy oraz zespół specyficznych białek umożliwiających kierowanie odpowiednich białek efektorowych do kompleksu igło-podobnego. Poza tymi składnikami udział w T3SS ma grupa białek – translokaz, również eksportowanych przez kanał T3SS, których funkcja polega na pośredniczeniu w transporcie białek efektorowych przez błonę komórki docelowej (Lara-Tejero, Galan, 2009). Sama struktura kompleksu to krótka i sztywna „igła” o długości ok. 60 nm oraz średnicy zewnętrznej 6-12 nm i wewnętrznej 2-3 nm (Fronzes *et al.*, 2008) (Rys. 1D).

2.2.3 Mechanizm sekrecji typu IV (ang. *type IV secretion system*)

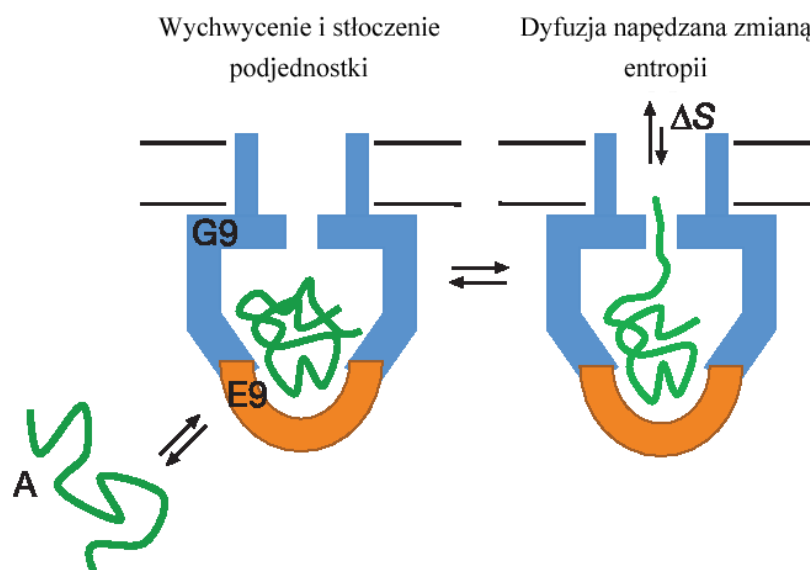
System sekrecji typu IV wyewoluował z zespołu białek zaangażowanych w koniugację bakteryjną. Funkcją tego systemu jest przede wszystkim wydzielanie czynników wirulencji (DNA lub białek) do komórek gospodarza. Pile tworzone tą drogą odpowiadają za wytworzenie specyficznego i trwałego kontaktu bakteria-komórka gospodarza przed rozpoczęciem transferu substratów (Fronzes *et al.*, 2008). Jedną z klas tego systemu, Trw, produkuje kilka różnych podjednostek piliowych, których znaczenie jest kluczowe dla adhezji do erytrocytów przez Gram-ujemne bakterie z rodzaju *Bartonella* (Dehio, 2008, Vayssier-Taussat *et al.*, 2010).

System sekrecji typu IV (Rys. 1E) obejmuje zespół co najmniej 10 niezbędnych do funkcjonowania białek oznaczanych jako VirB2-VirB11 oraz współpracującego z nim receptora rozpoznającego substrat – białka sprzężenia systemu sekrecji typu IV (T4CP, ang. *type IV secretion coupling protein*) VirD4. System ten składa się z kanału spinającego błonę wewnętrzną i zewnętrzną, przez który zachodzi eksport (tworzonego przez kompleks białek VirB6/B8, VirB10 i VirB9/B7), a także powierzchniowego filamentu rozciągniętego od powierzchni komórki bakteryjnej (VirB2), którego zadaniem jest nawiązywanie kontaktu z komórką gospodarza. Jedynie niektóre cechy molekularne tego systemu zostały do tej pory opisane (np. struktura T4CP, sekwencja rozpoznania substratu oraz struktura 6 z 10 białek VirB2-VirB11).

2.2.4 Mechanizm pozakomórkowej precypitacji zarodkowej (ang. *nucleation precipitation pathway*) – agregujące fimbrie

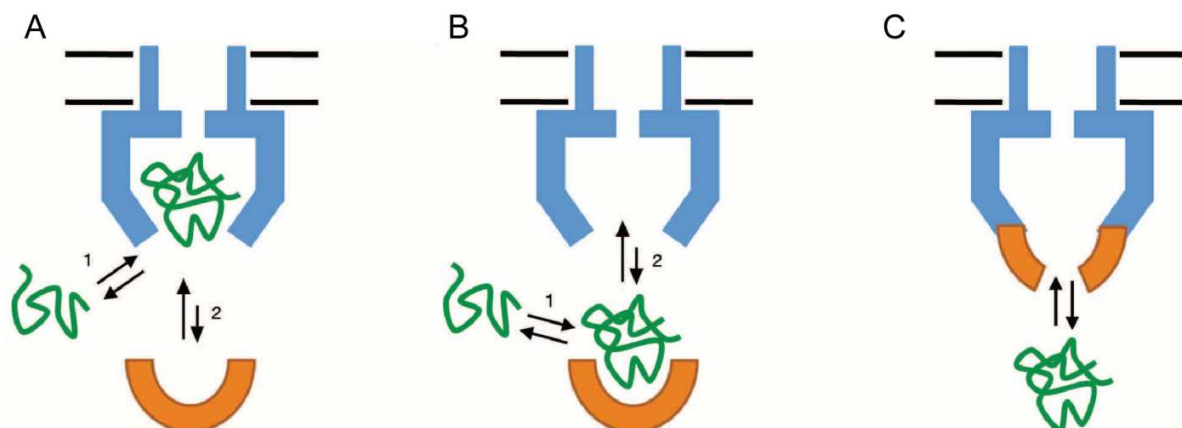
Niektóre bakterie, takie jak *Salmonella* spp. czy *E. coli*, produkują na swojej powierzchni cienkie, nieregularne fimbrie (ang. *curli*) o średnicy ok. 4-7 nm, odporne na działanie proteaz oraz 1% SDS i często tworzące agregaty (Proft i Baker, 2009). Struktury te przypominają pod względem budowy włókna amyloidowe kojarzone z ludzkimi schorzeniami degeneracyjnymi. W przypadku *E. coli* adhezyjne struktury fimbrialne tego typu budowane są przez białka podjednostkowe CsgA, które podlegają sekrecji na powierzchnię komórki, gdzie następuje ich polimeryzacja z udziałem białka CsgB, najprawdopodobniej

funkcjonującego jako nukleator (zarodek krystalizacji). W przypadku nieobecności CsgB, główna podjednostka fimbrii po przetransportowaniu na powierzchnię bakterii nie ulega polimeryzacji, ale pozostaje w postaci rozpuszczalnej (Goyal *et al.*, 2014). Efektywna biogeneza fimbrii wymaga obecności lipoproteiny CsgG, zlokalizowanej w błonie zewnętrznej, która stabilizuje i uczestniczy w eksporcie obu podjednostek budulcowych. Dodatkowe elementy maszynierii budującej fimbrie stanowią białka CsgE i CsgF, oddziałujące z CsgG i niezbędne do prawidłowego uformowania fimbrii (Nenninger *et al.*, 2008) (Rys. 1B). Transporter CsgG oraz białko CsgE tworzą kompleks sekrecyjny z wykształconą komorą służącą do wiązania podjednostek CsgA. Energetyka uwalniania podjednostek z komory przez błony bakteryjne napędzana jest zmianą entropii pomiędzy stanem napełnienia komory podjednostką (niska entropia w obrębie komory - wysoka entropia na powierzchni komórki) i jej opróżnieniem (wysoka entropia w komorze – niska na powierzchni komórki). Wysoka koncentracja i stłoczenie konformacyjne niesfałdowanych podjednostek w komorze CsgG generuje napędzany entropią gradient energii swobodnej u wylotu kanału translokacyjnego CsgG (Rys. 2). Po wyjściu z kanału, białka podjednostek ulegają dyfuzji zasilanej tymże potencjałem. Wyjście całego białka składającego się ze 129 reszt aminokwasowych z kanału równa się uwolnieniu energii swobodnej równej 340 kJ/mol^{-1} . Początkowy koszt energetyczny związany z koniecznością wychwycenia substratu jest rekompensowany przez uwolnienie energii powstającej przy tworzeniu kompleksu CsgG-CsgE-CsgA oraz przez zwiększenie poziomu entropii w periplazmie.



Rys. 2. Prawdopodobny model mechanizmu przenoszenia białek przez kanał CsgG. Białka CsgG (oznaczone jako G9) i CsgE (E9) tworzą kompleks sekrecyjny wiążący podjednostkę CsgA (A), przez co wytworzony zostaje potencjał entropii pomiędzy wejściem i wyjściem z kompleksu. Po wypełnieniu komory kompleksu i stłoczeniu w niej podjednostki następuje napędzana zmianą entropii dyfuzja podjednostki, skutkująca jej przeniesieniem przez błonę zewnętrzną (Goyal *et al.*, 2014).

Jeżeli chodzi o mechanizm przyłączania białka podjednostki do kompleksu sekrecyjnego, to obecnie istnieją trzy hipotezy. Mechanizm pierwszy (Rys. 3A) zakłada wiązanie podjednostki do lipoproteiny CsgG, co wiąże się z jej zmianami konformacyjnymi i odsłonięciem miejsca o wysokim powinowactwie do CsgE. Przyłączenie tego białka skutkuje zamknięciem komory substratowej. Po uwolnieniu podjednostki, CsgG wraca do swojej pierwotnej konformacji, następuje odłączenie CsgE i powtórzenie cyklu. W mechanizmie drugim (Rys. 3B) jako pierwsze ma miejsce wychwycenie CsgA przez CsgE i utworzenie kompleksu o wysokim powinowactwie, który następnie przyłącza się do CsgG zamykając podjednostkę w komorze. Tutaj uwolnienie podjednostki prowadzi do zmiany konformacji CsgE i jego dysocjacji od kanału sekrecyjnego. Ostatnia hipoteza (Rys. 3C) zakłada utworzenie głównego kompleksu, w którym CsgE oscyluje pomiędzy dwoma stanami konformacyjnymi: otwartym i zamkniętym w fazach odpowiednio wiązania i wydzielania podjednostki (Goyal *et al.*, 2014).



Rys. 3. Schemat procesu wiązania podjednostki i jej zamknięcia w komorze sekrecyjnej CsgG - trzy hipotetyczne możliwości (Goyal *et al.*, 2014).

2.3 Klasyczny mechanizm chaperone-usher

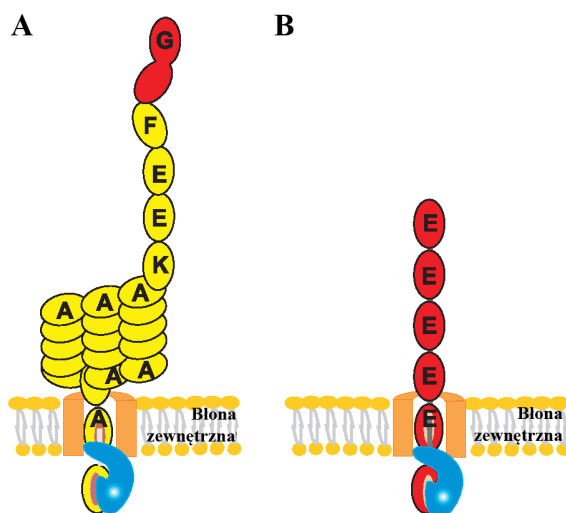
2.3.1 Morfologia struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher

System chaperone-usher jest najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem biogenezy struktur adhezyjnych, wspólnym dla około 30 organelli różnych bakterii Gram-ujemnych (Thanassi i Hultgren, 2000). Występują one głównie u takich rodzajów bakterii jak *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, czy *Bordatella*. System ten pozwala na formowanie struktur o różnorodnej funkcji i architekturze. Struktury tego typu tworzą włókna składające się z podjednostek białkowych ułożonych liniowo w układzie „głowa do ogona”. W obrębie superrodziny struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher można generalnie wyodrębnić dwie funkcjonalnie zróżnicowane rodziny – monoadhezyn oraz poliadhezyn (Rys. 4).

Struktury należące do rodziny monoadhezyn to organella złożone z dwóch morfologicznie odmiennych części. Dolna, zakotwiczona w błonie zewnętrznej jest walcowata i sztywna, natomiast górna część to cienki i elastyczny filament. Monoadhezyny mają długość ok. 2 μ m i wykazują złożoną budowę podjednostkową – mogą być budowane przez aż siedem różnych rodzajów białek. Cechą charakterystyczną tych struktur jest to, że

zwykle posiadają one tylko jedną białkową podjednostkę adhezyjną na szczycie struktury. Przykładem struktur z tej rodziny są pile typu 1, kodowane przez operon *fim* uropatogennych szczepów *E. coli* (Rys. 1A). Pile te składają się z grubszego filamentu złożonego z około 3000 podjednostek FimA, do którego przytwierdzone jest, poprzez białko FimF, cienkie fibryllum budowane przez podjednostki FimG. Na końcu włókna znajduje się adhezyna FimH (Hahn *et al.*, 2002; Walczak *et al.*, 2013).

Poliadhezyny charakteryzują się morfologią fimbrialną o średnicy 2-3 nm bądź amorficzną odpowiadającą bezpostaciowej otoczce. Ich budowa w większości przypadków wykazuje cechy homopolimeru złożonego z jednego rodzaju podjednostek, jednak możliwe są również przypadki struktur budowanych z maksymalnie sześciu różnych podjednostek (heteropolimer). Najważniejszą właściwością poliadhezyn jest to, że wszystkie podjednostki budujące homopolimeryczną poliadhezynę oraz główne podjednostki strukturalne w przypadku poliadhezyny heteropolimerycznej posiadają jedno lub dwa niezależne specyficzne dla różnych receptorów gospodarza miejsca wiązania. Przykładem przedstawicieli tej rodziny struktur adhezyjnych są kodowane przez operony *dra* i *afa-III* struktury zbudowane z podjednostek (odpowiednio) DraE i AfaE-III, występujące u uropatogennych szczepów *E. coli* (Van Loy *et al.*, 2002).

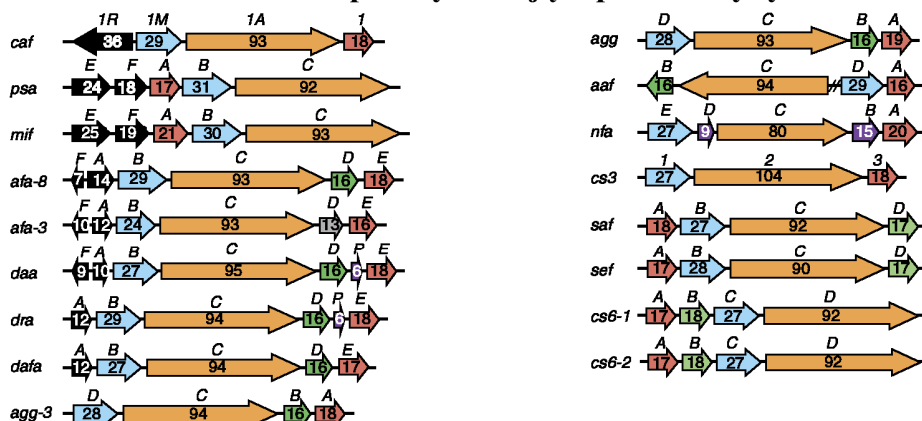


Rys. 4. Schemat struktur adhezyjnych budowanych za pomocą systemu chaperone-usher. A – struktura monoadhezyny na przykładzie pili P. B – struktura poliadhezyny na przykładzie fimbrii Dr. Podjednostki o funkcji adhezji zaznaczono kolorem czerwonym (Zavialov *et al.*, 2007).

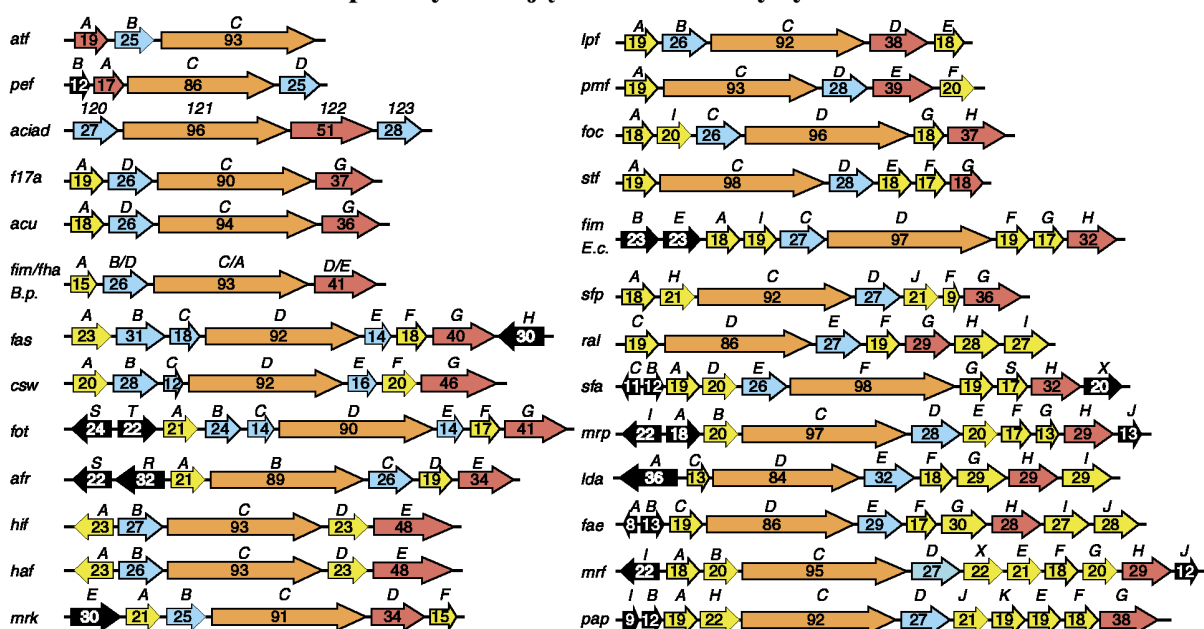
2.3.2 Biogeneza struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher

Geny odpowiedzialne za biosyntezę struktur adhezyjnych według mechanizmu chaperone-usher zgrupowane są w operonach o dużej homologii sekwencyjnej i strukturalnej (Soto i Hultgren, 1999). W każdym z operonów znajdują się geny kodujące trzy główne rodzaje białek niezbędne do utworzenia prawidłowej struktury adhezyjnej typu „chaperone-usher”: periplazmatyczne białko opiekuńcze (ang. *chaperone*) odpowiedzialne za katalizę procesu fałdowania podjednostek adhezyjnych do struktury natywnej zdolnej do polimeryzacji, zewnątrz błonowe białko kanałotwórcze (ang. *usher*), na bazie którego następuje formowanie funkcjonalnej zewnątrzkomórkowej struktury fimbrialnej oraz przynajmniej jedna główna podjednostka białkowa budująca zewnątrzkomórkową strukturę adhezyjną. W wielu przypadkach poza tymi trzema podstawowymi białkami w operonie znaleźć można geny, których ekspresja powoduje powstanie innych, pobocznych podjednostek, dodatkowych białek opiekuńczych, bądź białek regulatorowych (Nuccio i Baumler, 2007). Ogólną organizację operonów systemu chaperone-usher obrazuje rysunek 5.

Operony kodujące poliadhezyzny



Operony kodujące monoadhezyzny



Rys. 5. Organizacja operonów warunkujących ekspresję struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher. Geny kodujące białka opiekuńcze oznaczono kolorem niebieskim, białka usher kolorem pomarańczowym, główne podjednostki strukturalne i podjednostki o funkcji adhezyny kolorem czerwonym, podjednostki o nieznannej funkcji kolorem żółtym, a geny regulatorowe kolorem czarnym. Kolorem zielonym i różowym oznaczono odpowiednio geny kodujące białka o domniemanej i nieznannej funkcji. Liczby w strzałkach oznaczają masę kodowanego białka w kDa (Zav'yalov *et al.*, 2010).

Białka podjednostek struktur adhezyjnych posiadają N-terminalną sekwencję sygnałną umożliwiającą ich transport za pomocą systemu sekrecji Sec z cytoplazmy przez błonę wewnętrzną do przestrzeni periplazmatycznej. Sekwencja ta zostaje odcięta podczas

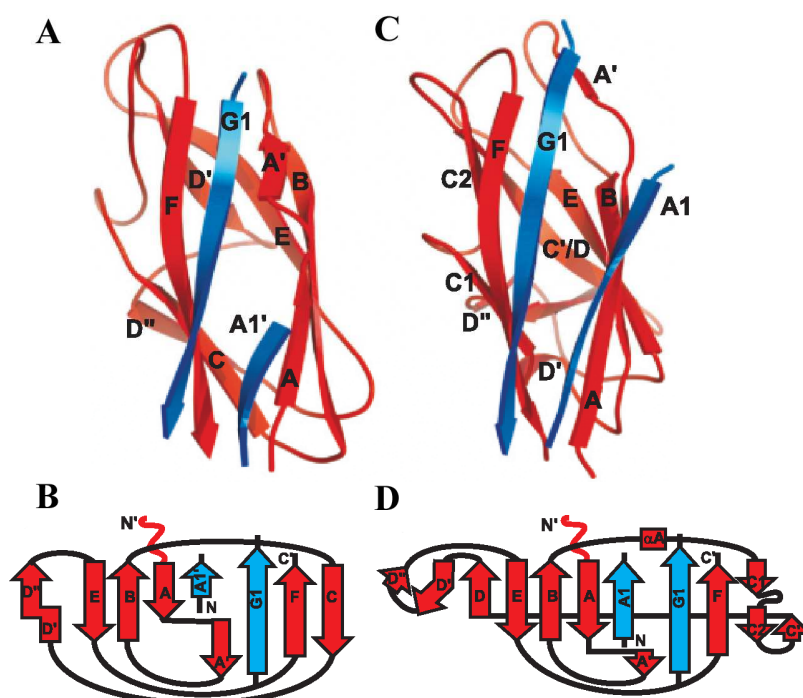
transportu, a białko w obrębie periplazmy zostaje poddane działaniu oksydoreduktaz disiarczkowych, takich jak np. DsbA (w przypadku *E. coli*) czy SrgA (u *S. enterica*), które katalizują tworzenie mostków disiarczkowych (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994, Bouwmann *et al.*, 2003, Crespo *et al.*, 2012). Białka podjednostkowe charakteryzują się strukturą immunoglobulino-podobną. Klasyczna struktura immunoglobulinowa (Ig), przykładami której są np. przeciwciała, posiada topologię spłaszczoną β -beczki składającej się z dwóch ułożonych antyrównolegle względem siebie β -kartek. Budowane są one przez siedem głównych β -nici oznaczanych literami od A do G. Dwie β -kartki są ze sobą połączone poprzez mostek disiarczkowy, zlokalizowany pomiędzy β -niami B i F (Halaby *et al.*, 1999). Cechą charakterystyczną białek podjednostkowych systemu CU jest struktura immunoglobulinopodobna wykazująca brak siódmej C-terminalnej β -nici G, co prowadzi do powstania szczeliny akceptorowej na ich powierzchni, odsłaniającej częściowo rdzeń tworzony przez hydrofobowe reszty aminokwasowe. Brzgi szczeliny tworzone są przez reszty aminokwasowe C-terminalnej β -nici F oraz N-terminalnej β -nici A. W skład szczeliny wchodzi do pięciu niepolarnych aminokwasów (miejsca wiążące P5-P1). Wielkość szczeliny powiązana jest z rodzajem morfologicznym struktury adhezyjnej – jest ona większa w przypadku struktur homopolimerycznych (Sauer *et al.*, 2004). Do utworzenia poprawnej struktury podjednostki fimbrialnej niezbędna jest interakcja – utworzenie kompleksu binarnego – ze specyficznym białkiem opiekuńczym, które uzupełnia jej szczelinę hydrofobową w procesie komplementacji nici donorowych (DSC, ang. *donor strand complementation*). Mechanizm ten opiera się na współdzieleniu C-terminalnej β -nici donorowej G1 białka opiekuńczego z podjednostką. Pomiedzy β -niami G1 i A1 białka opiekuńczego oraz F i A szczeliny akceptorowej białka podjednostkowego tworzą się wiązania wodorowe. W wyniku reakcji DSC białko podjednostki uzyskuje strukturę stabilnej, zamkniętej β -beczki. Komplementacja nici donorowej jest więc procesem umożliwiającym podjednostkom prawidłowe fałdowanie poprzez dostarczenie informacji sterycznej w postaci brakującej nici (Zav'yalov *et al.*, 2010). Proces ten zabezpiecza podjednostki przed agregacją i późniejszą degradacją proteolityczną. W następnym etapie kompleksy podjednostka-białko opiekuńcze przemieszczają się w kierunku zlokalizowanych w błonie zewnętrznej białek kanałotwórczych. Kontakt z usherem umożliwia uwolnienie podjednostek z kompleksów, a następnie przetransportowanie ich poprzez kanał na

powierzchnię komórki bakteryjnej, gdzie kolejno włączane są w obręb struktury adhezyjnej. W momencie styczności kompleksu chaperone-podjednostka z usherem następuje reakcja wymiany nici donorowych (DSE, ang. *donor strand exchange*), której efektem jest usunięcie białka opiekuńczego z kompleksu przez następną podjednostkę. W obrębie szczeliny akceptorowej następuje w tym momencie wymiana β -nici G1 chaperonu na Gd - N-końcową nić donorową podjednostki. Ostatecznie N-terminalna nić „przybywającej” podjednostki wypełnia szczelinę podjednostki ostatnio wbudowanej w polimer. Efektem jest powstanie dojrzałego organellum, w którym każda podjednostka swoją nicią donorową uzupełnia strukturę sąsiedniej podjednostki (Sauer *et al.*, 2004).

2.3.3 Białka podjednostkowe budujące struktury systemu chaperone-usher

Białka podjednostkowe będące składnikami budulcowymi struktur adhezyjnych systemu chaperone-usher, mimo iż należą do jednej rodziny, charakteryzują się niskim poziomem homologii sekwencyjnej. Wynika to z dużego zróżnicowania struktur adhezyjnych i ich funkcji biologicznej. Z drugiej jednak strony, wykazują one wysoki stopień zakonserwowania strukturalnego, będącego skutkiem przynależności do układów o wspólnym mechanizmie biogenezy. Ponieważ struktury adhezyjne systemu chaperone-usher dzielą się ogólnie na dwie grupy – homo- i heteropolimetyczne – budowa białek podjednostkowych została przedstawiona na przykładzie podjednostki Caf1 budującej frakcję 1 u *Yersina pestis* (struktura homopolimeryczna) i domeny pilinowej podjednostki FimH pili typu 1 u *Escherichia coli* (struktura heteropolimeryczna). Pomimo braku wyraźnego podobieństwa w sekwencji aminokwasowej, oba rodzaje podjednostek wykazują podobną organizację budujących je β -nici (Rys. 6). Szkielet rdzenia obu białek podjednostkowych składa się z czterech β -nici, oznaczanych jako B, C, E oraz F. Znacząca różnica zauważalna jest natomiast w obrębie β -nici A. W białkach struktur heteropolimerycznych nić A w początkowym odcinku oddziałuje poprzez wiązania wodorowe z β -nicią B, formując β -kartkę ABED, po czym ulega przegięciu i dalej kontynuuje jako część β -kartki A'G1FC (gdzie G1 oznacza nić donorową białka opiekuńczego). W przypadku białek struktur homopolimerycznych β -nić A ulega przegięciu w swym końcowym odcinku (lub jej struktura ulega zaburzeniu, np. w przypadku

podjednostki SafA z *Salmonella typhimurum*), przez co w niewielkim stopniu współtworzy β -kartkę A'G1FC. Region znajdujący się pomiędzy β -niemi C i E wykazuje duże zróżnicowanie strukturalne wśród wszystkich białek podjednostkowych struktur adhezyjnych. Białka budujące struktury heteropolimeryczne mają tendencję do posiadania długich pętli pomiędzy β -niemi D'' i E, podczas gdy podjednostki struktur homopolimerycznych wykazują dłuższe sekwencje w regionie pomiędzy β -niemi C i D (Zavialov *et al.*, 2007).



Rys. 6. Różnice w budowie podjednostek na przykładzie Caf1 (składnika struktury homopolimerycznej) i FimH (elementu struktury heteropolimerycznej) oraz porównanie struktur tych podjednostek w kompleksie z białkami opiekuńczymi. A, B – rozmieszczenie β -nici w podjednostce FimH *E. coli*. C, D – rozmieszczenie β -nici w podjednostce Caf1 *Y. pestis*. Kolorem czerwonym zaznaczono nici pochodzące od podjednostki, kolorem niebieskim – nici donorowe białka opiekuńczego (Zavialov *et al.*, 2007).

Poza brakiem jednej z β -nici, struktura niektórych białek podjednostkowych różni się od klasycznej struktury immunoglobulinowej jeszcze jednym elementem – mostkiem disiarczkowym, łączącym dwie sąsiednie nici. Znajduje się on pomiędzy początkiem nici A i końcem nici B, przez co zlokalizowany jest na szczycie białka podjednostkowego. W

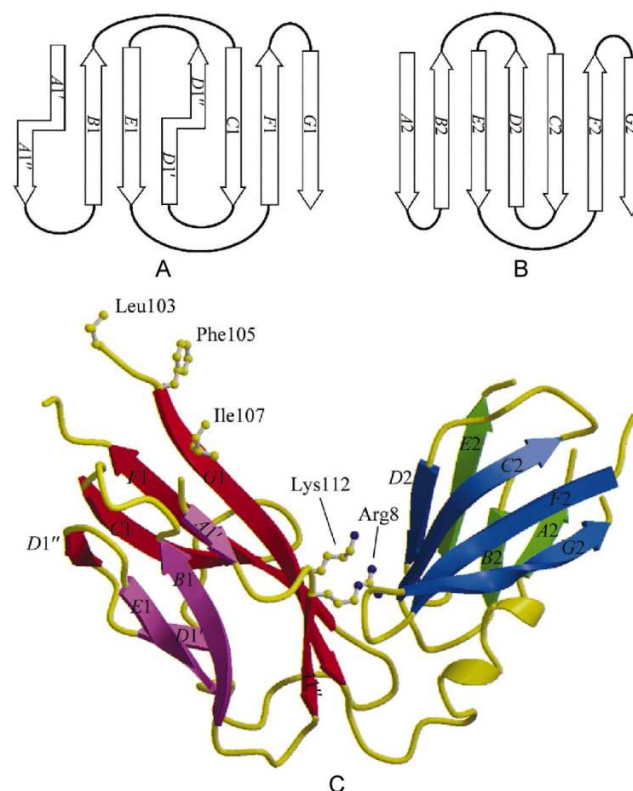
klasycznej strukturze Ig mostek występuje w obrębie rdzenia białka, łącząc nici B i F. Mostek typu A-B zidentyfikowany został w obrębie struktur głównych podjednostek DraE, PapA i FimA, pomniejszych podjednostek PapE, PapH, PapK, FimA, FimF, FimG oraz w obrębie domeny pilinowej podjednostki FimH (Sauer *et al.*, 1999, Choudhury *et al.*, 1999, Anderson *et al.*, 2004, Verger *et al.*, 2007, Puorger *et al.*, 2008, Piątek *et al.*, 2010).

2.3.4 Struktura i funkcja białek opiekuńczych systemu chaperone-usher

Białka opiekuńcze stanowią kluczowy element szlaku biogenezy typu „chaperone-usher”. Ich funkcja obejmuje wychwytywanie kolejnych podjednostek przetransportowanych przez błonę wewnętrzną do periplazmy i w efekcie katalizę procesu ich fałdowania. Wiązanie to jednocześnie chroni podjednostki przed agregacją i degradacją proteolityczną poprzez wypełnienie występującej w strukturze podjednostek szczeliny hydrofobowej za pomocą specyficznej nici donorowej chaperonu. Białka opiekuńcze transportują także podjednostki przez periplazmę do białka kanałotwórczego w błonie zewnętrznej (Zavialov *et al.*, 2007).

Białka opiekuńcze szlaku „chaperon-usher” wykazują wysoki stopień zakonserwowania pod względem sekwencji i struktury. Ich budowa została po raz pierwszy opisana na podstawie białka PapD biorącego udział w składaniu pili P uropatogennych szczepów *Escherichia coli* (Hultgren *et al.*, 1993). Każde takie białko składa się z dwóch domen, których wzajemne nachylenie do siebie pod kątem około 90° nadaje cząsteczce kształt zbliżony do bumerangu. Domeny białka opiekuńczego posiadają strukturę immunoglobulinową złożoną z siedmiu β -nici. Domena N-terminalna zawiera element kluczowy w procesie uzupełniania szczeliny akceptorowej podjednostki – nić donorową G1. W obrębie tej nici znajdują się naprzemiennie ułożone reszty hydrofobowe, które poprzez oddziaływanie z hydrofobowymi resztami podjednostkowej β -nici F dopełniają rdzeń podjednostki. Pomędzy domenami białka opiekuńczego obserwuje się szeroką i głęboką szczelinę. W jej obrębie położony jest jeden z fundamentalnych elementów, biorących udział w tworzeniu kompleksu z podjednostką – dwie zakonserwowane reszty aminokwasowe, będące homologami reszt Arg8 i Lys112 chaperonu PapD. Reszty te są odpowiedzialne za wiązanie i odpowiednie umiejscowienie C-terminalnej reszty karboksylowej z β -nici F podjednostki i ostatecznie zapewniają prawidłowe wzajemne ułożenie β -nici F i nici

donorowej G1 białka opiekuńczego. Jest to tak zwana „kotwica argininowo-lizynowa” (Zavialov *et al.*, 2003). Struktura białka opiekuńczego na przykładzie SfaE (kodowanego przez operon *sfa* i biorącego udział w biogenezie pili S *E. coli*) pokazana została na rysunku 7.



Rys. 7. Struktura białka opiekuńczego SfaE. A i B – diagramy topologiczne odpowiednio domeny N- i C-terminalnej. C – diagram wstążkowy struktury III-rzędowej chaperonu. Uwidoczniono trzy reszty hydrofobowe tworzące kluczowy motyw nici donorowej (Leu103, Phe105, Ile107), a także dwie zakonserwowane dodatkowo reszty zlokalizowane na dnie szczeliny wiążącej podjednostkę (Arg8, Lys112) (Knight *et al.*, 2002).

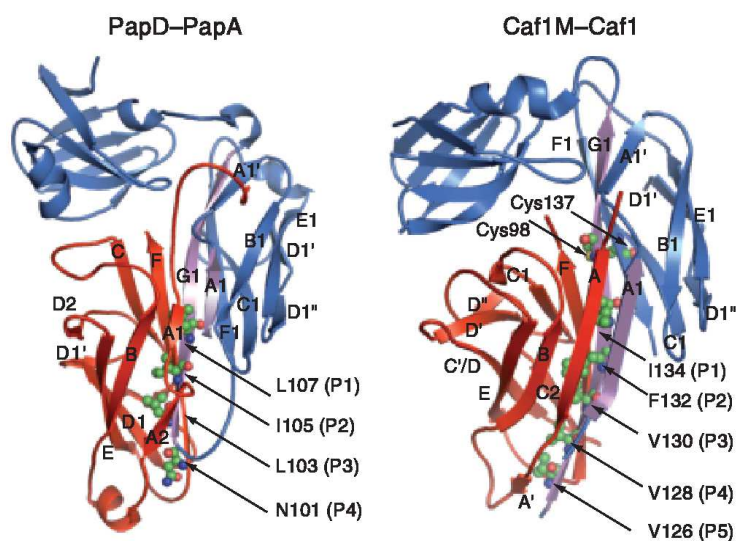
Białka opiekuńcze są klasyfikowane na podstawie długości pętli łączącej β -nici F1 i G1 domeny N-terminalnej. Wyróżniamy dwie grupy tych białek: FGS (ang. *F1-G1 short*), posiadające krótką pętlę o długości od 10 do 20 reszt aminokwasowych (np. PapD, FimC), oraz FGL (ang. *F1-G1 long*) o pętli zawierającej od 21 do 29 reszt (np. Caf1M, DraB). Jednocześnie wymieniony wyżej podział pod względem morfologicznym skorelowany jest z rodzajem struktury adhezyjnej, w biogenezie której biorą udział. Białka FGS budują struktury heteropolimeryczne, podczas gdy białka FGL uczestniczą w powstawaniu struktur

homopolimerycznych (Zav'yalov *et al.*, 1995, Hung *et al.*, 1996) (Tabela 3). Pętla F1-G1 w strukturach krystalograficznych białek opiekuńczych w stanie wolnym jest nieuporządkowana. Podczas oddziaływania z podjednostką rejon ten ulega ustrukturyzowaniu w wyniku czego wydłuża się motyw wiążący podjednostkę znajdujący się w nici G1 (zlokalizowanej tuż za pętlą F1-G1). W przypadku białek FGS motyw wiążący w rejonie nici G1 składa się z trzech masywnych reszt hydrofobowych, natomiast motyw białek FGL obejmuje łącznie pięć takich reszt: trzy w obrębie nici donorowej oraz dodatkowe dwie w rejonie pętli. Dłuższy, bardziej wyspecjalizowany motyw wiążący białka podjednostek chaperonów FGL zawęża spektrum pasujących do niego podjednostek do jednej bądź dwóch, wynikiem czego jest powstawanie struktur homopolimerycznych. Z kolei krótszy motyw wiążący białek FGS skutkuje mniej specyficznym wiązaniem, umożliwiającym biogenezę struktur piliowych zbudowanych z nawet siedmiu różnych podjednostek (Zavialov *et al.*, 2003). Poza pierwotnie zaobserwowanymi różnicami w długości pętli F1-G1, pomiędzy białkami FGS i FGL występują również inne różnice strukturalne szczególnie w rejonach odpowiedzialnych za oddziaływania z podjednostkami (Rys. 7). Nić donorowa chaperonów z rodziny FGL wyposażona jest w motyw składający się z pięciu masywnych reszt hydrofobowych (oznaczonych jako reszty P1-P5), które podczas tworzenia kompleksu wypełniają pięć „kieszoni” wiążących w obrębie szczeliny podjednostki (miejsca wiążące P1-P5). Efektem jest zdecydowanie dłuższa szczelina akceptorowa podjednostek oddziałujących z białkami opiekuńczymi FGL niż w przypadku podjednostek tworzących kompleksy z białkami FGS, których nić donorowa posiada motyw wiążący składający się jedynie z 3 hydrofobowych reszt oraz jednej reszty asparaginy, oznaczonych jako reszty P1-P4. Również β -nić A1 chaperonu FGL w pełniejszy sposób oddziałuje ze strukturą podjednostki niż ma to miejsce w kompleksach białko opiekuńcze FGS-podjednostka (Zavialov *et al.*, 2007).

Białko opiekuńcze	Rodzina	Rodzaj stuktury	Morfologia struktury adhezyjnej	Liczba podjednostek oddziałujących z białkiem opiekuńczym
PapD PrsD FimC SfaE FocC HifB FimB MrpD PmfC LpfB PefD AftB FasB	FGS	monoadhezyna	Sztywna, gruba pilia o średnicy 7-8 nm	5-7
F17D MrkB RalE	FGS	monoadhezyna	Cienka, giętka pilia o średnicy ok. 2-4 nm	2 (F17), 3 (Mrk), 4 (Ral)
FaeE FanE	FGS	poliadhezyna	Cienka, giętka pilia o średnicy ok. 2-4 nm	5
CssC (rodzina chaperonów typu SafD)	FGL	poliadhezyna	Struktury nietypowe	2
SefB (rodzina chaperonów typu SafD)	FGL	poliadhezyna	Długa, cienka fimbria o średnicy 2 nm	2
SafB (rodzina chaperonów typu SafD)	FGL	poliadhezyna	Morfologia niespecyficzna: amorficzna bądź kapsułko-podobna	2
Afa-8B AafD Agg-3D AggD DafaB Afa-3B	FGL	poliadhezyna	Cienkie, elastyczne włókno o średnicy 2 nm	1

DraB DaaB (rodzina chaperonów typu Caf1M)				
Caf1M PsaB MyfB NfaE CS3-E (rodzina chaperonów typu Caf1M)	FGL	poliadhezyna	Morfologia zróżnicowana: od cienkich, elastycznych włókien (fimbrie Psa) do postaci amorficznej bądź kapsułko-podobnej (antygen F1)	1

Tabela 3. Klasyfikacja białek opiekuńczych systemów biogenezy struktur adhezyjnych typu cheperone-usher (Zavialov *et al.*, 2007)



Rys. 7. Schemat oddziaływania białek opiekuńczych rodzin FGS i FGL z podjednostkami budulcowymi struktur adhezyjnych. Chaperony oznaczono kolorem niebieskim, ich β -nici A1 i G1 oznaczono kolorem fioletowym, podjednostki – kolorem czerwonym. W białku rodziny FGL (Caf1M) zaznaczono zakonserwowane reszty cysteiny biorące udział w tworzeniu mostka disiarczkowego. Uwydatniono również hydrofobowe reszty nici G1 oddziałujące z miejscami wiążącymi P5-P1 w podjednostkach (Zav'yalov *et al.*, 2010).

CHAPERONE	F1 →					G1 →							
	90	100	110	120	130	140	90	100	110	120	130	140	
Caf1M	DKESL	KWLCV	KGI	PK	DEDI	WVDDAT	NKQK	FNPKD	KG	VGF	VQFA	INNCIK	LLVLRP
Afa-8B	DRESL	QWLCV	KGI	PK	HDDR	WAEK	GADK	--	KKAD	KATL	QVNL	SVSS	CVKLFVRP
MyfB	DRESL	QWLCI	TGVP	PK	EGDV	WDNS	QHDK	--	NNMQ	DVNL	NTLL	SVGT	CMKLLVLRP
PsaB	DRETL	QWLCI	TGVP	PK	NGDA	WGNT	QNNP	----	KNSS	PMDI	QMSI	STCI	IKLLFRP
AafD	DRETL	QWLCV	KGI	PK	ANDR	WAEND	SKN	---	VLDN	KVAL	NTHL	SVTS	CIKLFVRP
Agg-3D	DRETL	QWLCV	KGI	PK	SDEK	WAES	SNK	----	SLNN	VTLN	VQV	SLST	CIKMFVRP
AggD	DRESL	QWLCV	KAI	PK	YEDK	WAKE	EVSG	---	KKSD	KATM	NTQV	SVSS	CIKLFVRP
DafaB	DRESL	QWLCV	KGI	PK	EDDR	WAEK	DGE	---	KKAD	KVSL	NVQL	SVSS	CIKLFVRP
Afa-3B	DRESL	QWLCV	KGI	PK	EGDR	WAEK	DGE	---	KKAD	KVSL	NVQL	SVSS	CIKLFVRP
DraB	DRESL	QWLCV	KGI	PK	EGDR	WAEK	DGE	---	KKAD	KVSL	NVQL	SVSS	CIKLFVRP
DaaB	DRESL	QWLCV	KGI	PK	EDDR	WAEK	DGE	---	KKAD	KVSL	NVQL	SVSS	CIKLFVRP
NfaE	DRESR	QWLCV	KGI	PK	EDDR	WAEK	DGE	---	KKAD	KVSL	NVQL	SVSS	CIKLFVRP
CS3-1	DRESL	KTL	CVR	GI	PK	QDDL	WANNE	-----	KEFV	GKLN	VSINT	CIKLI	LRP
<i>Pseudomonas</i>	DRESL	FWM	CVK	AV	PP	SDDD	DATTAP	-----	EKVS	LAIN	MAVNT	CEKLI	YRP
SafB S.tm.	DRETL	QWVC	IKAV	PP	ENEP	SDTQ	A	-----	KGAT	LDNL	SINAC	DKLI	FRP
SefB S.ent.	NEESL	YWLCV	KGV	PL	NDNE	SNNK	NN	-----	ITTN	LNVN	VVTNS	CIKLI	YRP
CssC1	SQESM	RWLCI	ESM	PP	TEK	STKIN	RK	-----	EGRT	DSIN	ISTR	GCIKLI	YQP
CssC2	SQESM	RWLCI	ESM	PP	TEK	STKIN	RK	-----	EGRT	DSIN	ISTR	GCIKLI	YRP
FasB	DQETI	YWVVS	NAI	PG	GEEV	KTEQ	ER	-----	GKIS	AKLS	LAYR	YKVP	MIYRP
CswB	DRETL	FWAV	SNSL	PG	VVPT	KLDN	KE	-----	GKIT	AKLS	LAYR	FKVP	LIYRP
FotB	HKETL	YWIV	SNSL	PG	GDKT	ELKSH	D	-----	DKIT	AKMN	LAYR	FKVP	MFYRP
F17aD	DRESL	FWLN	VLDI	PA	KPSF	AGKSE	K	-----	AQGY	NYLQ	FAVR	SRIK	FFFVRP
HafB	DRESL	FYFN	LLDI	PP	KDAE	FLA		-----	KHGS	FMQI	AIRS	SRLK	LFYRP
HifB	DRESL	FYFN	LLDI	PP	KDAE	FLA		-----	KHGS	FMQI	AIRS	SRLK	LFYRP
MrkB	DKETL	WLN	LLEI	PP	VEAS	QKNE		-----	GQNI	LQAI	RSR	FKFI	YRP
AcuD	DRESL	YWFN	LLDI	PP	EDS	ANKD		-----	KNIT	TFM	VRSR	IKLF	YRP
IpFB	DRESV	YWIN	VKAI	PA	KSEDA	EAA		-----	KNVL	QIAV	TRRL	IKLF	YRP
FimB/FhaD	DRESV	FWLN	VLEVP	PK	ATPE	EG		-----	HGVL	QIAT	IRS	SRLK	LFYRP
ACIAD0123	DFESQ	FWLN	LYEIP	PK	KKLQ	SNQK	P	-----	ETNH	QLDI	STQT	QLK	VFYRP
AtfB	DRESL	FWMN	VKAI	PS	LDEK	LAN		-----	ENTL	QIAI	QSRI	IKLF	YRP
FimC	DRESL	FWMN	VKAI	PS	MDK	SCLT		-----	ENTL	QIAI	ISRI	IKLY	YRP
FocC	DRESL	FWMN	VKAI	PA	MDK	AKTG		-----	ENYL	QFAI	VSRI	IKLY	YRP
SfaE	DRESL	FWMN	VKAI	PA	MDK	AKTG		-----	ENYL	QFAI	VSRI	IKLY	YRP
ACIAD0120	DRESV	FYLN	NFKQI	PA	L	EKNK	LD	-----	QNM	LVLV	KSR	IKV	FYRP
AfrC	DRESL	FWLN	VQEV	PP	KPKV	KDGE		-----	GSLA	LAMN	TRV	IKLI	YRP
PefD S. tm	DRESL	FWLN	VQEI	PP	KK	ASE		-----	GNVL	AVAV	NTK	VKLI	YRP
FanE	DRESI	FWLN	VQEI	PP	AP	KGD		-----	GGSL	SLAI	NNRV	IKLI	YRP
FaeE	DKESV	YWLN	LQDI	PP	ALE			-----	GSGI	AVAL	RLTK	IKLF	YRP
LdaE	DKESV	YWLN	LQDI	PP	ALE			-----	GSGI	AVAL	RLTK	IKLF	YRP
Rale	DKESV	YWLN	LQDI	PP	ALE			-----	GNGI	AVAL	RLTK	IKLF	YRP
MrpD	DRESV	FYFN	LREI	PP	RS	SNK		-----	PNVL	QIAL	QTRI	IKLF	YRP
MrfD	DRESL	FYFN	LREI	PP	RS	SKK		-----	PNTL	QIAL	QTRI	IKLF	YRP
PapD	DRESL	FYFN	LREI	PP	RS	SEK		-----	ANVL	QIAL	QTKI	IKLF	YRP
SfpD	DRESL	FYFSL	LREI	PP	KSD	K		-----	ANVL	QIAL	QTKI	IKLF	YRP
StfD	DRETL	FYFN	VREI	PP	QSD	K		-----	PNTL	QIAL	QTRI	IKV	FYRP
PmfD	DRESL	FYLN	VREI	PP	AP	KQ		-----	ANVL	QIAM	QSRI	IKLF	YRP

Rys. 8. Sekwencje kluczowe dla funkcjonowania białek opiekuńczych. Numeracja nadana została na podstawie sekwencji białka Caf1M. Kolorem żółtym oznaczono reszty cysteiny biorące udział w tworzeniu mostka spinającego pętlę F1-G1 w przypadku białek FGL. Kolorem zielonym oznaczono reszty zakonserwowane w obrębie całej rodziny białek opiekuńczych systemu CU. Reszty biorące udział w donorowaniu podjednostki oznaczono kolorem czerwonym. Kolorem turkusowym oznaczono reszty zakonserwowane dla białek Caf1M-podobnych (Zav'yalov *et al.*, 2010).

Inną istotną różnicą jest obecność w strukturze białek FGL mostka disiarczkowego łączącego dwie zakonserwowane reszty cysteiny, z których jedna znajduje się w nici F1, a

druga w nici G1. Wykazano, że wiązanie to jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania białek opiekuńczych FGL. Usunięcie mostka skutkuje zwiększeniem stałej dysocjacji kompleksu chaperone-podjednostka (Zav'yalov *et al.*, 1997; Piątek *et al.*, 2005). Mostek ten, spinający rejon β -nić F1-pętla- β -nić G1 na kształt „spinki do włosów” jest nieobecny w strukturze białek FGS (Zavialov *et al.*, 2003) (Rys. 8).

Wyraźne różnice można zaobserwować pomiędzy białkami podjednostkowymi fałdowanymi odpowiednio przez chaperony FGS i FGL. Różnice te szczególnie dotyczą kluczowej β -nici F podjednostek, która tworzy brzeg szczeliny akceptorowej biorący bezpośredni udział w interakcji z białkami opiekuńczymi. Wszystkie podjednostki oddziałujące z białkami FGS zawierają zakonserwowany C-końcowy motyw nazywany β -zamkiem (ang. *β -zipper*) (Rys. 9). Motyw ten znajduje się w obszarze ograniczonym przez przedostatnią resztę tyrozyny oraz zakonserwowaną resztę glicyny, znajdującą się w odległości 14 reszt od C-końca białka podjednostkowego. Pomędzy tymi granicami znajduje się rejon złożony z hydrofobowych reszt aminokwasowych (Hung *et al.*, 1996). W przypadku podjednostek wchodzących w interakcję z białkami FGL, motyw β -zamka wykazuje pewną zmienność. Większość tych podjednostek zawiera resztę tyrozyny w pozycji 3, hydrofobowe reszty w pozycjach 6 i 8, resztę tyrozyny w pozycji 12 oraz resztę glicyny w pozycji 14, reszt licząc od C-końca. Pomimo występujących w tym rejonie różnic, zaobserwowano, że białka opiekuńcze FGS są w stanie wiązać podjednostki pochodzące z systemów, w których w naturze rolę chaperona pełni białko FGL (Hung *et al.*, 1996).

A

20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Chaperone/Podjednostka
E	G	K	R	K	P	G	E	L	S	G	S	M	T	M	V	L	S	F	P	PapD/PapG
S	S	K	I	Q	P	G	V	L	S	G	S	A	T	L	L	M	I	L	P	PapD/PrsG
G	A	A	V	T	E	G	A	F	S	A	V	A	N	F	N	L	T	Y	Q	PapD/PapA
T	K	S	V	V	P	G	D	Y	E	A	T	A	T	F	E	L	T	Y	R	PapD/PapK
M	Q	N	L	I	A	G	P	F	S	A	T	A	T	L	V	A	S	Y	S	PapD/PapE
S	G	I	L	N	G	G	D	F	Q	T	T	A	S	M	S	M	I	Y	N	PapD/PapF
K	K	K	L	E	A	G	N	Y	F	A	V	L	G	F	R	V	D	Y	E	PapD/PapH
K	G	Q	V	T	P	G	N	I	S	S	V	I	T	V	T	Y	T	Y	A	SfaE/SfaS
T	G	K	S	T	P	G	I	A	N	A	D	A	T	F	K	V	Q	Y	Q	SfaE/SfaA
G	G	Q	V	T	A	G	N	V	Q	S	I	I	G	V	T	F	V	Y	Q	FimC/FimH
T	G	A	A	T	P	G	A	A	N	A	D	A	T	F	K	V	Q	Y	Q	FimC/FimA
N	G	G	Y	K	A	G	V	F	T	T	S	A	S	F	L	V	T	Y	M	FanE/FanC
G	E	G	I	N	P	G	T	V	N	G	I	S	T	F	T	F	S	Y	Q	F17C/F17G
T	G	V	A	T	A	G	D	V	T	S	T	Y	N	Y	T	I	A	Y	Q	F17C/F17A
Q	A	V	T	T	S	T	Q	W	S	A	P	L	N	V	A	I	T	Y	Y	FaeE/FaeG
A	P	T	T	S	T	G	E	V	E	S	H	L	V	F	N	L	T	Y	D	MrkB/MrkD
P	T	T	V	T	T	G	V	V	N	S	Y	A	T	Y	E	I	T	Y	Q	MrkB/MrkA
T	N	K	A	T	A	G	K	V	Q	S	S	V	D	F	Q	I	A	Y	E	HifB/M43
N	G	D	V	E	A	S	A	I	T	T	Y	V	G	F	S	V	V	Y	P	FimB/Fim2
K	E	D	V	D	A	A	Q	I	T	S	Y	V	G	F	S	V	V	Y	P	FimB/Fim3
K	G	G	A	T	E	G	D	F	K	S	V	A	S	F	A	V	A	Y	K	PefD/PefA
N	P	V	V	S	T	T	Q	W	S	A	P	L	N	V	A	V	T	Y	N	ClpE/ClpG
S	E	A	A	V	P	G	D	F	T	A	I	A	T	F	A	L	T	Y	Q	MrpD/MrpA
N	D	T	P	K	A	G	N	Y	R	T	T	L	R	F	K	L	E	Y	Y	MrpD/MrpB
R	E	T	L	V	G	G	D	F	V	A	N	A	T	L	H	V	D	Y	Q	MrpD/MrpE
G	S	T	L	P	E	G	A	F	E	V	S	A	T	L	L	A	E	Y	Q	MrpD/MrpF
Y	L	P	V	K	A	G	N	V	D	A	V	I	N	F	V	L	D	Y	Q	FocC/FocF
K	G	N	A	G	A	G	S	I	N	S	Q	I	T	V	T	Y	T	Y	A	FocC/FocG
Q	A	S	P	T	P	G	A	V	Q	S	V	I	N	V	T	F	S	Y	N	FocC/FocH
D	A	K	V	T	P	G	E	F	Q	A	V	I	N	F	Q	V	D	Y	Q	PmfD/PmfA
G	S	K	I	T	E	G	E	F	S	A	H	A	T	L	I	A	E	F	M	PmfD/PmfE
N	Q	T	I	L	T	G	P	F	Q	A	Q	A	T	Y	T	L	N	Y	Q	PmfD/PmfF
K	D	T	V	T	T	G	Y	G	N	A	E	V	D	F	N	L	S	Y	E	LpfB/LpfA
K	P	D	A	T	V	G	T	A	N	A	T	V	N	F	S	V	T	Y	E	LpfB/LpfE

B

20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Chaperone/Podjednostka
N	Q	H	L	V	S	G	N	T	R	A	N	I	T	I	T	S	T	I	K	CS3-1/CS3-3
G	G	K	L	A	A	G	K	Y	T	D	A	V	T	V	T	V	S	N	Q	CAF1M/F1
K	S	T	L	P	A	G	T	T	T	A	T	F	Y	V	Q	Q	Y	Q	N	SefB/SefA
G	T	V	L	K	P	T	E	Y	K	F	T	G	R	V	E	E	Y	V	F	PsaB/PsaA
G	D	E	V	K	A	G	E	Y	Q	F	T	G	R	V	E	E	Y	V	E	MyfB/MyfA
S	A	T	A	P	A	D	V	Y	T	V	D	L	M	A	A	V	Y	V	N	NfaE/NfaA
D	K	E	I	P	P	G	I	Y	N	D	Q	V	M	V	G	Y	Y	V	N	CssC/CssA
N	S	G	Y	S	S	G	T	Y	A	G	H	L	T	V	S	F	Y	S	N	CssC/CssB
Q	T	N	T	P	P	G	N	Y	T	L	T	L	T	G	G	Y	W	A	K	AfaB/AfaE
I	Q	V	L	I	P	G	E	Y	R	M	I	L	H	A	G	I	N	F		AggD/AggA

Rys. 9. Motyw β -zamka podjednostek włączanych w strukturę adhezyjną przy udziale białek opiekuńczych FGS (A) oraz zmienność tego motywu u podjednostek włączanych za pomocą białek FGL (B). Reszty aminokwasowe numerowane są od C-końca. Kolorem żółtym oznaczono zakonserwowane reszty hydrofobowe, kolorem pomarańczowym – zakonserwowaną resztę glicyny w pozycji 14 od C-końca wyznaczającą koniec motywu (Hung *et al.*, 1996).

Podstawowym zadaniem białek opiekuńczych jest uzupełnianie defektywnej struktury podjednostek, jednak mogą one występować również w formie niezwiązanej. W takiej

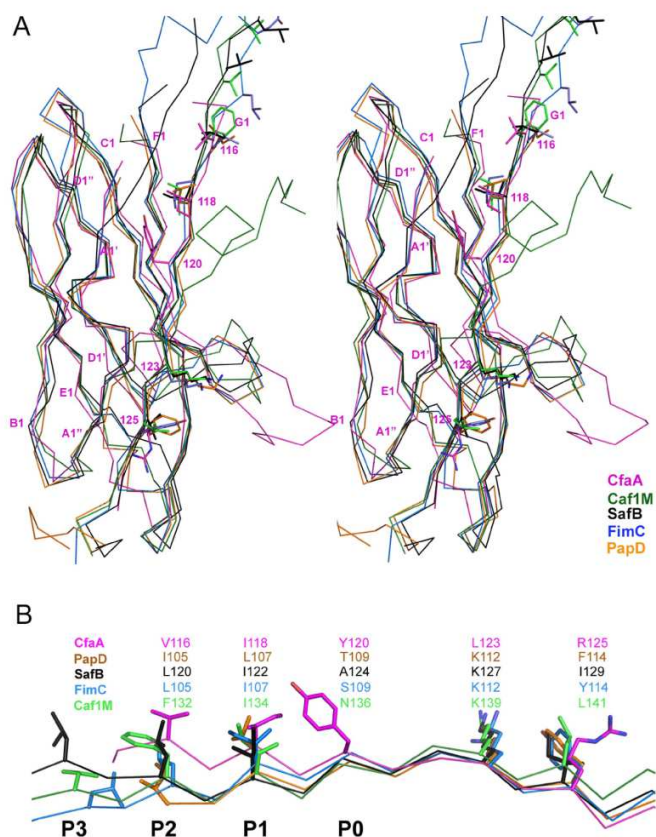
sytuacji powierzchni aktywne odpowiedzialne za oddziaływania z podjednostkami (np. hydrofobowa nić donorowa G1) muszą być chronione przed proteolizą i niespecyficznym wiązaniem. Dlatego też cząsteczki niektórych białek opiekuńczych w roztworze przejściowo oddziałują ze sobą tworząc dimery bądź tetramery, w których powierzchnie te ukryte są wewnątrz struktury. Na przykładzie chaperonu PapD (rodzina FGS) udowodniono, że dimer taki tworzy się poprzez wytworzenie wiązań pomiędzy tymi samymi powierzchniami, które są wykorzystywane do tworzenia kompleksów z podjednostką (Hung *et al.*, 1999). Przedstawiciel rodziny FGL, chaperone Caf1M przyjmuje formę tetrameryczną, w której wszystkie cząsteczki poprzez jednoczesne, wspólne osłanianie sekwencji aktywnych w niciach A1 i G1 tworzą ośmioniciową strukturę „heterokanapki” z hydrofobowym, bogatym w reszty fenyloalaniny rdzeniem o wysokim stopniu upakowania (Zavialov i Knight, 2007). Strategia ochrony wrażliwych na proteolizę miejsc przez oligomeryzację nie jest jednak wspólna dla wszystkich białek opiekuńczych – jest to raczej kwestia konkretnego przypadku. Chaperone FaeE w formie niezwiązanej występuje w postaci stabilnego monomeru (Van Molle *et al.*, 2009).

2.3.5 Białka opiekuńcze FGA

Istnieje oddzielna, składająca się z 8 przedstawicieli rodzina struktur adhezyjnych, obserwowanych u enterotoksycznych szczepów *E. coli*, oznaczona jako fimbrie klasy 5. Najlepiej poznanym przykładem tej rodziny są fimbrie CS1. Budowane są one z podjednostek CooB i CooD, a rolę białka opiekuńczego tworzącego z nimi kompleksy pełni CooA. CooB stanowi główny składnik budulcowy pili, natomiast CooD funkcjonuje jako pojedyncza podjednostka szczytowa i jest niezbędne zarówno do inicjacji procesu polimeryzacji pili, jak i do adherencji do komórek gospodarza. Czwartym elementem systemu jest białko CooC, przez które prawdopodobnie zachodzi sekrecja pili na powierzchnię komórki bakteryjnej, a więc o funkcji ushera. Pomimo podobieństwa do elementów biorących udział w biogenezie struktur powstających na drodze klasycznego systemu chaperone-usher, składniki mechanizmu biogenezy pili CS1 i innych jej podobnych nie wykazują żadnej istotnej zbieżności sekwencyjnej, co prowadzi do wniosku, iż ten mechanizm najprawdopodobniej powstał na drodze zbieżnej ewolucji (Galkin *et al.*, 2013).

Badania prowadzone na innym przedstawicielu tej rodziny, fimbriach CFA/I oraz odpowiedniego dla nich białka opiekuńczego – CfaA – doprowadziły do wyróżnienia nowej klasy chaperonów, które nie przynależą ani do grupy FGL ani do FGS. Tę nową grupę oznaczono zatem jako FGA (ang. *F1-G1 alternate*) (Bao *et al.*, 2014). Fimbrie CFA występują w postaci polimeru zawierającego ponad 1000 kopii głównej podjednostki CfaB oraz szczytową adhezynę CfaE. Nici donorowa głównej podjednostki wykazuje charakterystyczny motyw reszt hydrofobowych. Dopasowuje się on precyzyjnie do zagłębień w rdzeń nici podjednostki w obrębie szczeliny akceptorowej. Dwie wysoko zakonserwowane reszty Glu2 i Lys3 na początku nici donorowej oddziałują z wykazującymi podobny stopień zakonserwowania resztami Lys61 i Asp16 na brzegach szczeliny (Li *et al.*, 2009).

Chaperone CfaA wykazuje topologię zbliżoną do innych białek opiekuńczych systemu CU, o kształcie bumeranga. Każda z domen to siedmioniciowa β -beczka o strukturze immunoglobulinowej. CfaA wykazuje cechy pośrednie pomiędzy białkami FGL i FGS. Zaobserwować można dwie właściwości, upodabniające go do białek FGL. Pierwsza z nich to pętla F1-G1 o średniej długości 20 reszt aminokwasowych, druga natomiast to motyw wiążący podjednostkę. W przypadku białek z grup FGS i FGL motyw ten, składający się z naprzemiennie leżących reszt hydrofobowych i hydrofilowych o długości odpowiednio trzech i pięciu reszt hydrofobowych oznaczony jest jako miejsca P5-P1. Ten charakterystyczny motyw u chaperonów z grupy FGA składa się z czterech reszt hydrofobowych, a dodatkowo jest on jednak przesunięty w stronę C-końca o dwie reszty w porównaniu zarówno do białek FGL jak i FGS (Rys. 10B), dlatego dla białek FGA oznacza się miejsca P3-P0.



Rys. 10. Porównanie struktur białek opiekuńczych należących do różnych grup. A – para stereoskopowa obrazująca nałożenie struktur N-terminalnych domen białek opiekuńczych. Oznaczone zostały wszystkie β -nici. Reszty aminokwasowe nici G1 oddziałujące z podjednostkami wyróżniono i ponumerowano. B – nałożenie struktur nici donorowych białek FGL, FGS i FGA z zaznaczeniem reszt hydrofobowych w pozycji P0 (jedynie dla CfaA), P1, P2 i P3 (Bao *et al.*, 2014).

Co istotne, zaobserwować można również dwie cechy wspólne dla grup FGS i FGA, z których jedną jest brak N-końcowego przedłużenia przed nicią A1 istotnego dla wiązania podjednostki, a drugą brak mostka disiarczkowego łączącego pętlę F1-G1 w przypadku białek FGL.

Poza wymienionymi właściwościami łączącymi białka opiekuńcze FGA z dwoma pozostałymi grupami, opisano również szereg cech, które bezspornie różnicują je od nich. W obrębie nici D1 obecny jest wtręt (D1') bogaty w reszty kwasowe połączone kilkoma mostkami solnymi z przyległymi resztami zasadowymi, natomiast w obrębie pętli C2-D2' występuje wtręt stabilizowany unikalnym mostkiem disiarczkowym. Pomiędzy domenami

białek FGA znajduje się łącznik o długości zdecydowanie mniejszej niż występujący zarówno w białkach FGL jak i FGS. Nie obserwuje się wyraźnego odpowiednika niezbędnej do wychwytywania podjednostek N-terminalnej reszty zasadowej zakonserwowanej tak u białek FGL (np. Arg20 w strukturze Caf1M) jak i FGS (np. Arg8 w strukturze PapD). Potencjalnie zdolna do oddziaływań reszta Lys9 posiada wystający łańcuch boczny utrudniający kontakt ze związaną podjednostką. Dodatkowo, w przypadku dwóch przedstawicieli grupy FGA nieobecna jest reszta lizyny będąca częścią kotwicy argininowo-lizynowej. Prawdopodobnie jej funkcję przejmuje w tych przypadkach reszta argininy 154 nieobecna w białkach FGL i FGS (Bao *et al.*, 2014). Cechy odróżniające białka opiekuńcze należące do trzech grup zestawiono w tabeli 4.

Cecha charakterystyczna	Chaperony FGL	Chaperony FGS	Chaperony FGA
Średnia długość pętli F1-G1	24	13	20
Ilość reszt hydrofobowych w nici donorowej	4	3	4
N-końcowe przedłużenie przed nicią A (12-14 reszt)	Tak	Nie	Nie
Mostek disiarczkowy łączący nici F1 i G1	Tak	Nie	Nie
Wtręt D1'	Nie	Nie	Tak
Wtręt C2-D2'	Nie	Nie	Tak
Mostek disiarczkowy w obrębie pętli C2-D2'	Nie	Nie	Tak
Długość łącznika pomiędzy domenami	14	14	7
Reszta biorąca udział w kotwiczeniu podjednostki	Arg20 (Caf1M)	Arg8 (PapD)	Arg154 (CfaA)

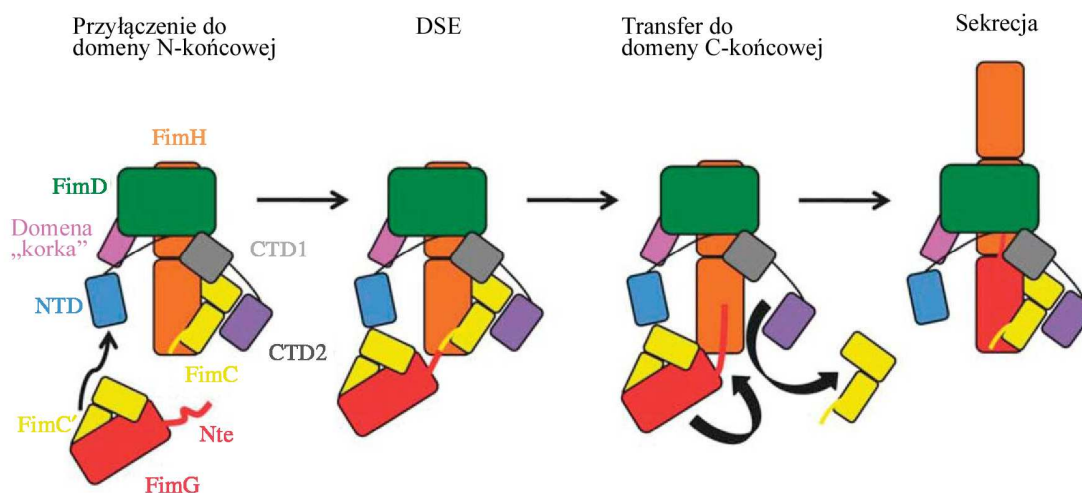
Tabela 4. Cechy wyróżniające oraz łączące poszczególne grupy białek opiekuńczych (Bao *et al.*, 2014)

2.3.6 Białka usher – struktura i działanie, reakcja DSE

Białka kanałotwórcze usher zlokalizowane są w obrębie błony zewnętrznej i mają wielkość ok. 800 reszt aminokwasowych. Każde z nich posiada cztery funkcjonalne domeny: dwie domeny periplazmatyczne na N- i C-końcu (o wielkości odpowiednio około 125 i 170 reszt aminokwasowych), których funkcją jest wychwytywanie kompleksów chaperone-podjednostka, dużą centralną domenę stanowiącą kanał translokacyjny (około 500 reszt) oraz domenę „korkową” (około 110 reszt aminokwasowych). Jako pierwszą udało się zbadać

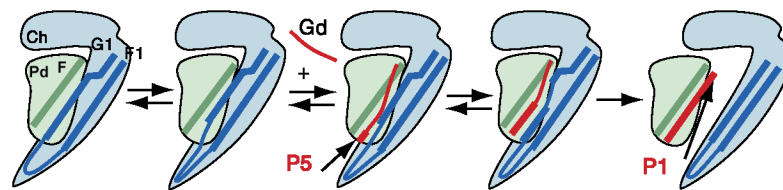
dokładnie część ushera PapC obejmującą reszty 130-640, w których zawarta była domena kanału wraz z domeną „korka”. Fragment ten ma strukturę składającą się z 24 nici β -beczki o nerkwatym kształcie i wysokości 45 Å oraz wymiarach zewnętrznym 65 x 45 Å i wewnętrznym 45 x 25 Å (Remaut *et al.*, 2008). Domena „korka” znajduje się w prześwicie kanału translokacyjnego i poprzez zamknięcie go zapobiega wyciekaniu białek periplazmatycznych (gdy usher znajduje się w stanie nieaktywnym). W stanie aktywowanym (po przyłączeniu kompleksu białko opiekuńcze-podjednostka), domena ta „otwiera” kanał przemieszczając się do przestrzeni periplazmatycznej obok domeny N-terminalnej, co ma miejsce równocześnie ze zmianą kształtu domeny translokacyjnej do bliskiej okręgu o średnicy 32 Å. Zostało to zbadane na przykładzie ushera FimD związanego z kompleksem FimC-FimH (Phan *et al.*, 2011).

Cykl włączania podjednostek w obręb struktury adhezyjnej opisano na podstawie biogenezy pili P i pili typu 1 (Rys. 11). Główną zasadą tego cyklu jest fakt, iż domeny periplazmatyczne ushera uczestniczą w „podawaniu” kolejnych podjednostek do powstającej w obrębie kanału ushera pili. Domena N-terminalna posiada specyficzne miejsce wiązania kompleksu chaperone-podjednostka – nie rozpoznaje białek opiekuńczych ani podjednostek w stanie wolnym. Składa się ona z N-końcowego elastycznego segmentu (24 reszty aminokwasowe w przypadku FimD), ustrukturyzowanego rdzenia oraz C-końcowego fragmentu zawiasowego. W czasie interakcji z kompleksem binarnym N-terminalny fragment domeny, nieustrukturyzowany w nieaktywnym białku kanałotwórczym, uczestniczy w oddziaływaniach zarówno z białkiem opiekuńczym jak i podjednostką odpowiadając za 60% kontaktów domeny N-terminalnej ushera z kompleksem chaperone-podjednostka (Nishiyama *et al.*, 2005; Zav’yalovet *et al.*, 2010). Domena N-terminalna ushera wychwytuje kompleksy i ustawia je w odpowiedniej orientacji do reakcji DSE (Rys. 11, panel pierwszy), a następnie podaje je do domeny C-terminalnej ushera. W tym miejscu dochodzi do inicjacji reakcji DSE: następuje wymiana nici donorowych i włączenie w rosnącą fimbrię podjednostki pozostającej do tej pory w unieruchomionym przez C-końcową domenę ushera kompleksie z białkiem opiekuńczym. Chaperone zostaje uwolniony (Rys. 11, panel trzeci). Zwolnione przez poprzednią podjednostkę miejsce przy domenie C-terminalnej zostaje następnie zajęte przez kolejny kompleks podany przez domenę N-terminalną, po czym cykl się powtarza (Phan *et al.*, 2011).



Rys. 11. Model cyklu przyłączania kompleksu chaperone-podjednostka do białka usher na przykładzie białek FimD (usher), FimC (białko opiekuńcze) oraz FimG i FimH (podjednostki). NTD – domena N-terminalna białka usher, CTD1, CTD2 – domeny C-terminalne białka usher (Busch i Waksman, 2012).

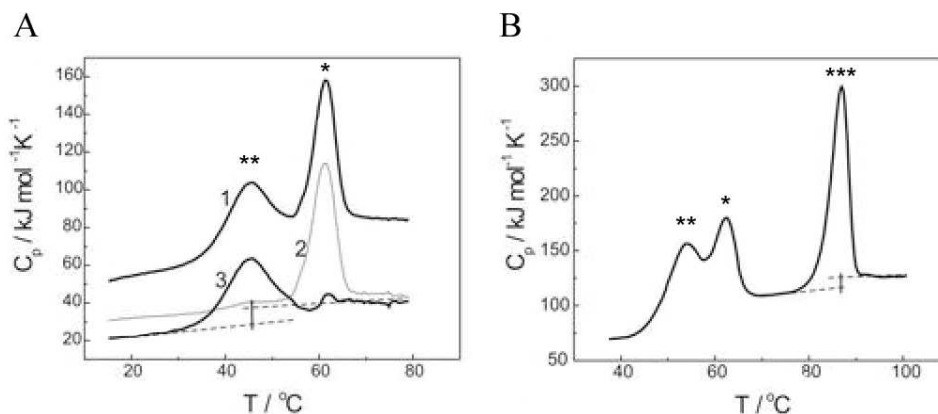
Jak już wspomniano, proces polimeryzacji podjednostek do postaci fimbrii zachodzi podczas następujących po sobie etapach wymiany nici donorowej G1 chaperonu na N-terminalną nić kolejnej podjednostki w obrębie szczeliny akceptorowej podjednostki poprzedniej. Reakcja DSE przebiega według modelu „zip-in-zip-out”. Zbadano go na przykładzie przejściowego kompleksu potrójnego białko opiekuńcze-podjednostka-peptyd imitujący nić Gd (Remaut *et al.*, 2006). Dla procesu wymiany nici donorowej chaperonu na peptyd kluczowe są reakcje zachodzące w kieszeni P5 podjednostki – jest to miejsce, w którym następuje „werbowanie” nici donorowej następnej podjednostki, tzn jest ono wypełniane jako pierwsze. Odłączanie nici G1 następuje kolejno reszta aminokwasowa po reszcie (w kierunku od P4 do P1) i jednocześnie ma miejsce przyłączanie kolejnych reszt nici podjednostkowej (od kieszeni P5 do P2) (Rose *et al.*, 2008). Ostatecznie więc w kompleksie białko opiekuńcze-podjednostka kieszenie P1-P4 w szczelinie akceptorowej są zajęte przez odpowiednie reszty nici G1, natomiast po wymianie nici, reszty N-końcowej nici kolejnej podjednostki zajmują kieszenie P2-P5 (Rys. 12).



Rys. 12. Schemat procesu wymiany nici donorowych. Białko opiekuńcze (Ch) oznaczono kolorem jasnoniebieskim a podjednostkę (Pd) kolorem jasnozielonym. Nici G1 i F1 białka opiekuńczego zaznaczono grubymi niebieskimi liniami, natomiast nić F podjednostki – grubą zieloną linią. Nić donorowa Gd kolejnej podjednostki (czerwona linia) tworzy z białkiem opiekuńczym i podjednostką przejściowy kompleks potrójny w obrębie kieszeni P5 (Zav’yalov *et al.*, 2010).

2.3.7 Energetyka reakcji DSC i DSE

Energetyka tworzenia kompleksów binarnych chaperone-podjednostka została zbadana poprzez analizę kalorymetryczną DSC na przykładzie kompleksu Caf1M-Caf1 (Caf1M – białko opiekuńcze obecne w systemie chaperone-usher *Yersinia pestis*, Caf1 – podjednostka) (Zavialov *et al.*, 2005) (Rys. 13A). W czasie ogrzewania próbki zawierającej oczyszczone kompleksy zauważalne są zawsze dwa maksima przy różnych wartościach temperatury. Drugie, odpowiadające wyższej temperaturze topnienia, reprezentuje denaturację samego białka opiekuńczego. Pierwsze natomiast, spowodowane jest dysocjacją kompleksu oraz jednoczesną denaturacją podjednostki i może być częściowo przysłonięte przez denaturację białka opiekuńczego. Uwidocznienie całego piku jest możliwe poprzez odjęcie krzywej uzyskanej dla samego białka opiekuńczego od krzywej dla kompleksu.



Rys. 13. A - pomiary mikrokalorymetryczne DSC podjednostki Caf1 w kompleksie z białkiem opiekuńczym; 1 – krzywe dla kompleksu Caf1M-Caf1 przy stężeniu 3 mg/ml, 2 – krzywa dla samego białka opiekuńczego Caf1M (stężenie 2,5 mg/ml), 3 – krzywa różnicowa będąca wynikiem odejmowania krzywych 1 i 2. B – pomiary mikrokalorymetryczne DSC dla minimalnego włókna Caf1M-Caf1'-Caf1'' (stężenie 2,2 mg/ml). * - denaturacja Caf1M, ** - rozpad kompleksu Caf1M-podjednostka (w przypadku krzywej B – podjednostka ze szczeliną uzupełnioną przez nić G1 Caf1M) i równoczesna denaturacja podjednostki, *** - denaturacja podjednostki ze szczeliną uzupełnioną przez nić Gd (Zavialov *et al.*, 2005).

Rysunek 13B przedstawia proces denaturacji tzw. minimalnego włókna (ang. *minimal fiber*) składającego się z trzeciorzędowego kompleksu białko opiekuńcze-podjednostka związana z chaperonem-podjednostka w ostatecznej konformacji, identycznej jak w finalnym polimerze (Caf1M-Caf1'-Caf1''). W takim kompleksie obie podjednostki posiadają uzupełnioną szczelinę hydrofobową, jednak występują różnice konformacyjne pomiędzy nimi. W kompleksie chaperone-podjednostka nić G1 białka opiekuńczego biegnąc wzdłuż szczeliny odchyła się od jej środka, ciągnąc za sobą równoległą do niej nić F i tym samym oddalając ją od nici A, znajdującej się po drugiej stronie szczeliny. Taki „klin” powoduje, że znajdujące się wewnątrz szczeliny reszty hydrofobowe nie mogą ulec optymalnemu upakowaniu (Sauer *et al.*, 2002). Następuje utworzenie tzw. superbeczki składającej się z powierzchni współtworzonej przez podjednostkę i białko opiekuńcze oraz wspólnego hydrofobowego rdzenia. W obrębie superbeczki, hydrofobowe reszty z nici donorowej G1 chaperonu znajdują się w obrębie szczeliny akceptorowej, pomiędzy dwoma kartkami podjednostkowej β -kanapki, ograniczając ich kontakt ze sobą, przez co strukturę podjednostki związaną do białka opiekuńczego określa się mianem „otwartej” (Zavialov *et*

al., 2005). W wyniku reakcji DSE równoległe ułożenie nici G1 zostaje zastąpione antyrównoległym ułożeniem nici Gd w stosunku do β -nici F, efektem czego jest idealna struktura Ig. W odróżnieniu od otwartej struktury uzupełnianej przez nią G1 chaperonu, podjednostka oddziałująca z nicią donorową Gd drugiej podjednostki posiada strukturę określaną mianem „zamkniętej” bądź „skondensowanej”. Usunięcie nici białka opiekuńczego pozwala na ciaśniejsze upakowanie reszt hydrofobowych i domknięcie szczeliny. Znajdująca się w tym czasie wewnątrz szczeliny nić donorowa drugiej podjednostki zostaje jednocześnie unieruchomiona. Taka uporządkowana struktura jest zatem bardziej odporna na dysocjację. Białko opiekuńcze niejako napędza zatem powstawanie struktury adhezyjnej poprzez stabilizowanie podjednostek w stanie wykazującym niski stopień upakowania rdzenia (Zavialov *et al.*, 2003).

Z wyżej opisanych zmian w obrębie szczeliny hydrofobowej podczas reakcji DSE wynika dlaczego proces denaturacji termicznej minimalnego włókna ujawnia obecność pików w obszarze wysokich temperatur (87,5°C) (Rys. 15B). Tak wysoka temperatura jest skutkiem obecności wysokostabilnej, kooperatywnej struktury podjednostki Caf1" ze szczeliną hydrofobową uzupełnioną nicią Gd, o zamkniętej, upakowanej strukturze. W porównaniu do procesu zachodzącego w przypadku kompleksu binarnego, dysocjacja białka opiekuńczego oraz denaturacja podjednostki Caf1' związanych w kompleks trzeciorzędowy zachodzi w wyższych temperaturach, co świadczy o zdecydowanie wyższej stabilności podjednostki w takiej konfiguracji (Zavialov *et al.*, 2005).

Wymiana nici G1 na Gd uwalnia energię z podjednostki podczas przejścia z luźnej konformacji do ciasno upakowanej klasycznej struktury Ig. Wysoka stabilność całej struktury adhezyjnej wynika z trwałości tworzonych połączeń pomiędzy podjednostkami (Sauer *et al.*, 2004). Proces ten jest podstawą praktycznie nieskończonej stabilności kinetycznej kompleksów podjednostka-podjednostka, a w konsekwencji całej struktury adhezyjnej: czas połowicznego rozpadu kompleksu podjednostka FimG-peptyd donorowy podjednostki FimF pili typu 1 wynosi 3×10^9 lat. Ma to funkcjonalne uzasadnienie – skutkuje nieodwracalnością procesu składania pili i zapewnia brak możliwości jej spontanicznej dysocjacji w warunkach fizjologicznych, a więc zapewnia integralność struktury (Puorger *et al.*, 2008).

Prostszym modelem, na którym można badać proces polimeryzacji fimbrii są konstrukty samokomplementujących podjednostek, np. Caf1-sc (ang. *self-complemented Caf1*). Podjednostki takie, będące białkami rekombinantowymi posiadają na swoim C-końcu peptyd fuzyjny w postaci sekwencji nici donorowej Gd. Pozwala to na wnikięcie takiej sztucznej nici do szczeliny akceptorowej i osiągnięcie przez podjednostkę klasycznej struktury immunoglobulinowej.

Pomiędzy podjednostkami związanymi z białkiem opiekuńczym a podjednostkami w stanie wolnym oraz podjednostkami samokomplementującymi zauważyć można wyraźne różnice pod względem termodynamicznym, co jest zrozumiałe z uwagi na pełnione przez nie role. Podjednostki w stanie wolnym wykazują niekompletną strukturę, a ich rdzeń hydrofobowy jest narażony na kontakt z rozpuszczalnikiem. Stabilność takich cząstek będzie zatem niewielka – np. dla wolnej podjednostki Caf1 $\Delta G_{25} = 8-10$ kJ/mol (Zavialov *et al.*, 2005), dla podjednostki FimH $\Delta G_{25} = 9,5$ kJ/mol, dla FimG $\Delta G_{25} = 10,9$ kJ/mol (Vetsch *et al.*, 2002; Puorger *et al.*, 2008). Kompleksy chaperone-podjednostka uznać można natomiast za pośredni etap na drodze do powstania fimbrii, w związku z czym stabilność związanych w ten sposób podjednostek nie powinna przewyższać stabilności podjednostek stanowiących odpowiednik części składowej finalnej fimbrii. Temperatura rozpadu kompleksu binarnego i denaturacji podjednostki Caf1 wynosi 45°C , a $\Delta G_{25} = 15,8$ kJ/mol (Zavialov *et al.*, 2005), a kompleks chaperone-podjednostka FaeG ulega rozpadowi w temperaturze ok. $50-56^{\circ}\text{C}$ (Van Molle *et al.*, 2009). W przypadku Caf1-sc, będącej odpowiednikiem ostatecznej struktury stanowiącej fragment fimbrii, temperatura topnienia wynosi $85,5^{\circ}\text{C}$, a $\Delta G_{37} = 70-80$ kJ/mol (Zavialov *et al.*, 2005). Podobne wartości otrzymano dla podjednostki szczytowej FimG-sc ($T_m = 83,4^{\circ}\text{C}$, $\Delta G_{25} = 79,7 \pm 2,2$ kJ/mol), dla podjednostki FimH-sc ($\Delta G_{25} = 67 \pm 2,5$ kJ/mol) (Puorger *et al.*, 2008), dla AfaE-sc ($\Delta G_{25} = 45$ kJ/mol) (Cota *et al.*, 2009).

Powstawanie kompleksu chaperone-podjednostka nie tylko niweluje niekorzystny defekt strukturalny podjednostek, ale również w znaczący sposób przyspiesza reakcję ich fałdowania. W przypadku podjednostki FimA będącej składową pili typu 1, katalityczne działanie białka opiekuńczego FimC w porównaniu do reakcji przebiegającej bez jego udziału określono jako przyspieszające ją około 400 razy (Puorger *et al.*, 2011).

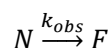
2.3.8 Mostek disiarczkowy podjednostek

Podjednostki części układów adhezyjnych typu chaperone-usher posiadają dwie zakonserwowane reszty cysteiny, biorące udział w formowaniu mostka disiarczkowego zlokalizowanego pomiędzy β -nićmi A i B. Obecność tego mostka jest wynikiem działania periplazmatycznych oksydoreduktaz disiarczkowych takich jak DsbA. Tworzenie mostków jest niezbędnym etapem biogenezy fimbrii – delecja genu kodującego DsbA u *E. coli* uniemożliwia tworzenie pili typu 1 (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994). Etap ten jest kluczowy dla wiązania podjednostek przez białka opiekuńcze i tworzenia kompleksów binarnych. Białka podjednostkowe FimA w stanie zdenaturowanym i o zredukowanym mostku disiarczkowym nie są rozpoznawane przez chaperone FimC. Identyczną zależność potwierdzono dla podjednostki FimG oraz domeny pilinowej FimH. Jedynie zapewnienie warunków do powtórnego utworzenia wiązań S-S (np. przez dodanie DsbA) pozwala na kontynuowanie procesu biogenezy struktury adhezyjnej (Crespo *et al.*, 2012).

Usunięcie mostka disiarczkowego ze struktury podjednostki układu chaperone-usher skutkuje również utratą stabilności kinetycznej białka. Białka stabilne kinetycznie w naturalnych warunkach charakteryzują się niewielkim udziałem częściowo niesfałdowanych struktur, podatnych na proteolizę. Białka takie są również odporne na denaturację chemiczną. Fakt ten wykorzystuje się w analizowaniu stabilności kinetycznej białek poprzez pomiar wytrzymałości natywnej struktury białka na działanie SDS podczas elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (Manning *et al.*, 2004). Metoda ta opiera się na porównaniu migracji w żelu próbek w buforze Laemmli (zawierającym SDS) poddanych działaniu wysokiej temperatury oraz identycznych próbek inkubowanych w temperaturze pokojowej. Białka wykazujące to samo tempo migracji dla obu próbek są nieodporne na działanie SDS, a więc nie są stabilne kinetycznie. Dla białek stabilnych kinetycznie obserwuje się zróżnicowanie w szybkości migracji: próbki inkubowane w temperaturze pokojowej wykazują opóźnienie migracji w stosunku do próbek poddanych działaniu wysokiej temperatury. Białko zdenaturowane charakteryzuje się nieuporządkowaną strukturą, dlatego też duża liczba cząsteczek SDS przyłącza się do niego nadając mu duży ładunek ujemny. Ilość cząsteczek SDS mogąca związać się do białka o strukturze natywnej jest dużo mniejsza, a więc uzyskuje ono mniejszy ujemny ładunek i w konsekwencji charakteryzuje się opóźnieniem migracji w żelu. Samokomplementująca podjednostka

fimbrii Dr, DraE-sc wykazuje wysoką odporność na denaturację przy pomocy SDS – opóźnienie migracji obserwuje się nawet po 10-minutowej inkubacji w 70°C. Usunięcie mostka disiarczkowego ze struktury tej podjednostki prowadzi do całkowitej utraty odporności na denaturację chemiczną: próbka DraE-sc-ΔSS po inkubacji w buforze Laemmli migruje z taką samą szybkością jak próbka tego białka gotowana przez 10 minut (Piątek *et al.*, 2010).

Porównanie białek DraE-sc i DraE-sc-ΔSS za pomocą analizy mikrokalorymetrycznej DSC pozwala również na obserwację różnic w mechanizmach ich denaturacji oraz parametrach definiujących ich stabilność kinetyczną i termodynamiczną. Denaturacja białka DraE-sc opisywana jest przez zredukowany dwustanowy model Lumry-Eyring (Sanchez-Ruiz, 1992):



Białko pozbawione mostka disiarczkowego denaturuje natomiast odwracalnie i równowagowo w temperaturze niższej o ponad 20°C niż białko natywne. Odwracalność procesu denaturacji umożliwia wyliczenie wartości energii swobodnej tej reakcji w temperaturze 25°C (ΔG_{25}). Dla podjednostki DraE-sc bez mostka disiarczkowego wartość ta wynosi 30 kJ/mol (Piątek *et al.*, 2010) i jest niższa niż wartości obserwowane dla podobnych samo komplementujących konstruktów natywnych podjednostek, dla których ΔG_{25} mieści się w przedziale 50-80 kJ/mol (Zavialov *et al.*, 2005; Puorger *et al.*, 2008). Mostek disiarczkowy podjednostek układu chaperone-usher jest zatem elementem stabilizującym ich strukturę, którego wpływ można oszacować na ok. 40-50 kJ/mol (Piątek *et al.*, 2010).

2.4 Adhezyny rodziny Dr

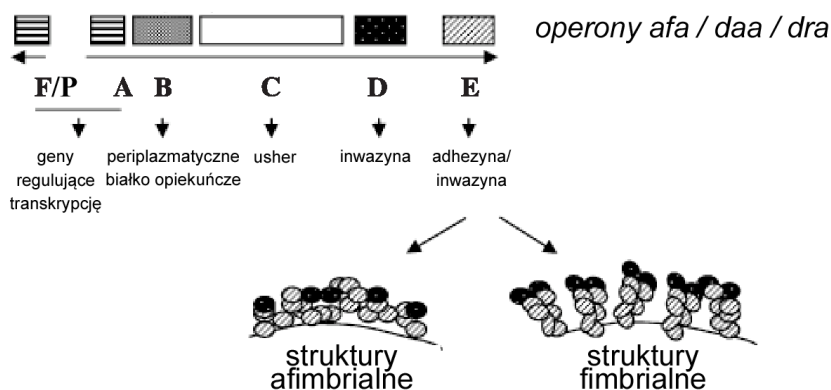
Rodzina adhezyn Dr obejmuje struktury fimbrialne i afimbrialne, odpowiedzialne przede wszystkim za infekcje dróg moczowych oraz biegunki (Tabela 5). Rodzina ta jest trzecią najczęściej występującą grupą czynników kolonizacyjnych uropatogennych szczepów *E. coli* (Nowicki *et al.*, 2001).

Struktura	Typ struktury	Adhezyna	Jednostka chorobowa	Gospodarz	Receptor	PDB adhezyny
Dr	fimbrialna	DraE	Odmiedniczkowe zapalenie nerek, zapalenie pęcherza	ludzki	DAF, kolagen typu IV, CEACAM1, CEA, CEACAM6	1UT1
F1845	fimbrialna	DaaE	Biegunka	ludzki	DAF, CEACAM1, CEA, CEACAM6	2BCM
Afa-I	afimbrialna	AfaE-I	Zapalenie pęcherza, biegunka	ludzki	DAF	
Afa-III	afimbrialna	AfaE-III	Zapalenie pęcherza, biegunka	ludzki	DAF, CEACAM1, CEA, CEACAM6	1UT2
Dr-II	niefimbrialna	DraE-II	Odmiedniczkowe zapalenie nerek u ciężarnych	ludzki	DAF	
Nfa-I	niefimbrialna	NfaA	Zapalenie pęcherza	ludzki	DAF, CEA	
Afa-V	afimbrialna	AfaE-V	Biegunka	ludzki	DAF	
Afa-II	afimbrialna	AfaE-II	Zapalenie pęcherza, biegunka	ludzki	DAF	
Afa-IV	afimbrialna	AfaE-IV	Zapalenie pęcherza, biegunka	ludzki	BD	
Afa-VII	afimbrialna	AfaE-VII	Biegunka	wołowy	BD	
Afa-VIII	afimbrialna	AfaE-VIII	Posocznica	wołowy	BD	
Aaf-I	afimbrialna	AggA	Biegunka	ludzki	fibronektyna	4PH8
Aaf-II	afimbrialna	AafA	Biegunka	ludzki	fibronektyna	2MPV

Tabela 5. Przedstawiciele rodziny adhezyn Dr szczepów UTI (Nowicki *et al.*, 2001; Le Servin, 2005; Bouguenec i Servin 2006, Berry *et al.*, 2014).

Biogeneza wszystkich przedstawicieli rodziny adhezyn Dr przebiega według mechanizmu chaperone-usher z udziałem białek kodowanych przez geny zgrupowane w operonach o zbliżonej organizacji (Rys. 14). Operony te składają się z co najmniej 5, a najczęściej sześciu ramek odczytu tworzących dwie oddzielne jednostki transkrypcyjne. Geny A-D są silnie

zakonserwowane wśród różnych przedstawicieli rodziny. Gen E, kodujący adhezynę, jest natomiast bardziej zróżnicowany (Servin, 2005).



Rys. 14. Organizacja operonów kodujących adhezyny z rodziny Dr. Poszczególne geny zaprezentowane zostały jako prostokąty z odpowiednimi dla genów literami. Poziome strzałki wyznaczają kierunek transkrypcji (Le Bouguenec i Servin, 2006).

Poza podobnym układem operonu, adhezyny rodziny Dr posiadają również inne wspólne cechy: wszystkie należą do struktur typu FGL, białka ich adhezyn posiadają mostek disiarczkowy zlokalizowany pomiędzy nićmi A i B i obecny jest gen kodujący inwazynę, o mostku pomiędzy nićmi B i F. Poniżej przedstawiona została charakterystyka niektórych przedstawicieli rodziny adhezyn Dr.

2.4.1 Fimbrie Afa/Dr

Do rodziny adhezyn Afa/Dr należą m.in. adhezyny AfaE-III oraz DraE. Ich sekwencje różnią się jedynie trzema aminokwasami (Rys. 15), ale skutkuje to różnym powinowactwem receptorowym (Rozdział 2.1.1.1. Powierzchniowe czynniki wirulencji).

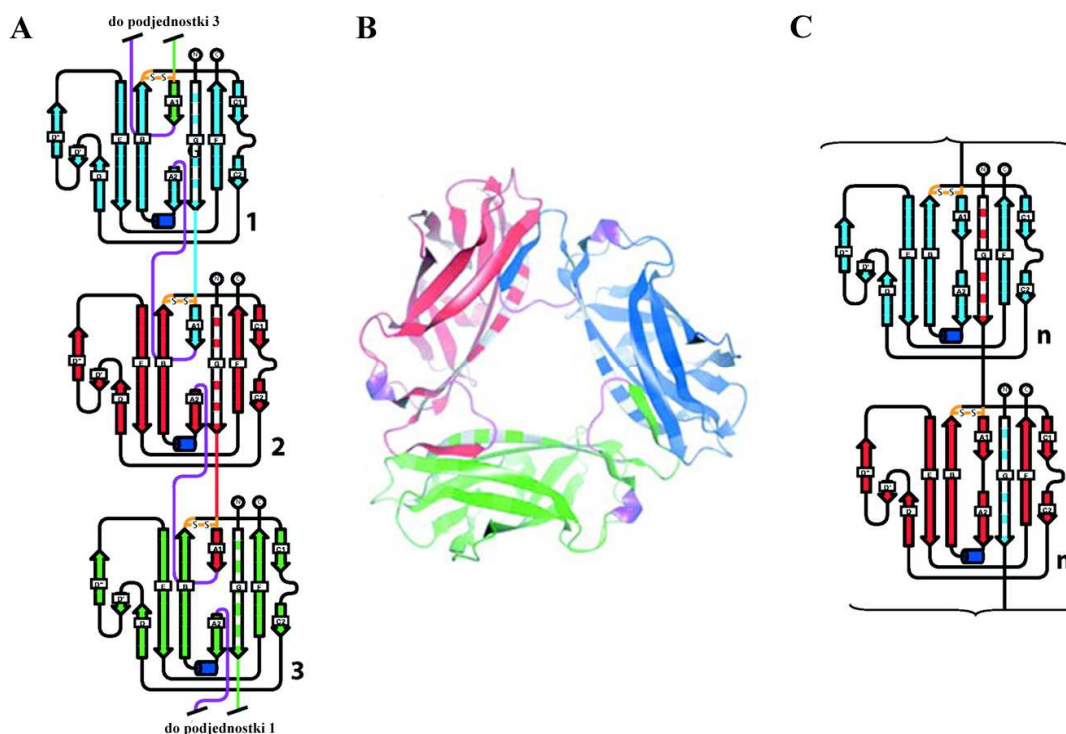
AfaE-III	FTPSG	FTG	TKL	TVTEEC	QVR	VDL	TVAK	TRGQL	TDAAP	IGPVT	QALG
DraE	FTPSG	TTG	TKL	TVTEEC	QVR	VDL	TVAK	TRGQL	TDAAP	IGPVT	QALG
AfaE-III	CNARQ	VALK	ADT	DNFEQ	GKFFL	ISD	NNR	DKLYV	NIRP	MNSAW	TTDNGVF
DraE	CDARQ	VALK	ADT	DNFEQ	GKFFL	ISD	NNR	DKLYV	NIRP	MNSAW	TTDNGVF
AfaE-III	YKNDVGS	WGCT	IGIYVD	GQQT	TNTPPG	NYTL	TLTGGY	WAK			
DraE	YKNDVGS	WGCT	IGIYVD	GQQT	TNTPPG	NYTL	TLTGGY	WAK			

Rys. 15. Porównanie sekwencji aminokwasowych AfaE-III i DraE. Różnice w sekwencjach białek zaznaczono kolorem niebieskim. Nić donorową Gd zaznaczona jest kolorem szarym. Reszty odpowiedzialne za wiązanie receptora DAF zaznaczono kolorami zielonym (zidentyfikowane metodą mapowania przesunięcia chemicznego w badaniach NMR) i pomarańczowym (zidentyfikowane poprzez mutagenezę). Kolorem żółtym zaznaczono dodatkową mutację wprowadzoną w DraE na potrzeby produkcji na dużą skalę (Anderson *et al.*, 2004).

Podstawowym wyróżnikiem pomiędzy adhezynami AfaE-III i DraE jest reakcja z receptorem DAF w obecności chloramfenikolu. Różnice w reakcji podjednostek DraE i AfaE-III na ten związek zostały wyjaśnione poprzez krystalizację kompleksu DraE-chloramfenikol. Antybiotyk zostaje przyłączony do wnęki podjednostki znajdującej się pomiędzy N-terminalnym odcinkiem nici C i C-terminalnym odcinkiem nici E. Pomędzy jednym z końców cząsteczki chloramfenikolu i resztami Gly113, Gly42, Pro40 oraz Pro43 następuje wytworzenie wiązań van der Waalsa, a drugi jego koniec zakotwicza się do reszty Ile111. Rejon wiązania chloramfenikolu w DraE pokrywa się z miejscem wiązania receptora DAF – obecność antybiotyku uniemożliwia wiązanie DAF. Dwie z wspomnianych wcześniej różnic strukturalnych pomiędzy AfaE-III i DraE (w pozycjach 88 i 111) obserwuje się w okolicy miejsca wiązania chloramfenikolu. Zmiany reszt w tych miejscach – Thr88 na Met88 oraz Ile111 na Thr111 – skutkują zasłonięciem wnęki strukturalnej, do której w DraE wiąże się chloramfenikol oraz brakiem reszty Ile111 odpowiedzialnej za wiązanie jednego z końców antybiotyku. Wyjaśnia to różnice we wrażliwości na działanie chloramfenikolu pomiędzy AfaE-III i DraE (Pettigrew *et al.*, 2004).

Podjednostki układów Afa-III/Dr wykazują typową topologię immunoglobulinopodobną ze szczeliną hydrofobową oraz N-terminalną nicią „wystającą” poza obręb struktury (nić Gd). Ekspresja natywnych form podjednostek DraE oraz AfaE-III w cytoplazmie prowadzi do powstania cyklicznych trimerów o strukturze identycznej dla obu białek. Cząsteczki w obrębie trimerów powiązane są ze sobą za pomocą międzycząsteczkowego mostka disiarczkowego. W takim ułożeniu nić donorowa Gd umiejscowiona jest wewnątrz każdej

cząsteczki w ułożeniu antyrównoległym do nici F. Taka lokalizacja Gd jest możliwa dzięki przegrupowaniu pięciu reszt łącznika pomiędzy nićmi A1 i A2, w wyniku czego nić A1 wnika do struktury sąsiedniej podjednostki (Rys. 16). Przegrupowane reszty pętli A1-A2 są jedynym elementem odróżniającym cząsteczki podjednostek w obrębie trimerów od ich poprawnie złożonych form (Pettigrew *et al.*, 2004).



Rys. 16. Diagram topologiczny trimerów AfaE-III/DraE (A), porównanie podjednostek tworzących trimer w przypadku AfaE (kolor zielony) i DraE (kolor niebieski) (B) oraz diagram topologiczny struktury białek AfaE-III/DraE w obrębie fimbrii (C). Nić donorowa podjednostki zaznaczona została zakreskowaniem, a łącznik pomiędzy nićmi A1 i A2 odróżniający strukturę trimeryczną od monomerycznej zaznaczono kolorem fioletowym. (Pettigrew *et al.*, 2004).

Białko opiekuńcze DraB (100% identyczności z białkiem AfaB-III), biorące udział w biogenezie fimbrii Dr należy do rodziny białek FGL (Rys. 17). Posiada ono dwie zakonserwowane reszty cysteiny (Cys103 i Cys139), będące homologami reszt cysteiny białka Caf1M i tworzące mostek disiarczkowy niezbędny w procesie tworzenia kompleksów chaperone-podjednostka (Piątek *et al.*, 2005).

```

          *           20           *           40           *
DraB : AGGEGNMSASATETNARVFSLHLGATRVVYNPASSGETLTVIN-DQDYFML : 50
Caf1M : ----ANSAQPDIKFASKEYGVTTIGESRIIYPLDAAGVMVSVKN-TQDYFVL : 46
FimC : -----GVALGATRVVIYPAGQKQEQQLAVTNNNDENSTYL : 32
PapD : -----AVSLDRTRAVFDGSEKSMITLDTISNDNKQLFYL : 32

          60           *           80           *           100
DraB : VQSEVLSLSE--DQKSPAPFVVTPPLFRLDGGQSSRLRIVRTGG--EFPDRE : 97
Caf1M : IQSRIYDENKEKESEDPFVVTPPLFRLDAKQNSLRIAQAGG--VFPRDKE : 95
FimC : IQSWVENA--DGVKDGREIVTPPLFAMKGGKENTLRLILDATNN-QLPODRE : 80
PapD : AQAWIENENQEKIITGEVLIATPPVORLEPGAKSMVRLSTTPDISKLPDRE : 83

          V *           120           *           140           V *
DraB : SLQWICVKGCIPPKEGDRWAEGKDGEKK--ADK-VSLNVQLSVSSCIKLEVR : 145
Caf1M : SLKWLGVKGIIPKDEDIIVVDDATNKQKFNPKDVGVFVQFAINNCIKLLVR : 146
FimC : SLFWNVKAIIPSMDKSKLTEN-----TLQLAIIISRIKLYR : 116
PapD : SLFYFNLRBIIPRSEK---AN-----VLQLALQTKIKLYR : 116

          160           *           180           *           200
DraB : PPAVKGRP-DDVAGKVEWQKAGNRKGVNPTPFYINLSTLTVGGKEVKERE : 195
Caf1M : ENELKGTPIQFAEKLKWKVDGGKLI AENPSPFYMNIGELTFGGKSI PS-H : 195
FimC : PAKLALPP-DQAAEKLRFRRSANSITLINPTPYLTVTELNACTRVLEN-A : 165
PapD : PAAIKTRPNEVWQDQLILNKVSGGYRIENPTPYVTVIIGLGGSEKQAE EGE : 167

          *           220           *           240           *
DraB : YIAPFSSREYPLPAGASG--KVQNKVIITDYGE---TSKQFEABLKG----- : 236
Caf1M : YIPPKSTWAFDL PKGLAGARNVSWRIINDQGG---LDRLYSKNVTL----- : 238
FimC : LVPPMGESTVKLPSDAGS--NITYRTINDYGA---LTPKMTGVM----- : 205
PapD : EETVMLS PRSEQTVKSANYNTPYLSYINDYGERPVLSFICNGSRCSVKKEK : 218

```

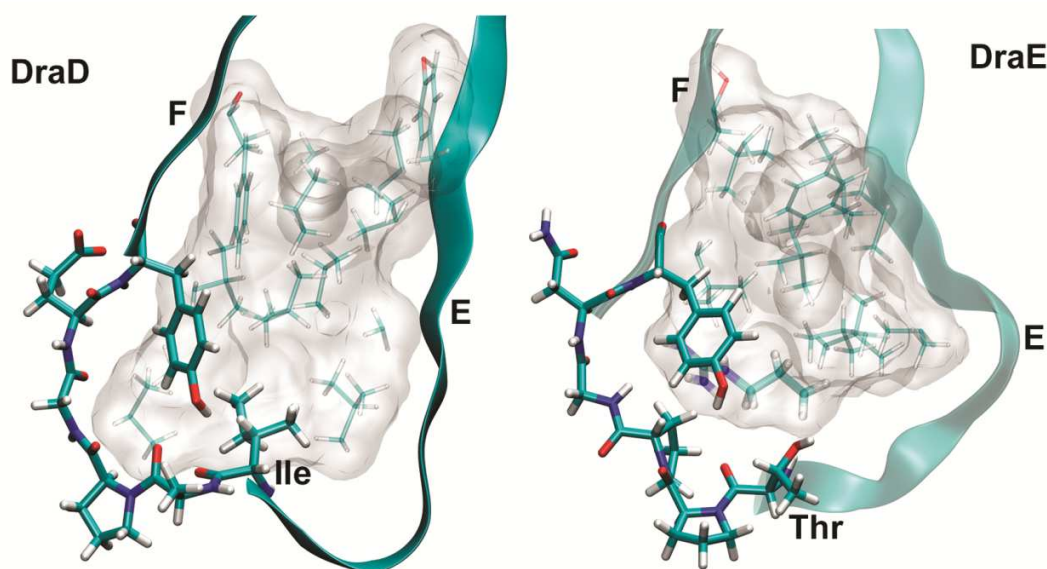
Rys. 17. Porównanie sekwencji aminokwasowych czterech białek opiekuńczych. Reszty zaznaczone na czarno wykazują 100% homologię, reszty zaznaczone białą czcionką na szarym tle – homologię powyżej 80%, reszty z czarną czcionką na szarym tle – homologię powyżej 60%. Nad sekwencjami zaznaczono lokalizację reszt cysteiny tworzących mostek disiarczkowy (Piątek *et al.*, 2005).

Fimbrie Afa-III/Dr poza głównymi podjednostkami budowane są również przez pomniejsze podjednostki o funkcji inwazyjnych ułatwiających bakteryjną internalizację do komórek gospodarza (Servin, 2005). Inwazyjne AfaD i DraD (100% identyczności) wyróżniają się zdecydowanie na tle zakonserwowanych struktur podjednostek budulcowych systemu CU. Podobnie jak inne podjednostki, białka te charakteryzują się strukturą immunoglobulinopodobną z hydrofobową szczeliną w miejscu brakującej β -nici G. Badania krystalograficzne wykazują jednak, że inwazyjne DraD/AfaD nie posiadają N-terminalnej nici donorowej Gd w wyniku czego nie mogą one uczestniczyć w komplementacji szczeliny hydrofobowej podjednostek DraE/AfaE. W konsekwencji, mogą one pełnić w strukturze fimbrii funkcję podjednostki szczytowej. Co więcej, zaobserwowano stabilną produkcję białka DraD w periplazmie bez udziału białka opiekuńczego, co silnie kontrastuje z

degradacją podjednostek DraE w przypadku nieobecności chaperonu. Dla białka AfaD zaobserwowano, że szczelina hydrofobowa jest sztywna, a wiązanie nici donorowej nie jest dopasowane. W wyniku tego szczelina AfaD/DraD jest „niewybiórcza”, tzn. może wchodzić w interakcje z różnymi nićmi donorowymi (Cota *et al.*, 2006). Identyčzną geometrię szczeliny zaobserwowano w przypadku homodimeru DraD-C-His (z dołączonym na C-końcu peptydem składającym się z 13 reszt: heksapeptydu histydynowego oraz łącznika). Badania na tym białku pokazały, że szczelina akceptorowa jednej podjednostki jest wypełniona niespecyficznym C-końcowym peptydem fuzyjnym drugiej podjednostki. Peptyd ten nie wnika głęboko w szczelinę i tworzy jedynie 4 wiązania wodorowe (na 10 możliwych) tylko z nicią F, w wyniku czego struktura β -beczki tego białka jest otwarta (ang. unzipped β -barrel), a szczelina pozostaje dostępna dla rozpuszczalnika (Jędrzejczak *et al.*, 2006). W przypadku podjednostki DraE wprowadzenie fuzyjnej nici donorowej Gd w obręb szczeliny skutkuje powstaniem aż 10 wiązań wodorowych z obiema brzeźnymi nićmi A i F (Piątek *et al.*, 2011). Różnice w dopasowaniu nici donorowych do szczelin obu białek można porównać za pomocą parametru S_c (ang. *shape correlation statistic*) (Lawrence *et al.*, 1993). Wartość tego wskaźnika pokazuje, w jakim stopniu dwie powierzchnie pasują do siebie, przy czym 0 oznacza zupełny brak dopasowania, a 1 – dopasowanie idealne. Dopasowanie geometryczne nici donorowej dla szczeliny DraE wynosi 0,768, natomiast dla DraD parametr S_c wynosi 0,666. Ta różnica wyraźnie wskazuje, że szczelina DraD jest wypełniona nicią donorową w niewielkim stopniu. Takie ustrukturyzowanie sugeruje, że białko DraD może nie tylko znajdować się na szczycie struktury adhezyjnej (gdzie jego szczelina jest uzupełniana przez nić donorową DraE), ale być może jest zdolne także do odłączania się od niej i występować na powierzchni komórki w postaci niezwiązanej (Jouve *et al.*, 1997, Gounon *et al.*, 2000, Piątek *et al.*, 2011).

DraD, mimo znieskształceń w obrębie szczeliny akceptorowej, charakteryzuje się lepszym stopniem upakowania rdzenia niż białka AfaE/DraE. Do opisu tej cechy strukturalnej posłużyć się można współczynnikiem PD (ang. *protein density parameter*), który wyznacza poziom upakowania rdzenia. Wartość PD wynosi od 0 do 1 i rośnie wraz ze wzrostem stopnia upakowania rdzenia. Parametr ten najlepiej sprawdza się w przypadku porównywania cząsteczek o podobnych rozmiarach (Rother *et al.*, 2003). Dla DraD z uzupełnioną nicią Gd szczeliną PD wynosi 0,741, natomiast dla podobnego konstruktu AfaE

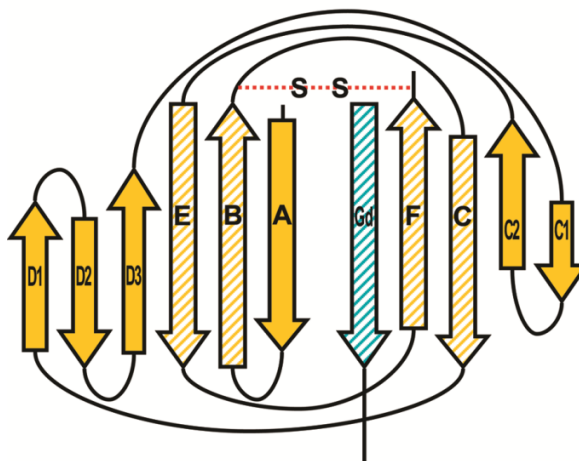
- 0,709. Różnica w stopniu upakowania jest szczególnie wyraźna w rejonie tzw. zakrętu tyrozynowego (ang. *tyrosine corner*), elementu obecnego w obu białkach, którego rolą jest stabilizacja motywu klucza greckiego β -beczki. Zarówno w DraD jak i DraE motyw ten znajduje się na początku nici F i obejmuje odpowiednio reszty Tyr108 i Tyr112 (Rys. 18). Zakręt tyrozynowy charakteryzuje się wiązaniem wodorowym pomiędzy grupą –OH bocznego łańcucha tyrozyny a grupami –NH lub –CO reszt Y-3, Y-4 (najczęściej), bądź Y-5. W DraD z fuzyjnie dołączoną nicią uzupełniającą szczelinę grupa hydroksylowa bocznego łańcucha tyrozyny znajduje się w pobliżu grupy –CO Ala104, tworząc najbardziej klasyczny motyw typu $\Delta 4$. Łańcuchy boczne Tyr112 w DraE oraz Tyr108 w DraD są bardzo do siebie podobne pod względem konformacyjnym, jednakże grupa –OH z Tyr112 DraE nie tworzy wiązań wodorowych z grupami poprzedzających je reszt (-NH i –CO) (Piątek *et al.*, 2011). Powyższe zjawisko wynika z nieznacznie odmiennej konformacji tej części szkieletu białkowego, zawierającej wyeksponowaną Thr107 (podobnej do schowanej w hydrofobowym rdzeniu Ile103 z DraD) oraz z gorszego upakowania sąsiednich reszt.



Rys. 18. Porównanie motywu zakrętu tyrozynowego w białku DraE oraz DraD (Piątek *et al.*, 2011).

W obrębie struktury inwazyj DraD/AfaD znajduje się jeden mostek disiarczkowy, o lokalizacji typowej dla klasycznej struktury immunoglobulinowej: umiejscowiony jest on pomiędzy resztą Cys28 leżącą w β -nici B w jednej β -kartce i resztą Cys116 w nici F drugiej

β -kartki (Rys. 19). Obecność mostka w DraD jest niezbędna na etapie składania białka (Piątek *et al.*, 2010). Ponadto stwierdzono, że mostek disiarczkowy „typu DraD” w obrębie grupy białek podjednostkowych typu CU występuje jedynie w białkach z rodziny inwazyjnych DraD/AfaD-podobnych.



Rys. 19. Diagram topologiczny białka DraD. Zaznaczono umiejscowienie mostka disiarczkowego pomiędzy niciami B i F. Nici formujące rdzeń białka oznaczone są poprzez zakreskowanie. Oznaczono również nić donorową Gd białka DraE uzupełniającą szczelinę hydrofobową DraD (kolor niebieski) (Piątek *et al.*, 2011).

Inwazyjne DraD/AfaD eksportowane są na powierzchnię komórki w sposób odmienny od innych podjednostek kodowanych przez ich operony. Dowiedzione zostało, że białko DraD transportowane jest przez błonę zewnętrzną w sposób niezależny od białka kanałotwórczego DraC (Zalewska *et al.*, 2005). Transport DraD na powierzchnię zachodzi z wykorzystaniem systemu sekrecji typu II, opierającego się na kompleksie składającym się z 12-15 białek, które rozpoznają w pełni sfałdowane białka i przenoszą je przez błonę zewnętrzną. Kluczowym elementem systemu jest białko kanałotwórcze GspD, a mutacje w obrębie kodującego go genu prowadzą do zatrzymania transportu DraD na powierzchni komórki (Zalewska-Piątek *et al.*, 2008). Do ekspresji DraD nie jest wymagana obecność DraE i odwrotnie – produkcja natywnych fimbrii Dr zachodzi również w przypadku mutacji w gene *draD* wykluczających powstawanie białka DraD. Z kolei obecność DraD nie jest niezbędna do utworzenia poprawnej fimbrii Dr – DraD nie jest inicjatorem polimeryzacji struktury adhezyjnej (Zalewska *et al.*, 2005).

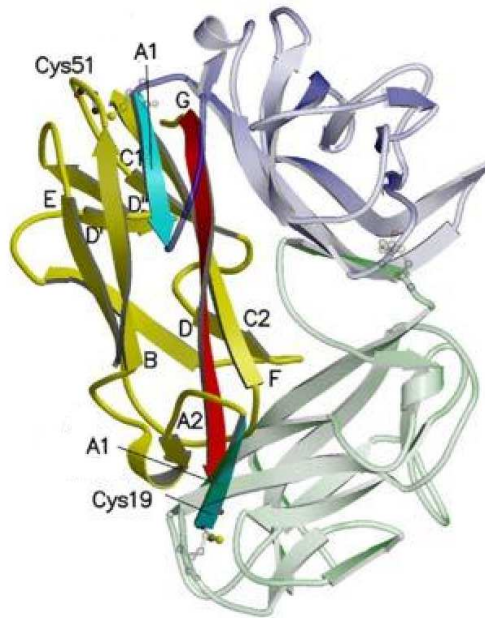
2.4.2 Fimbrie F1845

Fimbrie F1845 (adhezyny DaaE), należące do rodziny adhezyn Dr *E. coli*, odpowiedzialne są za przewlekłe stany biegunkowe. Białko DaaE, będące główną podjednostką fimbrii F1845 wykazuje 57% homologii sekwencyjnej z podjednostką DraE. Pomiędzy DaaE i dwoma pozostałymi wymienionymi białkami zaobserwować można różnicę w postaci delekcji jednej reszty w pozycji 78 (licząc na podstawie sekwencji DraE) (Rys. 20). Delekcja ta nie wpływa w znaczący sposób na strukturę białka, ponieważ jej skutki są niwelowane przez dopasowanie szkieletu polipeptydowego w odległości zaledwie kilku reszt (w pozycjach 75 i 80 występuje idealne dopasowanie struktur DraE i DaaE).

DraE	1	GFTPSGTTGTTKLTVTTEE	CQVRVGD	LTVAKTRG	QLTDAAPI	GPVTVQAL	GCDARQVAL	KA		
AfaE-3	1	GFTPSGTTGTTKLTVTTEE	CQVRVGD	LTVAKTRG	QLTDAAPI	GPVTVQAL	GCNARQVAL	KA		
DaaE	1	TFQASGTTGTTTLT	VTTEECRV	QVGNVTATL	ARSKLKDDTAI	CVI	GVTALGCNELCAAL	CA		
				*						
DraE	61	DTDNFEQGF	FLISDNNRDKL	YVNI	RPTDNSAW	TDNGVFYKNDVGS	WGGI	IGI	YVDGQQ	
AfaE-3	61	DTDNFEQGF	FLISDNNRDKL	YVNI	RPV	DNSAW	TDNGVFYKNDVGS	WGGT	IGI	YVDGQQ
DaaE	61	DPDNYDAT	NLYMTSRN	FDKLN	VKLRKAT	DGSSW	YGNVGYKTEGGN	WGGH	VGI	SVDGNC
DraE	121	TNTPPGNYTLTLTGGYWAK								
AfaE-3	121	TNTPPGNYTLTLTGGYWAK								
DaaE	120	TDKPTGEYTLNLTGGYWTN								

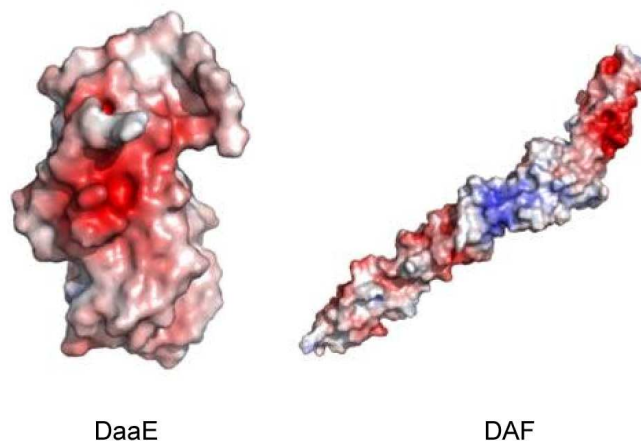
Rys. 20. Porównanie sekwencji białek DraE, AfaE-III i DaaE. Gwiazdką zaznaczono delekcję w pozycji 78 w obrębie DaaE (Korotkova *et al.*, 2006).

DaaE-sc krystalizuje w formie trimery o strukturze identycznej, jak w przypadku trimery AfaE-III. W jego obrębie nić A1 jednej cząsteczki wnika w obręb sąsiedniej cząsteczki (Rys. 21). W ten sposób dwie pochodzące z sąsiednich podjednostek reszty cysteiny, Cys19 i Cys51, znajdują się na tyle blisko, że możliwe jest utworzenie międzypodjednostkowego mostka disiarczowego. Mostek ten nie jest niezbędny do tworzenia trimerów – usunięcie reszt cysteiny za pomocą mutageny nie ma wpływu na zdolność białka do trimeryzacji. Taka cykliczna struktura umożliwia osiągnięcie podjednostkom stabilnej konformacji również w cytoplazmie bez udziału białka opiekuńczego. Autorzy sugerują, że oddziaływanie z białkiem opiekuńczym blokuje miejsce wiązania nici A1 w podjednostce i uniemożliwia powstawanie trimerów, dzięki czemu podjednostki mogą być włączane w skład rosnącej fimbrii (Korotkova *et al.*, 2006). W toku prac badawczych nad niniejszą pracą doktorską zaproponowano alternatywny mechanizm przeciwdziałania powstawania trimerów.



Rys. 21. Trimer DaaE. Poszczególne podjednostki zaznaczono kolorami żółtym, jasnozielonym i jasnofioletowym. Nici Gd żółtej podjednostki zaznaczono kolorem czerwonym, natomiast nici A1 niebieskiej i żółtej podjednostki – kolorem turkusowym. Modelem kulkowym wyróżniono reszty Cys19 i Cys51 (Korotkova *et al.*, 2006).

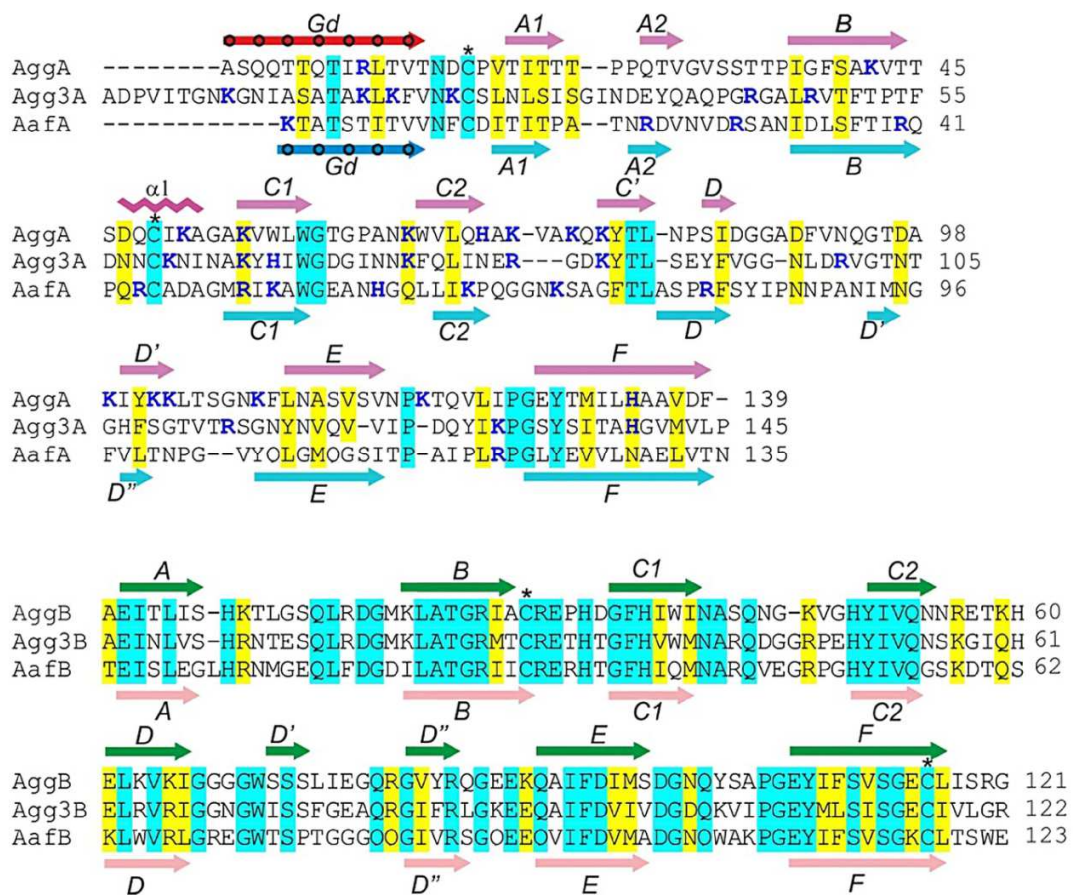
Podobnie jak adhezyny DraE i AfaE-III, DaaE rozpoznaje receptor DAF (Van Loy *et al.*, 2002). Spośród wszystkich reszt tego białka, największe znaczenie dla oddziaływania DaaE-DAF mają reszty Asp61 i Asp63 – mutacje w tych miejscach całkowicie znoszą wiązanie receptora. Analiza elektrostatyczna powierzchni DAF pozwoliła wyróżnić pomiędzy dwoma domenami tego białka dodatnio naładowaną wnękę, w której znajdują się trzy reszty lizyny (Lys125, Lys126 i Lys127). Kluczowe dla wiązania DAF reszty Asp61 i Asp63 białka DaaE, o ładunku ujemnym, oddziałują z regionem DAF o ładunku dodatnim (Rys. 22). Wynika z tego, że dla wiązania DaaE-DAF istotne są oddziaływania elektrostatyczne. Badania z użyciem roztworu o różnej sile jonowej pokazały, że oddziaływania takie generują około 16% energii swobodnej wiązania (7% w przypadku AfaE-I i ponad 40% dla wiązania DAF przez AfaE-III i DraE) (Korotkova *et al.*, 2006).



Rys. 22. Potencjał elektrostatyczny powierzchni DaaE i DAF. Kolorem czerwonym zaznaczono rejony o ładunku ujemnym, kolorem niebieskim – o ładunku dodatnim. (Korotkova *et al.*, 2006).

2.4.3 Agregacyjne fimbrie AAF

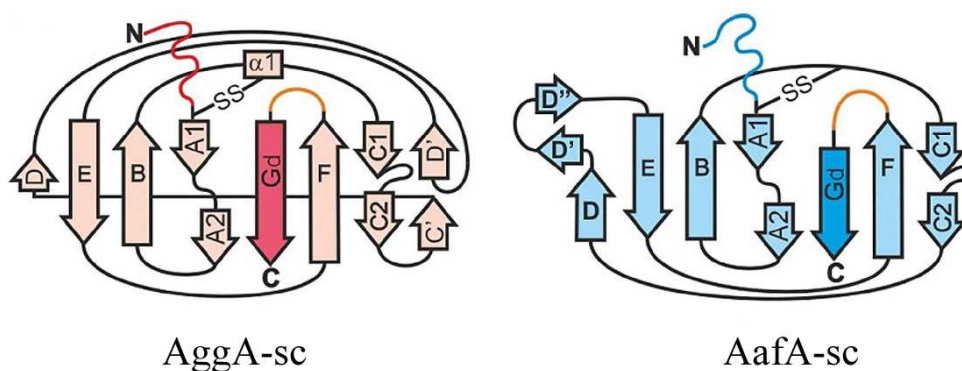
Enteroagregacyjne szczepy *E. coli* mogą produkować na swojej powierzchni adherentne agregacyjne fimbrie (AAF, ang. *aggregative adherence fimbriae*) w jednym z czterech wariantów: AAF/I (kodowane przez operon *agg*), AAF/II (operon *aaf*), AAF/III (*agg3*) lub AAF/IV (operon *hda*). Fimbrie AAF występują w postaci cienkich, zgrupowanych bądź występujących pojedynczo (AAF/III) włókien o długości kilku mikrometrów i średnicy od 2-3 nm (AAF/I) do 5 nm (AAF/II i AAF/III) (Berry *et al.*, 2014). Wszystkie AAF budowane są przez dwa rodzaje podjednostek – główną oraz pomniejszą, o zakonserwowanej wśród wszystkich typów AAF sekwencji i strukturze. Sekwencje głównych podjednostek wykazują jedynie niewielkie podobieństwo (Rys. 23) (Berry *et al.*, 2014).



Rys. 23. Porównanie sekwencji głównych (AggA, AafA, Agg3A) i pomniejszych podjednostek (AggB, AafB, Agg3B) budujących fimbrie AAF. Elementy struktury drugorzędowej podjednostek zostały oznaczone kolorami: AggA – ciemnoróżowym (nić donorowa – czerwonym), AafA – jasnoniebieskim (nić donorowa – ciemnoniebieskim), AggB – zielonym, AafB – jasnoróżowym. Kółkami oznaczono reszty wypełniające odpowiednie kieszenie w obrębie szczeliny akceptorowej. Jasnoniebieskim zacięciem wyróżniono zakonserwowane rejony sekwencji, a żółtym – reszty podobne. Gwiazdka oznacza reszty biorące udział w tworzeniu mostków disiarczkowych. Pogrubioną niebieską czcionką zaznaczono reszty naładowane dodatnio (Berry *et al.*, 2014).

Główne podjednostki wszystkich fimbrii AAF wykazują topologię immunoglobulinopodobną o dwóch β -karkach tworzących β -kanapkę, ze szczeliną akceptorową w miejscu brakującej siódmej nici G. Wszystkie posiadają również parę zakonserwowanych reszt cysteiny biorących udział w tworzeniu mostka disiarczkowego pomiędzy niemi A i B. Pierwsza reszta Cys wyznacza koniec N-terminalnej nici donorowej Gd, uczestniczącej w reakcji DSE. Pomędzy głównymi podjednostkami AAF różnice obserwowane są w obrębie brzegów β -kanapki. U AafA nie D wytwarza wiązania wodorowe

z nicią E. U AggA natomiast, nić ta jest krótka, ale obecne są dodatkowe nici C i D, dodatkowa α -helisa w pętli B-C1, a ponadto zarówno nić F, jak i nić donorowa Gd są dłuższe niż w przypadku AafA (Rys. 24). AggA, w przeciwieństwie do innych podjednostek systemu CU FGL wprowadza w obręb szczeliny akceptorowej drugiej podjednostki nie pięć, ale siedem reszt donorowych (Berry *et al.*, 2014).



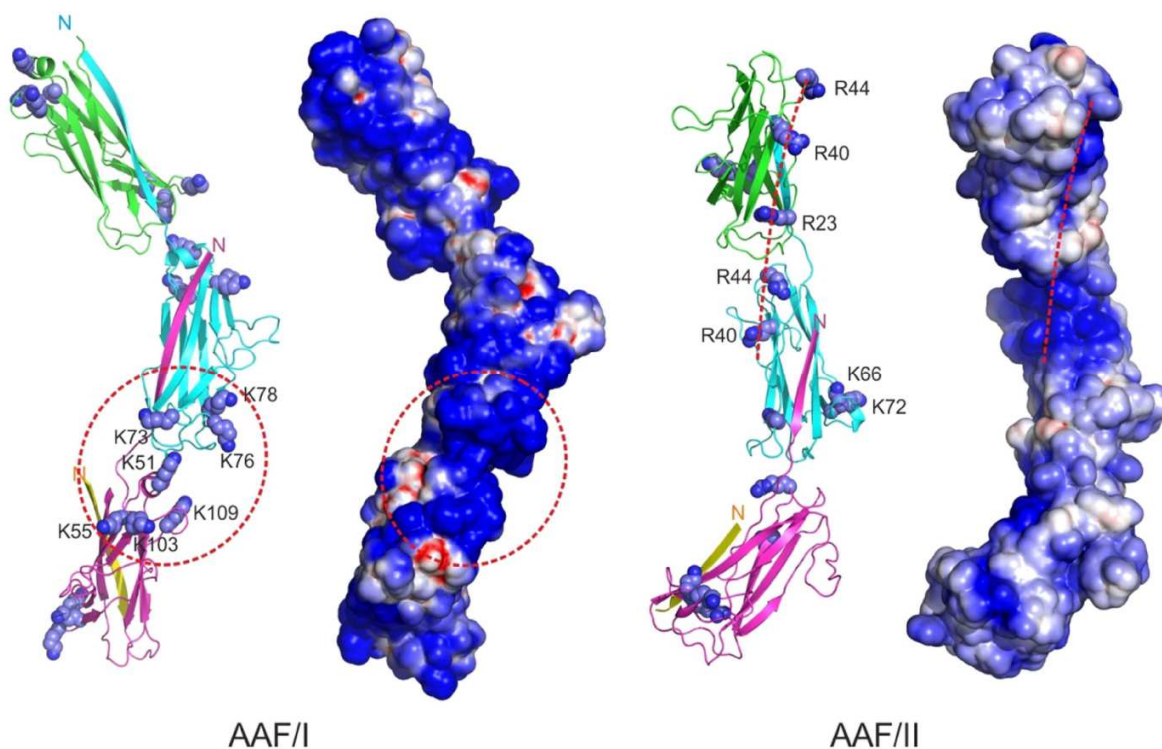
Rys. 24. Diagram topologiczny głównych podjednostek fimbrii AAF w postaciach samokomplementujących (Berry *et al.*, 2014).

Najbliższa pod względem strukturalnym do podjednostek AggA i AafA (które wobec siebie wykazują podobieństwo wyrażone poprzez średni kwadrat odchylenia (ang. *root mean square deviation, r.m.s.d*) wynoszące 3,2 Å) jest główna podjednostka fimbrii AFA-III/Dr, AfaE/DraE (r.m.s.d. wynoszące 4,1 i 4,0 Å dla AggA i AafA). Różnice pomiędzy nimi obserwuje się w obrębie pętli C2-E, pętli B-C1 oraz na początku nici donorowej Gd. Najbardziej zakonserwowanym rejonem jest nić F (reszty Gly127 i Tyr129) oraz końce nici Gd (Leu11) i A2. Homologię wykazują również reszty tworzące mostek disiarczkowy (Rys. 25). Zarówno w podjednostkach AAF jak i Afa/Dr (oraz innych podjednostkach systemu CU FGL) nić donorowa przebiega po powierzchni szczeliny akceptorowej oddziałując jedynie z sąsiednią nicią F (Berry *et al.*, 2014).

AggA	-----ASQQTQTIRLTVTNDCPVTITTT--PPQTVGVSSSTTPIGFSAKVTTSDQCI
Agg3A	ADPVITGNKGNIASATAKLFVNKCSLNLSISGINDEYQAQPGRGALRVFTFTPTFDNNCK
AafA	-----KTATSTITVVNFCDITITPA--TNRDVNVDRSANIDLSTIRQPQRCA
AfaE-III	-----GFTPSGTTGTTKLTVEECQVRVGDLTVAKTRGQLTDAAPI-GPVTVQALG-CN
AggA	--KAGAKVVLWGTGPANKWVLQHAK-VAKQKYTL-NPSIDGGADFVNQGTDAKIYKCLTS
Agg3A	--NINAKYHIWGDGINNKFQLINER---GDKYTL-SEYFVGG-NLDRVGTNTGHFSGTVT
AafA	--DAGMRIKAWGEANHGQLLIKPGGKNSAGFTLASPRFSYIPNNPANIMNGFVLTNPG-
AfaE-III	ARQVALKADTDNFEQGKFFLISDNN---RDKLYVNIRP---MDNSAWTTDNG-VFYKNDV
AggA	GNKFLNASVSVNPKTQVLIPGEYTMILHAAVDF- 139
Agg3A	RSGNYNVQV-VIP-DQYIKPGSYSITAHGVMVLP 145
AafA	-VYQLGMQGSITP-AIPLRPGLYEVVLAELVTN 135
AfaE-III	GSWGGTIGIYVDGQQTNTPPGNYTLTLTGGYWAK 139

Rys. 25. Porównanie sekwencji głównych podjednostek rodzin AAF i Afa/Dr. Reszty identyczne zaznaczono na niebiesko, a zakonserwowane na żółto (Berry *et al.*, 2014).

Fimbrie AAF umożliwiają szczepom EAEC adhezję do błony śluzowej jelit, a ponadto sprzyjają powstawaniu biofilmu na powierzchniach abiotycznych, takich jak szkło czy plastik. Wszystkie cztery warianty fimbrii AAF wykazują przy tym zróżnicowanie pod względem zdolności aglutynacji erytrocytów, co sugeruje, że rozpoznają one bądź różne receptory, bądź wiążą się do tych samych receptorów, lecz z różnym powinowactwem. Jednym z poznanych receptorów dla fimbrii AAF/I i AAF/II jest fibronektyna. Mapowanie przesunięć chemicznych podczas oddziaływania białka AggA z tym receptorem połączone z mutagenезą ukierunkowaną wstępnie wyselekcjonowanych reszt podjednostki fimbrii pozwoliło ustalić, które jej rejony odpowiedzialne są za wiązanie receptora. Ustalono, że wszystkie reszty wiążące receptor to zasadowe reszty argininy i lizyny. Usunięcie pozytywnie naładowanych łańcuchów bocznych tych reszt skutkuje spadkiem powinowactwa do receptora. Rozpoznawanie receptora odbywa się więc z udziałem oddziaływań elektrostatycznych (Berry *et al.*, 2014).



Rys. 26. Lokalizacja reszt odpowiedzialnych za wiązanie fibronektyny przez podjednostki fimbrii AAF/I i AAF/II. Kolorem niebieskim oznaczono regiony o potencjale dodatnim, kolorem czerwonym – o potencjale ujemnym (Berry *et al.*, 2014).

Reszty odpowiedzialne za wiązanie receptora znajdują się w rejonie szczeliny pomiędzy sąsiednimi podjednostkami w obrębie fimbrii (Rys. 26). W przypadku AAF/I trzy znajdujące się w bliskim sąsiedztwie reszty lizyny (Lys73, Lys76 i Lys78) położone są w pętli pomiędzy niemi C i C2 u podstawy podjednostki. Mutacje w tych miejscach całkowicie blokują wiązanie fibronektyny. Pozostałe reszty wiążące zlokalizowane są na szczycie cząsteczki: reszty Lys51 i Lys55 (odpowiednio w obrębie pętli B-C1 i na początku nici C1), Lys103 i Lys109 (odpowiednio na końcu nici C i w pętli C-E). Rejony, w których znajdują się wymienione reszty są umiejscowione w obrębie fimbrii w bliskim sąsiedztwie, co skutkuje powstaniem powierzchni wyposażonej w płytką szczelinę o najwyższym potencjale dodatnim w porównaniu do reszty włókna. Podobne ułożenie reszt w miejscu łączenia podjednostek występuje w przypadku AAF/II: Arg23 (koniec nici A2) u podstawy AafA, Arg40 (początek nici B) i Arg44 (pętla B-C1) u szczytu podjednostki (Rys. 26). Reszty Lys66 i Lys72 prawdopodobnie przyczyniają się do tworzenia dodatkowych wiązań z

fibronektyną. Zidentyfikowane reszty wiążące nie charakteryzują się zakonserwowaniem lokalizacji sekwencyjnej, większość jednak z nich występuje w regionach o podobnej strukturze na biegunach podjednostek (Berry *et al.*, 2014).

Fimbrie AAF składają się również z pobocznych podjednostek – AggB i AafB. Ich struktury wykazują większy stopień zakonserwowania niż odpowiednie główne podjednostki – wartość r.m.s.d wynosi 1,2 Å. Białka te nie posiadają N-terminalnej nici mogącej uczestniczyć w uzupełnianiu szczeliny hydrofobowej, ale ich własna szczelina wypełniana jest przez nią donorową głównych podjednostek. Parametr Sc dla szczeliny AggB i AafB wynosi odpowiednio 0,733 i 0,756 i nie odbiega znacząco od wartości Sc wyliczonej dla głównych podjednostek AggA i AafA (0,784 i 0,804), co świadczy o dobrym dopasowaniu nici donorowej do szczeliny. Funkcja podjednostek AggB i AafB nie jest znana, jednak wymienione cechy strukturalne sugerują, że stanowią one podjednostki szczytowe fimbrii. Fakt wysokiej homologii z podjednostką szczytową DraD (powyżej 60%) również przemawia za tą lokalizacją (Berry *et al.*, 2014).

2.5 Klasyfikacja filogenetyczna elementów szlaku chaperone-usher

Białka chaperone i usher są stosunkowo dobrze zakonserwowane sekwencyjnie i strukturalnie wśród różnych szczepów bakterii Gram-ujemnych. Jednak klasyfikowanie szlaków chaperone-usher na podstawie homologii sekwencyjnej pomiędzy podjednostkami czy białkami opiekuńczymi nie jest właściwym podejściem, z uwagi na fakt, iż operony z różnych mikroorganizmów mogą być wyposażone w różną liczbę genów kodujących chaperony i podjednostki fimbrialne. Klasyfikacja na podstawie tych genów może zatem skutkować w niejednoznacznym grupowaniu szlaków w odległe od siebie rejony drzewa filogenetycznego. Jednak każdy operon koduje tylko jedno zewnętrzne białko usher, tak więc klasyfikacja na jego podstawie rozwiązuje powyższy problem.

Rodzina fimbrialnych białek ushera jest rozpowszechniona wśród mikroorganizmów z grup Proteobacteria, Cyanobacteria i *Deinococcus-Thermus*. Składa się ona ze 189 białek i została podzielona na 6 kladów oznaczonych odpowiednio greckimi literami: α , β , γ , κ , π oraz σ . W obrębie każdego kladu wszystkie białka posiadają wspólnego przodka. Klad γ został dodatkowo podzielony na 4 subklady (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4). Oznaczenie kladów β i γ nadano

w kolejności alfabetycznej, natomiast kładów α , κ , π oraz σ zostało wybrane od cechy charakterystycznej białek lub znaczącego przykładu: kład α od alternatywnego szlaku chaperone-usher, kład κ od fimbrii K88 (F4), kład π od fimbrii P, kład σ od białka U otoczki zarodników *Myxococcus xanthus* (Nuccio i Baumber, 2007).

Kłady można przydzielić do czterech głównych grup, bazując na strukturze operonu oraz zależności ewolucyjnej sekwencji kodowanych w nich podjednostek (Rys. 27). Pierwsza grupa została oznaczona jako $\gamma\kappa\pi$ i zawiera klady γ , κ oraz π . Grupa ta charakteryzuje się homologią głównej podjednostki budującej struktury adhezyjne do podjednostki budującej pile typowe (ECP, ang. *E. coli common pili*) (PFAM00419). Klady κ i π posiadają podobną organizację operonu: na początku znajdują się geny kodujące główną podjednostkę, następnie geny ushera i białka opiekuńczego. Kład γ wykazuje odmienną organizację w zależności od subkladu: w subkladzie γ_1 kolejno po sobie następują geny głównej podjednostki, chaperonu, ushera i adhezyny szczytowej, w subkladzie γ_2 głównej podjednostki, chaperonu pierwszego, chaperonu drugiego i ushera, w subkladzie γ_3 alternatywnie występują kolejno geny głównej podjednostki, chaperonu i ushera bądź chaperonu, ushera i następnie głównej podjednostki, natomiast w subkladzie γ_4 – geny głównej podjednostki, chaperonu, ushera i adhezyny szczytowej. Dla kładów α , β i σ wyróżnia się osobne grupy z różnymi organizacjami genów w operonach: chaperone-główna podjednostka-usher-adhezyjna szczytowa dla kładu α , główna podjednostka-chaperone-usher dla β oraz główna podjednostka-chaperone-usher-adhezyjna szczytowa dla σ . Każdy z tych kładów posiada również inny wyznacznik białkowy, do którego podjednostki wykazują homologię: α – podjednostka typu CS1 (PFAM04449), β – białko o nieznannej funkcji (PFAM06551), σ – nieskategoryzowane wydzielane białko (COG5430). Oznacza to, że różnorodność organizacji operonów wśród tych kładów nie jest wynikiem wymiany genów kodujących podjednostki pomiędzy czterema grupami, a ewolucji zbieżnej całych grup. Przypadki występowania odstępstw od ustalonej organizacji operonu (np. gdy istnieje więcej niż jeden gen kodujący białko opiekuńcze) tłumaczy się duplikacją genu.

Sekwencjonowanie całych genomów pozwoliło odkryć przypadki „hybrydowych systemów chaperone-usher”. Operony takich systemów zawierają geny kodujące elementy pochodzące z zupełnie odmiennych systemów biogenezy. Taka sytuacja ma miejsce w kładzie γ_4 , gdzie niektóre operony zawierają w sobie lub w najbliższym otoczeniu geny

systemów sekrecji typu V bądź systemu sekrecji dwóch partnerów (TPS, ang. *two-partner secretion*). Przykładem „hybrydowego systemu CU” jest operon *pvc* *P. fluorescens*, w którym znajduje się cały klaster systemu dwóch partnerów (Busch i Waksman, 2012).

Kład	Subklad	Organizacja operonu	Operon	Lokalizacja receptora
α			<i>E. coli cfaABCE</i>	komórki nabłonka jelit
β			<i>B. cepacia Bamb1677-9</i>	brak danych
σ			<i>V. parahaemolyticus csuABCDE</i>	brak danych
γ	γ_1		<i>E. coli smfACDHF</i>	nabłonek pęcherza, komórki nerek
	γ_2		<i>E. coli fasABCDEFG</i>	ludzkie komórki nabłonka jelit
	γ_3		<i>Y. pestis caf1M,1A,1</i>	komórki krwi
γ_4	γ_4		<i>K. pneumoniae mrkABCDF</i>	powierzchnie abiotyczne, brak danych
	γ_4		<i>B. pertussis/B. avium fhaBfimABCDfhaC</i>	powierzchnie abiotyczne, brak danych
γ_4	γ_4		<i>Paeruginosa cupB1B2B3B4B5 (fha)B6</i>	powierzchnie abiotyczne, brak danych
γ_4	γ_4		<i>P. fluorescens PFL_1436-9</i>	powierzchnie abiotyczne, brak danych
κ			<i>E. coli fanCDEFG</i>	ludzkie komórki nabłonka
π			<i>B. cepacia Bamb_1523-6</i>	komórki nabłonka nerki oraz komórki krwi

Podstawowe elementy: podjednostka główna chaperone usher adhezyna szczytowa
Elementy dodatkowe: podjednostka TpsB-podobne TpsB-podobne funkcja nieznana

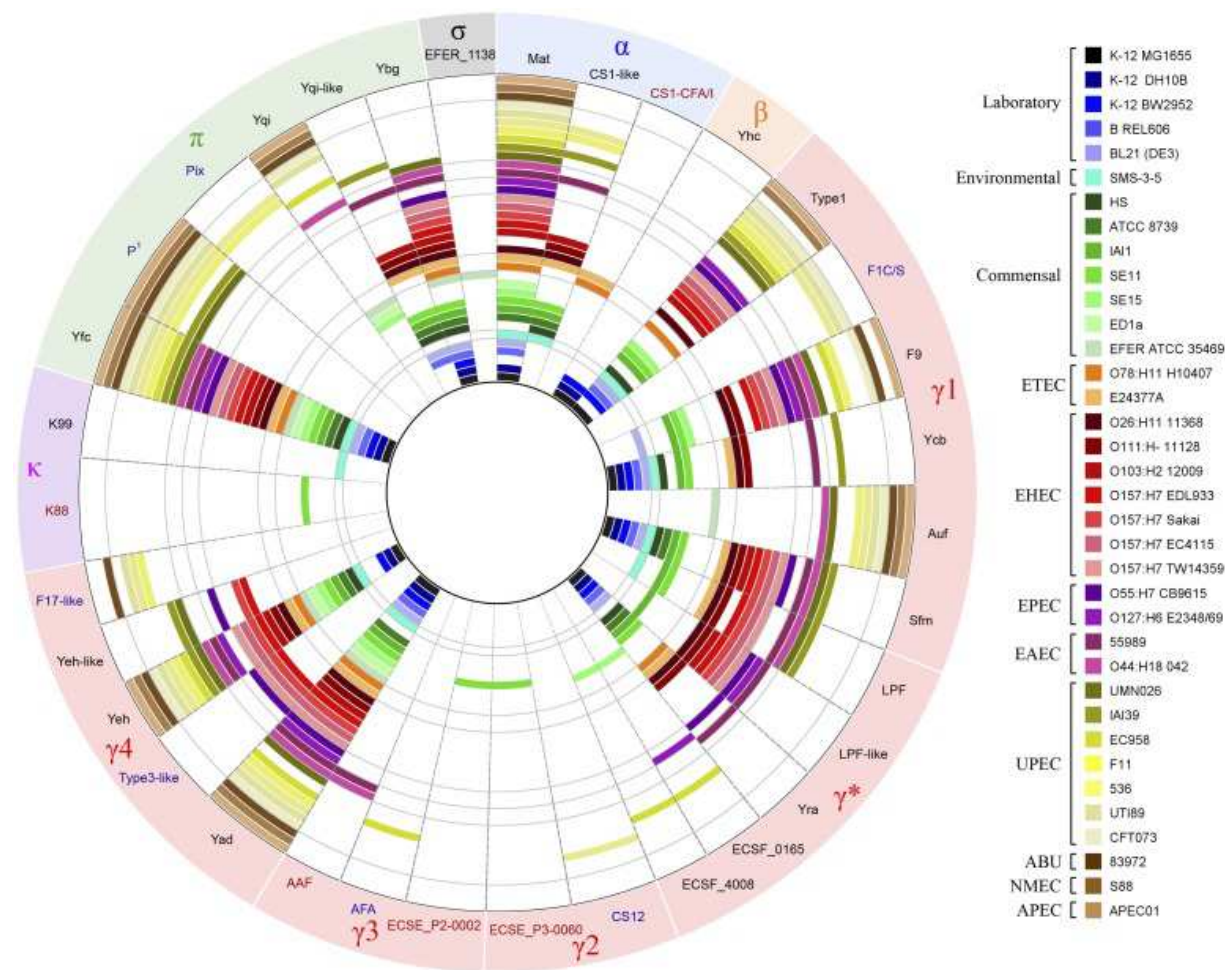
Rys. 27. Klasyfikacja systemów chaperone-usher na klady oparta na analizie sekwencji białek usher. Wybrano po jednym reprezentancie każdego kładu i subkladu (Busch i Waksman, 2012).

Klasyfikację systemów chaperone-usher na podstawie homologii białka usher można porównać z klasyfikacją na podstawie struktury białek opiekuńczych, a konkretnie omiawianej wcześniej różnicy w długości pętli F₁-G₁. Systemy wykorzystujące chaperony FGL należą do kładu γ_3 , podczas gdy systemy FGS mieszczą się w obrębie kładów β , γ_1 , γ_2 , γ_4 , κ oraz π (Nuccio i Baumler, 2007, Busch i Waksman 2012). Kład α obejmuje system

nazywany czasem alternatywnym systemem chaperone-usher lub rodziną fimbrii klasy 5 lub grupy FGA. Do kladu σ należą archaiczne systemy o niskim stopniu podobieństwa sekwencyjnego w stosunku do klasycznego oraz alternatywnego systemu CU (np. usher Orf1 z *Pseudomonas aeruginosa*).

Na podstawie metody klasyfikacji operonów bazującej na podobieństwie sekwencyjnym genów kodujących białka usher dokonano pogrupowania fimbrii występujących w 35 różnych szczepach *Escherichia coli* (Wurpel *et al.*, 2013). Wśród fimbrii mogących występować u tego mikroorganizmu znaleziono przedstawicieli wszystkich sześciu kładów. Najliczniej reprezentowany jest kład γ z 24 strukturami fimbrialnymi. Kład π zawiera 6 fimbrii, natomiast pozostałe cztery zawierają po kilka reprezentantów.

W obrębie analizowanych szczepów zidentyfikowano 38 różnych, całych operonów zawierających geny kodujące struktury fimbrialne, a następnie podzielono je na grupy z uwzględnieniem klas patogenności *E. coli* (Rys. 28). W większości patotypów odnaleziono 5 typów struktur fimbrialnych: pile typu 1, fimbrie Yad, Yeh, Yfc (kodowane odpowiednio przez operon *yad*, *yeh* i *yfc*; fimbrie te nie zostały do tej pory dobrze scharakteryzowane) oraz Mat (Ecp, fimbrie typowe, nazywane tak z uwagi na ich szerokie rozpowszechnienie wśród wszystkich szczepów *E. coli*). Niektóre operony wykazują wyraźny związek z konkretnym patotypem, np. pile P, F1C/S, F17-podobne oraz Pix występują tylko u pozajelitowych szczepów *E. coli* (ExPEC, ang. *extraintestinal Escherichia coli*), fimbrie CS1-CFA/I są silnie powiązane ze szczepami UPEC a fimbrie AAF obecne są jedynie u szczepów EAEC.

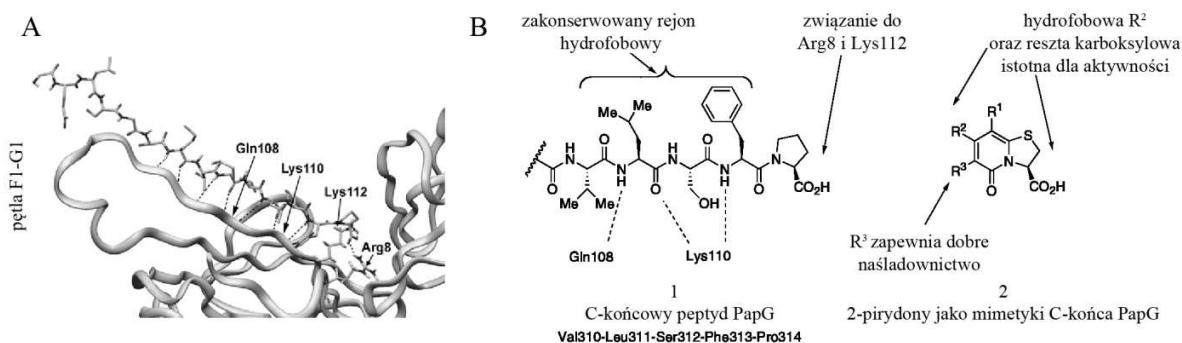


Rys. 28. Dystrybucja operonów kodujących struktury fimbrialne systemu CU wśród patotypów *Escherichia coli*. Krąg w środku reprezentuje połączone sekwencje nukleotydowe 38 operonów. Każdy segment został oznaczony w zewnętrznym okręgu symbolem kladu oraz nazwą struktury fimbrialnej. 36 wewnętrznych kręgów obrazuje obecność operonów u wszystkich analizowanych szczepów. Umieszczona po prawej stronie legenda przypisuje kolory widoczne na wewnętrznych okręgach do konkretnych szczepów i klaspatogenności (Wurpel *et al.*, 2013).

2.6 Pilicydy

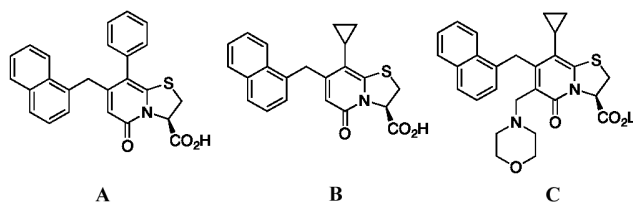
Powszechne nadużywanie antybiotyków doprowadziło do wytworzenia oporności mikroorganizmów na ich działanie. Dlatego też niezbędne jest opracowanie nowych, substancji leczniczych działających w oparciu o inne podejście. Najlepszą metodą jest analiza i wybór dobrze zakonserwowanych wśród bakterii mechanizmów niezbędnych do patogenezы. Jednym z takich celów molekularnych jest mechanizm chaperone-usher obecny u bakterii Gram-ujemnych, a strategią wymierzoną w jego zaburzenie są pilicydy.

Pilicydy – związki zaburzające biogenezę pili – zostały po raz pierwszy otrzymane i opisane przez Svensson i współpracowników (2001). Jako szczegółowy cel nowej klasy substancji antibakteryjnych wybrane zostały białka opiekuńcze, jako obecne wśród wszystkich szczepów ekspresujących struktury adhezyjne budowane drogą chaperone-usher i całkowicie niezbędne do patogenezы, stosunkowo dobrze poznane, a przede wszystkim – wykazujące wysoki stopień homologii sekwencyjnej i strukturalnej. Zbadano strukturę kompleksu chaperonu PapD z C-końcowym peptydem podjednostki PapG, co pozwoliło na poziomie atomowym wyjaśnić mechanizm oddziaływań pomiędzy nimi. Ujawniono dobrze zakonserwowany wśród białek opiekuńczych, kluczowy dla ich działania motyw kotwicy arginino-lizynowej. Motyw ten służy do unieruchomienia C-końca nici F podjednostki i w konsekwencji umiejscawia tę nić w prawidłowym ułożeniu do nici donorowej chaperonu. Mutacje w obrębie tego rejonu całkowicie zatrzymują proces wiązania podjednostek do białka opiekuńczego i w konsekwencji formowanie całej struktury adhezyjnej. Na tej podstawie skonstruowano pochodne 2-pirydonu – związki naśladujące C-terminalny peptyd PapG (Svensson *et al.*, 2001; Pinker *et al.*, 2006; Aberg *et al.*, 2007; Chorell *et al.*, 2010). Związki te zawierają grupę karboksylową zdolną do wytworzenia wiązań z kotwicą argininowo-lizynową chaperonu, podstawnik R^2 naśladujący hydrofobowe reszty Phe313 i Leu311 peptydu PapG (które oddziałują z nicią G1 białka opiekuńczego) oraz umożliwiając, poprzez dopasowanie podstawników R^1 i R^3 , lepsze dopasowania pilicydu do białka opiekuńczego (Rys. 29B).



Rys. 29. Strukturalne podstawy projektowania pilicydów. A - struktura krystaliczna kompleksu chaperone PapD-C-końcowy peptyd podjednostki PapG. B – bicykliczne 2-pirydony (2) – inhibitory białka opiekuńczego – zaprojektowane jako mimetyki C-końcowego peptydu PapG (Aberg *et al.*, 2006).

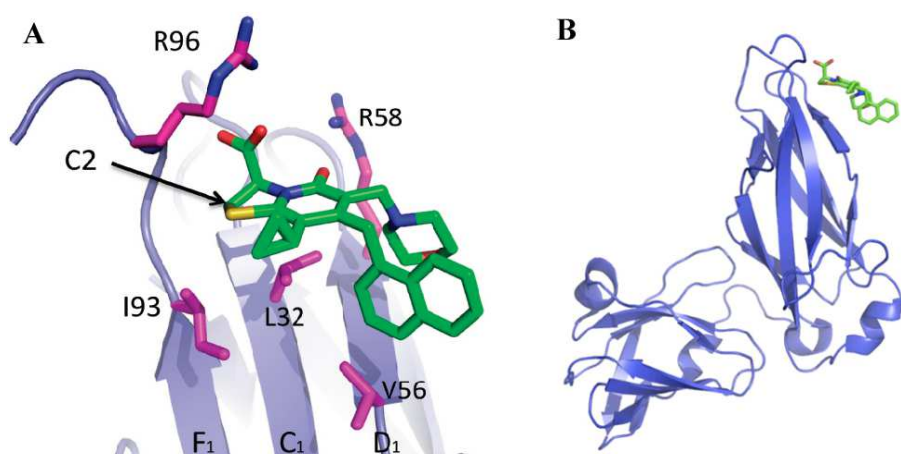
W ten sposób opracowano tzw. pilicydy pierwszej generacji (Rys. 30). Niestety, większość związków tego typu wykazuje małą efektywność. Osiągnięcie pożądanego efektu wymaga zastosowania stężenia na poziomie milimolarnym a to stanowi także poważny problem z rozpuszczalnością tych związków (Rys. 30 A i B). Wprowadzenie do struktury pilicydu podstawnika aminometylenowego w pozycji C6 (Rys. 30 C) rozwiązało ten problem. Tak zbudowane pilicydy redukują zdolność szczepów UPEC do adhezji do komórek pęcherza moczowego oraz zmniejszają ilość produkowanych przez bakterie struktur adhezyjnych na powierzchni ich komórek, a także zapobiegają formowaniu bakteryjnego biofilmu (Pinker *et al.*, 2006).



Rys. 30. Najlepiej poznane pilicydy pierwszej generacji (Pinker *et al.*, 2006).

Badania *in vitro* podważyły pierwotnie zakładany mechanizm oddziaływania pilicydów. Mapowanie przesunięć chemicznych z użyciem białka opiekuńczego FimC znakowanego ¹⁵N ujawniły, że poza rejonem w obrębie międzydomenowej szczeliny w obrębie chaperonu istnieje jeszcze drugie potencjalnie funkcjonalne miejsce oddziaływania pilicydu z białkiem opiekuńczym – w sąsiedztwie pętli F1-G1. Z kolei badania wykorzystujące spektroskopię

NMR z użyciem kompleksu PapD-PapK, w którym szczelina międzydomenowa chaperonu jest zasłonięta przez podjednostkę, oraz pilicydu widocznego na rysunku 30C pokazały, że związek ów zachowuje swoje powinowactwo do kompleksu. Identyczna sytuacja miała miejsce dla badania powinowactwa tego pilicydu do białka PapD z mutacjami w miejscu kotwicy argininowo-lizynowej. Równoczesna krystalizacja pilicydu i PapD ujawniła, że właściwym miejscem wiązania pilicydu jest rejon w obrębie β -nici F1-C1-D1. Zaobserwowano wiązania wodorowe i elektrostatyczne pomiędzy grupą karboksylową pilicydu i resztą Arg96 PapD oraz pomiędzy grupą karbonylową pilicydu i resztą Arg58. Ponadto zaobserwowano, że podstawniki pilicydu znajdują się w bliskim sąsiedztwie hydrofobowej powierzchni tworzonej przez reszty Ile93, Leu32 oraz Val56 białka opiekuńczego (Rys. 31). Rejon ten, dobrze zakonserwowany w rodzinie białek opiekuńczych szlaku chaperone-usher, obejmuje część pętli F1-G1, odpowiedzialnej za oddziaływanie kompleksów chaperone-podjednostka z N-terminalną domeną białka usher (Pinker *et al.*, 2006). Wiązanie pilicydów w tym miejscu nie blokuje więc powstawania kompleksu chaperone-podjednostka (reakcja DSC), uniemożliwia natomiast zajście reakcji DSE.

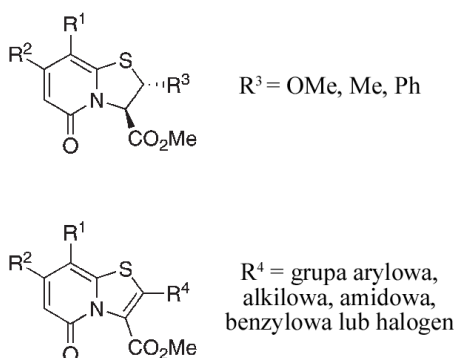


Rys. 31. A - wiązanie pilicydu (kolor zielony) do rejonu zawierającego reszty hydrofobowe (kolor fioletowy). Strzałką zaznaczono węgiel C2, umożliwiający wprowadzenie podstawnika pozwalającego na wytworzenie dodatkowych wiązań z kieszenią wiążącą chaperonu. B – wiązanie pilicydu w miejscu poza szczeliną międzydomenową białka opiekuńczego (Chorell *et al.*, 2010).

Okrycie tego miejsca wiązania pilicydów zostało potwierdzone poprzez wprowadzenie mutacji w miejscu występowania reszty Arg58. Mutant białka opiekuńczego PapD wykazywał niezmienną stabilność oraz prawidłowe oddziaływania z podjednostkami, ale

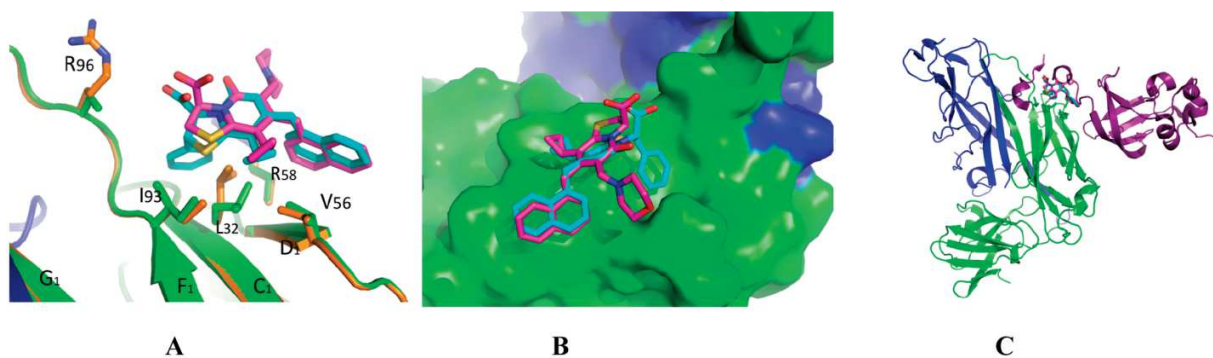
jednocześnie w warunkach *in vivo* z jego udziałem powstawały dysfunkcyjne pile. Tak więc wiązanie pilicydów prowadzi do hamowania biogenezy pili poprzez zablokowanie transportu podjednostek do białka kanałotwórczego i zahamowanie reakcji DSE (Pinker *et al.*, 2006).

Szczegółowa analiza struktury kompleksu białka opiekuńczego PapD z podjednostką PapH i pilicydami pierwszej generacji (Rys. 31A) doprowadziła do zaprojektowania drugiej generacji pilicydów, wykazujących znacząco polepszoną aktywność wiązania (Chorell *et al.*, 2010). Badania te ujawniły występowanie wolnej przestrzeni w okolicy rejonu wiążącego pilicyd. Dzięki wprowadzeniu dodatkowego podstawnika na węglu C2 pilicydu możliwe jest wytworzenie dodatkowych wiązań chaperone-pilicyd, co skutkuje zwiększeniem aktywności biologicznej związku. Pilicydy drugiej generacji (Rys. 32) wykazują efektywne działanie przy stężeniach aż o 1000 razy mniejszych w porównaniu do pilicydów pierwszej generacji (Chorell *et al.*, 2010).



Rys. 32. Pilicydy drugiej generacji (Chorell *et al.*, 2010).

Krystalizacja kompleksów chaperone-podjednostka-pilicyd drugiej generacji ujawniła, że w stosunku do kompleksów z pilicydami pierwszej generacji następuje zmiana konformacyjna w miejscu występowania reszty Leu32. Tworzy się płytką wnęka, która obejmuje wprowadzony podstawnik C2 (Chorell *et al.*, 2010) (Rys. 33).



Rys. 33. A – nałożenie struktur pilicydu drugiej generacji (kolor niebieski) i pierwszej generacji (kolor różowy) związanych do kompleksu PapD-PapH. B – przegrupowanie reszty Leu32 tworzy wnękę dla podstawnika C2 pilicydu drugiej generacji (kolor niebieski). C – kolizja oddziaływań N-terminalnej domeny białka usher FimD (kolor fioletowy) i pilicydów (kolory niebieski i różowy) z kompleksem chaperone-podjednostka (białko opiekuńcze FimC – kolor zielony, podjednostka FimH – kolor granatowy) (Chorell *et al.*, 2010).

3 CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było określenie, czy różnice strukturalne występujące pomiędzy strukturami adhezyjnymi grup FGL i FGS wpływają na przebieg procesu biogenezy tych struktur ze szczególnym uwzględnieniem kluczowych reakcji komplementacji i wymiany nici donorowych.

4 MATERIAŁY

4.1 Szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* BL21(DE3) – szczep *E. coli* będący stabilnym lizogenem λ DE3, zawierający w obrębie chromosomu gen polimerazy RNA T7 pod kontrolą promotora *lacUV5*. Umożliwia to wykorzystanie szczepu do ekspresji genów w układzie Tabora-Studiera.

F- *ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm* (DE3) (Invitrogen).

4.2 Linie komórkowe

- CHO-K1 – linia komórek adherentnych wyprowadzona z jajnika chomika chińskiego (ang. *chinese hamster ovary*). Linia ta charakteryzuje się szybkim tempem wzrostu, 12-14 godzinnym cyklem komórkowym i zdolnością do tworzenia kolonii. Komórki CHO wymagają obecności proliny w podłożu (ATCC CCL-61).
- CHO-DAF⁺ - linia komórek rekombiantowych, powstała na skutek stabilnej transfekcji komórek CHO-K1 ludzim cDNA kodującym czynnik DAF (Lublin *et al.*, 1991).

4.3 Materiał genetyczny

- pBJN406 – plazmid rekombinantowy powstały w wyniku wklonowania insertu zawierającego sekwencję nukleotydową całego operonu *dra* do plazmidu pACYC184. DNA z sekwencją operonu uzyskano przez trawienie enzymem *HindIII* genomowego DNA klinicznego szczepu *E. coli* 075:K5:H. W wyniku transformacji niepatogennych szczepów *E. coli* tym plazmidem otrzymuje się szczepy zdolne do produkcji fimbrii Dr charakterystycznych dla szczepów klinicznych. Ekspresja ta podlega zmienności fazowej zależnej od warunków środowiska. Plazmid pBJN406 zawiera gen oporności na chloramfenikol i tetracyklinę (Nowicki *et al.*, 1987; Goluszko *et al.*, 1997).
- pACYC184 – plazmid zawierający *ori* replikacji p15A oraz gen oporności na tetracyklinę. Szczepy transformowane tym plazmidem używane są jako kontrola negatywna w stosunku do szczepów produkujących fimbrie Dr na bazie plazmidu pBJN406 (Nowicki *et al.*, 1987).

- pCC90 – plasmid rekombinantowy powstały w wyniku wklonowania fragmentu DNA o wielkości 8600 pz, zawierającego sekwencję operonu *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych *draA* i *draF* do niskokopijnego plazmidu pACYC177, pozwalającego na transkrypcję z promotora genu oporności na kanamycynę. Sekwencję nukleotydową insertu otrzymano przez wprowadzenie dodatkowego miejsca rozpoznania dla enzymu *EcoRI* w odległości 45 pz powyżej genu *draB* w plazmidzie pBJN406, a następnie strawienie tego plazmidu restryktazą *EcoRI* i *HindIII*. Uzyskano w ten sposób insert flankowany przez miejsca rozpoznania dla *EcoRI* oraz *HindIII*. Insert ten nie zawiera regionu promotorowego operonu *dra*, przez co ekspresja genów białek fimbrialnych nie podlega mechanizmowi zmienności fazowej (Carnoy i Moseley, 1997).
- pET30b+ - plazmidowy wektor ekspresyjny (5422 pz), posiadający silny promotor $\phi 10T7lac$, terminator transkrypcji faga T7, *ori* replikacji z wektora pBR322 oraz gen oporności na kanamycynę (Novagen).
- pET30b-sygDraBE – plazmid rekombinantowy, otrzymany poprzez wklonowanie do plazmidu pET30b+ insertu zawierającego sekwencje nukleotydowe genów *draB* i *draE* wraz z sekwencjami sygnałnymi i własnymi sekwencjami RBS pod kontrolą wspólnego promotora (Piątek *et al.*, 2005).
- pET30b-sygDraBE- Δ SS – plazmid rekombinantowy będący pochodną plazmidu pET30b-sygDraBE, kodujący białko DraE pozbawione mostka disiarczkowego poprzez zamianę reszt cysteiny na reszty alaniny za pomocą muzagenezy miejscowo-specyficznej (Materiały 2.11). Użyto następujących starterów (podkreślono miejsce zamiany reszty cysteiny na resztę alaniny): 5' CATGCGGAAGAGGCGCAGGTACGGGTT-3' (starter „forward” Cys19Ala) i 5' AACCCGTACCTGGCGCTTCCGCATG-3' (starter „reverse” Cys19Ala) oraz 5'-CAAGCGCTGGGAGGCGGACGCCCGCCAG-3' (starter „forward” Cys51Ala) i 5'-CTGGCGGGCGTCCGCGCTCCCAGCGCTTA-3' (starter „reverse” Cys51Ala).
- pCC90DraE- Δ SS – plazmid rekombinantowy będący pochodną plazmidu pCC90, kodujący białko DraE pozbawione mostków disiarczkowych poprzez zamianę reszt cysteiny na reszty alaniny za pomocą muzagenezy miejscowo-specyficznej (jak wyżej).
- pET30-DraE – plasmid rekombinantowy otrzymany poprzez wklonowanie insertu o długości 441 pz, zawierającego sekwencję nukleotydową genu *draE* bez sekwencji

sygnalnej, do plazmidu pET30b+ w miejscach cięć enzymów *NdeI* oraz *HindIII* (Piątek *et al.*, 2005).

- pET30-DraE-sc – plazmid rekombinantowy będący pochodną plazmidu pET30b+, zawierający (w kolejności od N do C-końca) sekwencję kodującą białko DraE, składającą się z N-terminalnego peptydu sygnalnego, fuzji złożonej z sześciu kolejnych reszt histydyny oraz jednej łącznikowej reszty alaniny, sekwencji kodującej białko DraE bez N-terminalnej nici donorowej GFTPSGTTGTTKLTVT, uzupełnione na C-końcu przez identyczną nici donorową dołączoną przez peptyd łącznikowy DNKQ.
- pET30-N-Nte-DraE-C-Nte – plazmid rekombinantowy będący pochodną plazmidów pET30-DraE i pET30-DraE-sc. Plazmid pET30-DraE-sc wykorzystany został jako matryca do reakcji PCR z następującymi starterami:
 - 5'-tatgagctccgcgcatgctgggttcaccccgagtggcaccaccggcaccaccaaactcacagttaccGAAG AGTGCCAGGTACGGGTTGGTGACCTGACC-3' (starter „forward” – podkreślono sekwencje rozpoznania enzymu *SacI* oraz koniec 3' sekwencji sygnalnej, małymi literami oznaczono sekwencję kodującą nici donorową, dużymi – sekwencję komplementarną)
 - 5'-tataagctttcagtgatggtggtggtgatTTTTGCCAGTAACCCCCGGTCAGGGTCA G-3' (starter „reverse” – podkreślono sekwencję rozpoznania enzymu *HindIII* oraz kodon stop, małymi literami zaznaczono sekwencję domeny histydynowej, dużymi – sekwencję komplementarną). Otrzymany produkt PCR został wklonowany do plazmidu pET30-DraE w miejsca rozpoznania restryktaz *SacI* (na 3'-końcu natywnej sekwencji genu *draE* kodującym sekwencję sygnalną) i *HindIII* (tuż po kodonie stop genu *draE*).

4.4 Podłoża

- Podłoże TSA: [g/l]
 - Tryptic Soy Broth (Sigma) 12
 - Agar (Sigma) 25
- Podłoże stałe LA: [g/l]
 - Trypton (Sigma) 10
 - Ekstrakt drożdżowy (Sigma) 5

Chlorek sodu (NaCl) (Sigma)	10
Agar (Sigma)	15
• Podłoże płynne LB (pH 7,0 -7,2):	[g/l]
Trypton	10
Ekstrakt drożdżowy	5
Chlorek sodu (NaCl)	10

4.5 Antybiotyki

- Ampicylina: roztwór wyjściowy – 100 mg/ml H₂O
- Chloramfenikol: roztwór wyjściowy – 34 mg/ml 70% etanolu
- Kanamycyna: roztwór wyjściowy – 20 mg/ml H₂O

4.6 Odczynniki i roztwory podstawowe

- Agar do podłoża mikrobiologicznych (BTL),
- Alkohol etylowy 96% (Merck),
- Alkohol metylowy (Chempur),
- Bisakrylamid (Sigma),
- Chlorek magnezu sześciowodny (Fluka Analytical),
- Chlorek niklu (Sigma),
- Chlorek sodu (POCh),
- Chlorek wapnia dwuwodny (Fluka Analytical),
- Coomasie Brilliant Blue R-250 (Sigma),
- Glicerol (POCh),
- Glicyna (EUROCHEM),
- Imidazol (Sigma),
- EDTA (sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego) (Sigma),
- IPTG (β -D-1-izopropylotiogalaktozyd) (Sigma),
- Kwas octowy lodowaty (Chempur),
- Nadsiarazan amonu (NH₄)₂S₂O₈ (Serva),
- N,N'-metylenobisakrylamid (Sigma),

- N,N,N',N'- tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Sigma),
- Sacharoza (POCh),
- SDS (sól sodowa siarczanu dodecylu) (Sigma),
- Tris-HCl (hydroksymetyloaminoetan) (Sigma),
- Triton X-100 (Sigma).

4.7 Elektroforeza agarozowa

- Bufor TBE (pH= 8,3) – roztwór podstawowy 10x stężony: [g/l]

Tris-HCl (Sigma)	108
EDTA (Sigma)	9,3
Kwas borowy (Sigma)	55
- Roztwór podstawowy bromku etydyyny, EtBr – 5 mg/ml (Sigma),
- Barwnik do nanoszenia próbek na żel: 6x Orange Loading Dye (Fermentas),
- Marker wielkości: O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 0,5 µg/µl, 50 µg (Fermentas)
- Agarozą (Prona).

4.8 Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

- Żel zagęszczający 5% (objętość żelu: 3 ml): [ml]

H ₂ O	2,1
30% roztwór akrylamidów (29% akrylamidu, 1% N,N'-metylenobisakrylamidu)	0,5
1M Tris-HCl (pH = 6,8)	0,38
10% SDS	0,03
10% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,03
TEMED	0,005
- Żel rozdzielający 15% (objętość żelu: 5 ml): [ml]

H ₂ O	1,1
30% roztwór akrylamidów (29% akrylamidu, 1% N,N'-metylenobisakrylamidu)	2,5
1M Tris-HCl (pH = 8,8)	1,3

- | | |
|---|-------|
| 10% SDS | 0,05 |
| 10% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ | 0,05 |
| TEMED | 0,005 |
- Roztwory do prowadzenia elektroforezy:
 - Tris-Glicyna - roztwór podstawowy 5x stężony (pH 8,3):

Tris-HCl	15,1 g
Glicyna (Sigma)	94 g
10% SDS	50 ml
Woda destylowana	do 1000 ml
 - Roztwór zabarwiający:

Metanol (Sigma)	50 ml
Lodowaty kwas octowy (Sigma)	10 ml
Coomasie Brilliant Blue R-250	0,25 g
Woda destylowana	40 ml
 - Roztwór odbarwiający:

Metanol	300 ml
Lodowaty kwas octowy	100 ml
Woda destylowana	600 ml
 - Barwnik do nanoszenia próbek na żel: 0,25% błękit bromofenolowy, 10% glicerol, 10% SDS, 1 M β-merkaptoetanol, 1 M Tris-HCl (pH 6,8),
 - Marker wielkości: 14,4, 18,4, 25, 35, 45, 66,2, 116 kDa (Fementas)

4.9 Odczynniki do przygotowania komórek kompetentnych *E. coli* i transformacji

- Podłoże płynne LB,
- Chlorek wapnia, CaCl₂ (Sigma) – roztwór 100 mM, autoklawowany.

4.10 Materiały i odczynniki do izolacji czystego plazmidowego DNA

- Bufor L1: 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA,
- Bufor L2: 0,2 M NaOH, 1% SDS,

- Bufor L3: 3 M octan potasu (pH = 4,8),
- Roztór G: 8 M chlorowodorek guanidyny (Sigma),
- 96% etanol,
- Bufor TE (pH = 8,0): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,
- Kolumnienki ze złożem krzemionkowym (A&A Biotechnology).

4.11 Odczynniki i materiały do mutagenyzy miejscowo specyficznej

- Zestaw QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene):
 - Polimeraza DNA *PfuTurbo* (2,5 U/ μ l),
 - Bufor do reakcji PCR (10x stężony),
 - Roztwór trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP),
 - Restryktaza *DpnI* (10 U/ μ l).

4.12 Odczynniki i materiały do techniki Western blotting

- Poliklonalne królicze przeciwciała monospecyficzne anty-DraE (Immunolab),
- Drugorzędowe przeciwciała kozie antykrólicze znakowane peroksydazą chrzanową,
- Bufor do transferu białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową (pH 8,3):

Tris-HCl	3,03 g
Glicyna	14,4 g
Metanol 20%	200 ml
H ₂ O	do 1000 ml

- Bufor TBST (pH 7,5):

Tris-HCl	2,42 g
NaCl 500 mM	29 g
Tween 20 0,05% *(Sigma)	500 μ l
H ₂ O	do 1000 ml

- Odtłuszczone mleko w proszku (SM Gostyń),
- Bibuła Whatman (Sigma),
- Błona nitrocelulozowa (45 μ m, Sigma),

- Marker białkowy PageRuler Plus: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 i 250 kDa (Sigma),
- Substrat dla peroksydazy chrzanowej – 3,3'-diaminobenzzydina (DAB, pH 7,6) (Sigma),
- 30% roztwór H₂O₂ (Sigma).

4.13 Odczynniki do wykrywania mostków disiarczkowych

- Odczynnik Ellmana – kwas 5,5'-ditiobis(5-nitrobenzoesowy (DNTB) (Sigma)
- Jodoacetamid (Sigma),
- 6 M GuHCl-0,1 M Tris-HCl (pH 8,0),
- 10 mM ditiotreitrol (DTT) (Sigma),
- 0,1 M bufor fosforanowy (pH 8,0).

4.14 Odczynniki do izolacji frakcji fimbrialnej

- Bufor PBS (pH 7,5)

80 mM Na ₂ HPO ₄	28,67 g
20 mM NaH ₂ PO ₄	2,76 g
100 mM HCl	5,85 g
H ₂ O	do 1000 ml
- 40% (NH₄)₂SO₄ w buforze PBS,
- Błona dializacyjna (MWCO > 10 kDa) (Sigma).

4.15 Odczynniki do izolacji białek z frakcji periplazmatycznej

- Bufor sacharozowy (pH 8,0)
 - 20% sacharoza,
 - 20 mM Tris-HCl,
 - 5 mM EDTA.
- 10 mM MgCl₂.

4.16 Odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej (immunodetekcji fimbrii Dr)

- bufor PBS (pH 7,5),

- przeciwciała pierwszorzędowe: królicze przeciwciała anty-DraE (Immunolab),
- przeciwciała drugorzędowe: kozie przeciwciała antykrólicze znakowane fluoresceiną (Sigma),
- olejek immersyjny (Olympus),
- szkiełka mikroskopowe (76 × 26 mm), szkiełka nakrywkowe (15 × 15 mm) (Medlab).

4.17 Odczynniki do hodowli linii komórkowych

- pożywka minimalna (MEM, ang. *minimal essential medium*) (Gibco),
- 10% płodowa surowica bydlęca (FBS, ang. *fetal bovine serum*) (Gibco),
- 0,5% trypsyna (Sigma),
- 0,2% EDTA (Sigma),
- Pożywka Ham's F12 (Sigma),
- Penicylina, streptomycyna (Sigma).

4.18 Odczynniki i materiały stosowane w barwieniu metodą Giemsy

- Barwnik Giemsy (Sigma),
- 70% metanol
- Jałowa woda.

4.19 Odczynniki i materiały do testu adherencji do linii komórkowej CHO

- Szkiełka nakrywkowe,
- Płytki 6-dołkowe polistyrenowe (Thermo),
- Kofluentne hodowle linii komórkowych CHO-DAF⁻ i CHO-DAF⁺,
- Bufor PBS,
- płytki z podłożem TSA (ang. *tripticase soy agar*) (Sigma),
- DMSO (Sigma).

4.20 Odczynniki i materiały do testu hemaglutynacji

- Płytki 12-dołkowe polistyrenowe (Thermo),
- Płytki TSA,
- Bufor PBS,
- Ludzkie erytrocyty wyizolowane z próbki krwi grupy 0 zdrowego ochotnika,
- D-mannoza (Sigma),
- Chloramfenikol (Sigma).

4.21 Odczynniki i materiały do testu wiązania kolagenu

- Płytki do mikromiareczkowania z polistyrenu (Thermo),
- Ludzki kolagen typu IV (Sigma),
- Bufor PBS,
- Bufor blokujący: 1% BSA w PBS,
- Przeciwciała poliklonalne królicze anty-DraE (Immunolab),
- Przeciwciała kozie antykrólicze IgG znakowane peroksydazą chrzanową (Sigma)
- Substrat dla peroksydazy chrzanowej Sigma Fast o-fenylendiaminy (Sigma),
- Bufor do rozcieńczania przeciwciał: 0,2% BSA w PBS.

4.22 Odczynniki i materiały do analizy densytometrycznej

- Zestaw kalibracyjny SDS-low-molecular-weight calibration kit: 14,4, 20,1, 30, 45, 66 i 97 kDa (GE Healthcare).

4.23 Odczynniki i bufony do chromatograficznego oczyszczania białek na kolumnie niklowej

- Roztwór do przechowywania złoża w temperaturze 4°C: 20% etanol,
- Kolumna ze złożem Ni²⁺-IDA-His-Bind-Resin (Novagen),
- Roztwory do regeneracji złoża: 2% roztwór SDS, 200 mM roztwór EDTA, nasycony roztwór NiCl₂,
- Bufory płuczące (pH 7,5):
Bufor nr 1: 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy, 5 mM imidazol,

Bufor nr 2: 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy, 20 mM imidazol,

Bufor elucyjny (pH 7,5): 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy, 0,5 M imidazol.

4.24 Bufory i materiały do dializy preparatów białkowych

- 20 mM bufor fosforanowy, pH 7,5, 100 mM NaCl

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,575 g
Na ₂ HPO ₄	11,57 g
NaCl	29,2 g
H ₂ O	do 5000 ml

- Błona dializacyjna (MWCO 12,4 kDa) (Sigma).

4.25 Odczynniki i materiały do chromatografii rozmiarów wykluczających

- Kolumna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare),
- Kolumna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare),
- Pętla o objętości 500 µl,
- Zestaw kalibracyjny LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare),
- Blue Dextran 2000 (GE Healthcare).

4.26 Aparatura

- Aparat do elektroforezy agarozowej (DNA Gdańsk II),
- Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej (DNA Gdańsk II),
- Aparat VersaDoc z oprogramowaniem Quantity One (BioRad),
- Autoklaw Classic 2100 (Prestige Medical),
- Aparat do techniki Western Blotting (Fermentas),
- Ciepłarka laboratoryjna TB2 (Pozamet, Polska),
- Czytnik płytek ELISA Victor3V (PerkinElmer),
- Inkubator CO₂ (HERA cell 150, Heraeus),
- Kolumna do zagęszczania Amicon Ultra 15 ml 10K (Millipore)
- Kolumna do odcinania Durapore PVDF 0,1µm (Millipore),

- Komora laminarna (HERA safe K212, Heraeus),
- pH-metr (Hanna Instruments),
- Mikrowirówka 1-15 nr 12124 PP 214/98, max 24 x 5 g 14000 min⁻¹ (Sigma),
- Mikrowirówka 3K 30 nr 19776-H 118/F, max 6 x 80 g 14000 min⁻¹ (Sigma),
- Mikroskop immunofluorescencyjny Olympus (CKX41),
- Pompa perystaltyczna EP-1 Econo Pump (Bio-Rad)
- Skanujący mikrokalorymetr różnicowy CSC 6300 Nano-DSC-III (CSC),
- Spektrofotometr (Pharmacia),
- System od oczyszczania metodą FPLC, ÄKTApurifier UPC 10, system do zbierania frakcji Frac 920, Unicorn 6.1 (GE Healthcare),
- Termoblok (DNA Gdańsk II),
- Transiluminator UV (Sigma),
- Waga laboratoryjna PLS 510-3 (Kern),
- Wirówka 3K 1S (Sigma),
- Wirówka Multifuge 1 S-R (Heraeus),
- Wytrząsarka laboratoryjna (DNA Gdańsk II),
- Wytrząsarka Classic C24 (New Brunswick Scientific),
- Zasilacz prądu stałego EPS 301 (Amersham Biosciences).

5 METODY

5.1 Hodowle bakteryjne

- Hodowle *Escherichia coli* na pożywce płynnej LB (Materiały 4.4) prowadzono w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 37°C (chyba, że zaznaczono inaczej),
- Hodowle *Escherichia coli* na podłożu stałym LA lub TSA (Materiały 4.4) na płytkach Petriego prowadzono w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

W razie potrzeby do hodowli dodawano odpowiednie antybiotyki (1µl/ml) (Materiały 4.5): ampicylinę, chloramfenikol, kanamycynę. W przypadku badania działania pilicydów pożywka została wzbogacona w 5% DMSO (pilicydy zostały rozpuszczone w czystym DMSO) oraz roztworami pilicydów o stężeniu 0,5, 1,5, 2,5 i 3,5 mM.

5.2 Hodowla i pasażowanie linii komórkowych CHO

Linie komórkowe CHO i CHO-DAF⁺ hodowane były w pożywce F-12K (ATCC) z dodatkiem 10% (v/v) FBS i roztworu penicyliny-streptomycyny (Materiały 4.17) w butelkach o powierzchni 75 cm² (T-75) w 37°C w atmosferze 5% CO₂. Pasażowanie przebiegało zgodnie z poniższą procedurą (wszelkie czynności prowadzono w komorze laminarnej przy zachowaniu sterylnych warunków):

- Usunięcie pożywki z hodowli komórkowej,
- Dodanie roztworu trypsyny-EDTA (2-3 ml), umieszczenie butelki z hodowlą w cieplarni (37°C) na 2 minuty, delikatne mieszanie celem odklejenia i dyspersji komórek,
- Dodanie 6-8 ml świeżej pożywki, delikatne mieszanie,
- Dodanie odpowiednich porcji zawiesiny komórkowej w stosunku 1:4 do 1:8 do nowych butelek hodowlanych z pożywką F12 (z dodatkiem 10% FBS i roztworu penicyliny-streptomycyny)
- Inkubacja w 37°C (5% CO₂) przez 24 godziny,
- Analiza mikroskopowa wzrostu hodowli.

5.3 Izolacja plazmidowego DNA

DNA z 1,5-3 ml hodowli bakteryjnej izolowano wg. procedury dołączonej do zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology) przy użyciu odczynników wymienionych w rozdziale Materiały 4.10.

5.4 Przygotowanie komórek kompetentnych i ich transformacja DNA plazmidowym

Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli* prowadzone było według standardowej procedury (Sambrook *et al.*, 1989), z wykorzystaniem odczynników opisanych w Materiałach 4.9. Transformacja uzyskanych komórek wykonana była według standardowej procedury (Sambrook *et al.*, 1989).

5.5 Ekspresja genów w szczepie bakteryjnym *E. coli* BL21(DE3)

W celu wyprodukowania białka w szczepie *E. coli* BL21(DE3) zaszczepiono pojedyncze kolonie tych komórek w kilku partiach niewielkiej ilości pożywki płynnej LB (6 partii po ok. 25 ml) z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku (1 μ l/ml). Hodowlę prowadzono następnie w 37°C z wytrząsaniem (160 obrotów/minutę) przez ok. 18 godzin. Następnie hodowlę odmłodzono poprzez dodanie każdej jej partii do 6 kolb z grzebieniem zawierających po 600 ml LB z antybiotykiem (1 μ l/ml) i ponownie umieszczono w wytrząsarce na 3 godziny w temperaturze 37°C. Indukcja ekspresji następowała poprzez dodanie 1M IPTG (0,5 μ l/ 1 ml hodowli). Od tego momentu hodowle bakteryjne wytrząsano dalej w temperaturze 37°C przez kolejne 2 godziny. Ekspresję prowadzono z wykorzystaniem szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE, BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE- Δ SS, BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS, BL21(DE3)/pET30DraE, BL21(DE3)/pET30-N-Nte-DraE-C-Nte (Materiały 4.2).

5.6 Izolacja frakcji fimbrialnej

Izolacja frakcji fimbrialnej z hodowli *E. coli* prowadzona była dwoma metodami: metodą mechanicznego oddzielenia przez worteksowanie oraz metodą opartą na szoku termicznym. Metoda mechaniczna obejmowała następujące etapy:

- Hodowla bakterii przez 24 godziny na płytkach z podłożem LA/TSA z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku,
- Zebranie komórek bakteryjnych z powierzchni płytek za pomocą jałowej głaszczki i zawieszenie ich w buforze PBS (Materiały 4.14) do uzyskania OD₆₀₀ równego 1,
- Energiczne worteksowanie zawiesiny przez 15 minut w temperaturze pokojowej,
- Wirowanie zawiesiny (10000 obrotów/minutę) i zebranie supernatantu zawierającego frakcje fimbrialne.

Metoda szoku termicznego przebiegała w następującej kolejności:

- Zawieszenie kolonii bakteryjnej w buforze PBS (1 kolonia na 400 µl buforu),
- Posiew przygotowanych zawiesin na płytce z podłożem LA z dodatkiem antybiotyku (350 µl zawiesiny na każdą płytkę),
- Inkubacja płytek w temperaturze 37°C przez dobę,
- Zebranie hodowli z każdej płytki i zawieszenie w 15 ml buforu PBS, worteksowanie zawiesin przez 1 minutę,
- Inkubacja zawiesin w łaźni wodnej przez godzinę w temperaturze 65°C,
- Wirowanie zawiesiny przy 6000 obrotów/minutę przez 10 minut, zebranie supernatantu,
- Precypitacja białek za pomocą 40% roztworu siarczanu amonu w PBS (Materiały 4.14) przez noc w temperaturze 4°C,
- Wirowanie wytrąconych białek przy 2500 obrotów/minutę przez 30 minut w temperaturze 4°C i zawieszenie ich w 3 ml buforu PBS,
- Dializa do buforu PBS (1 l) przez noc w temperaturze 4°C (objętość dializowanego izolatu: 3 ml).

5.7 Izolacja frakcji periplazmatycznej

Wyzolowanie frakcji periplazmatycznej z komórek *Escherichia coli* obejmuje wykonanie następujących czynności:

- wirowanie hodowli bakteryjnej: 4000 obrotów/minutę, 15 minut, 4°C,
- zawieszenie osadu z całej objętości hodowli w buforze sacharozowym (osad z każdej kolby hodowlanej zawieszają się w ok. 5 ml buforu) (Materiały 4.15),
- dopełnienie każdej części zawiesiny buforem sacharozowym do objętości 50 ml,

- inkubacja w temperaturze pokojowej przez 10 minut,
- wirowanie próbek: 5000 obrotów/minutę, 20 minut, 4°C,
- zawieszenie otrzymanego osadu w 10 mM MgCl₂ (Materiały 4.15) (otrzymując 4 próbówki po 50 ml zawiesiny),
- inkubacja w lodzie przez 15 minut,
- wirowanie: 7000 obrotów/minutę, 10 minut, 4°C,
- zebranie supernatantu zawierającego frakcję periplazmatyczną (przechowywanie do dalszych analiz w 4°C).

5.8 Oczyszczanie białek metodą chromatografii metalopowinowactwa

Proces oczyszczania białek zawartych w wyizolowanej frakcji periplazmatycznej na kolumnie obejmuje wymienione niżej etapy:

- Kondycjonowanie kolumny Ni²⁺-IDA-His-Bind-Resin przy pomocy buforu płuczącego nr 1 (ok. 5 objętości kolumny) (Materiały 4.23),
- Naniesienie na kolumnę preparatu, po uprzednim ustaleniu jego pH (poprzez zmieszanie równych objętości wyizolowanej frakcji periplazmatycznej w roztworze 10 mM MgCl₂ i buforu płuczącego nr 1),
- Płukanie złoża kolumny buforem płuczącym nr 1 (1 litr) z przepływem wymuszonym ok. 7 ml/minutę (pompa perystaltyczna, Materiały 4.26),
- Płukanie złoża kolumny buforem płuczącym nr 2 (1 litr) z przepływem wymuszonym ok. 7 ml/minutę,
- Zamknięcie odpływu kolumny i dodanie pierwszej porcji buforu elucyjnego (5 ml), wymieszanie buforu ze złożem i pozostawienie do osadzenia złoża, spuszczenie buforu elucyjnego wraz z białkiem do jałowej probówki (elucja grawitacyjna),
- Dodanie drugiej porcji (5 ml) buforu elucyjnego do kolumny, zebranie eluowanego białka do kolejnej probówki,
- Dodanie dwóch kolejnych porcji (2x5 ml) buforu w analogiczny sposób.

Łącznie objętość frakcji elucyjnej wynosiła 20 ml.

5.9 Dializa preparatów białkowych

Dializa ma na celu otrzymanie białka w odpowiednim buforze, który został wybrany jako najbardziej optymalny do dalszych etapów badań. W celu usunięcia pozostałości imidazolu dializie poddawano białko oczyszczone wstępnie metodą chromatografii metalopowinowactwa. Przeprowadzono następujące czynności (w sposób jak najbardziej jałowy, wykluczając możliwość zanieczyszczenia białka proteazami):

- gotowanie błony dializacyjnej (Materiały 4.24) aż do jej otwarcia,
- przemycie błony jałową wodą (od wewnątrz i z zewnątrz),
- zamknięcie jednego końca błony w jałowej probówce Eppendorfa, umieszczenie w utworzonym zbiorniczku analizowanego roztworu białka (20 ml), zamknięcie drugiego końca błony w analogiczny sposób,
- umieszczenie błony dializacyjnej zawierającej białko w kolbie zawierającej 2 l jałowego buforu dializacyjnego (Materiały 4.24) na noc w temperaturze 4°C, a następnie przełożenie błony do nowej porcji (3 l) tego samego buforu i dializowanie przez kolejną dobę w 4°C.

5.10 Chromatografia rozmiarów wykluczających

Chromatografia ta zwana też sączeniem molekularnym, jest techniką umożliwiającą analityczny bądź preparatywny rozdział substancji różniących się masą cząsteczkową.

Przygotowanie zestawu z kolumną do sączenia próbek zawierających białka polega na:

- Skalibrowaniu kolumny przy pomocy gotowego zestawu (Materiały 4.25),
- Wyznaczeniu objętości martwej kolumny za pomocą odczynnika Blue Dextran 2000,
- Skondycjonowaniu kolumny buforem elucyjnym do uzyskania stabilnej linii bazowej przy pomiarze absorbancji przy 280 nm.

Do sączenia analitycznego stosuje się system do oczyszczania metodą FPLC (Materiały 4.26). Stosuje się nastrzyk 0,3 ml oraz przepływ 0,25 ml/minutę. Detekcja przebiega z użyciem fali o długości 280 nm.

5.11 Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących została przeprowadzona według standardowej procedury (Shapiro *et al.*, 1967).

5.12 Test retardacji białek w żelu SDS-PAGE

Ocena stabilności kinetycznej białek wykonana została z użyciem testu opóźnienia migracji w żelu poliakrylamidowym (opis założeń teoretycznych tej metody zawarto w rozdziale Część teoretyczna, 2.4.2 Mostek disiarczkowy podjednostek).

Próbki białek zmieszano z buforem Laemmli, po czym inkubowano je w temperaturach 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 oraz 100°C przez 10 minut. Po upływie tego czasu naniesiono je na 15% żel poliakrylamidowy (Materiały 4.8) i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny (Metody 5.11), a następnie żele zabarwiono barwnikiem Coomassie Blue.

5.13 Detekcja mostków disiarczkowych

Detekcja mostków disiarczkowych możliwa jest przy użyciu pośredniej metody z użyciem odczynnika Ellmana (Materiały 4.13). Odczynnik ten służy do bezpośredniego wykrywania obecności wolnych grup tiolowych - reakcja DNTB z nimi prowadzi do powstania disiarczku i kwasu 2-nitro-5-tiolobenzoesowego (TNB). Ilość wydzielonego TNB jest mierzona przez absorbcję anionu TNB^{2-} przy długości fali 412 nm.

Pierwszym etapem w wykrywaniu mostków disiarczkowych była karboksymetylacja próbki z użyciem jodoacetamidu, co doprowadziło do modyfikacji wolnych grup tiolowych, natomiast nie naruszyło istniejących mostków disiarczkowych. Próbka została następnie poddana denaturacji przy pomocy 6 M Gu-HCl-0,1 M Tris-HCl (Materiały 4.13) i redukcji mostków disiarczkowych przy pomocy 10 mM DTT (2 godziny). Aby usunąć nadmiar DTT przeprowadzono dializę próbki w buforze do detekcji zawierającym 0,1 M fosforan (pH 8,0). Detekcja uzyskanych wolnych grup tiolowych, które tworzyły mostki disiarczkowe została przeprowadzona przez poddanie próbki działaniu roztworu zawierającego 10 mM DTNB i 0,1 M buforu fosforanowego. Zmierzono absorbcję próbki przy 412 nm i wyliczono stężenie tioli dla absorbcji molowej anionu TNB ($E_{412} = 1,415 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$).

5.14 Analiza Western Blot

Analiza Western Blot pozwala na wykrywanie białek z użyciem specyficznych dla nich przeciwciał. W prowadzonych badaniach technika ta służyła potwierdzeniu denaturacji fimbrii Dr do podjednostek DraE, identyfikacji białek zawartych w frakcjach elucyjnych po chromatografii rozmiarów wykluczających, a także do analizy izolowanych frakcji fimbrialnych pod kątem zawartości w nich białka DraE- Δ SS.

Po przeprowadzeniu elektroforezy analizowanych białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Materiały 5.11) wykonano elektrotransfer białek z żelu na błonę nitrocelulozową. Na powierzchni aparatu będącej elektrodą naładowaną dodatnio umieszczono trzy przycięte bibuły Whatmana, uprzednio zamoczone w buforze do transferu (Materiały 4.12). Na warstwę bibuły położono identycznie przyciętą błonę nitrocelulozową, również namoczoną w buforze do transferu. Na błonie umieszczono żel z rozdzielonymi białkami, wcześniej przepłukany kilkakrotnie buforem do transferu – spomiędzy błony i żelu usunięto dokładnie wszystkie powstałe pęcherze powietrza. Na żelu ułożono kolejne trzy warstwy bibuły Whatmana, po czym powstały stos przykryto wiekiem aparatu (elektroda naładowana ujemnie). Transfer białek prowadzono przy natężeniu prądu wynoszącym 0,8 mA na cm² żelu przez 1 godzinę. Po upływie tego czasu błonę umieszczono w buforze blokującym (TBST z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka w proszku; Materiały 4.12) i poddano inkubacji w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę z wytrząsaniem (lub równorzędnie inkubowano w 4°C przez noc). Następnie przepłukano błonę trzy razy buforem TBST, po czym umieszczono ją na godzinę w roztworze króliczych przeciwciał pierwszorzędowych anti-DraE w buforze TBST w rozcieńczeniu 1:500 (temperatura pokojowa). Po tym czasie wykonano płukanie błony buforem TBST (trzykrotne), a następnie błonę inkubowano przez godzinę w buforze TBST z przeciwciałami drugorzędowymi anti-króliczymi (rozcieńczenie 1:2000). Po ponownym trzykrotnym wypłukaniu błony buforem TBST umieszczono ją w roztworze zawierającym DAB i H₂O₂ (substraty dla peroksydazy chranowej). W miejscu rozpoznania analizowanych białek przez przeciwciała pierwszorzędowe obserwuje się brunanty prążek. W momencie, gdy zaczyna się pojawiać tło reakcja była przerywana przez usunięcie roztworu i przepłukanie błony wodą. Przechowywano ją w stanie osuszonym bez dostępu światła.

5.15 Mikroskopia immunofluorescencyjna

Mikroskopia immunofluorescencyjna umożliwiła immunodetekcję fimbrii Dr na powierzchni komórek szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pCC90DraE-ΔSS a także ocenę zdolności adherencji szczepu BL21(DE3)/pBJN406 i BL21(DE3)/pACYC184 do komórek linii CHO. Aby uzyskać preparaty do mikroskopii immunofluorescencyjnej należało wykonać etapy:

- Prowadzenie hodowli odpowiednich szczepów bakteryjnych na pożywce LB w 37°C przez 24 godziny,
- Całkowite zwirowanie hodowli, delikatne ich przemycie oraz zawieszenie w budorze PBS do uzyskania stężenia 10^5 - 10^6 komórek/ml,
- Inkubacja zawiesin komórkowych z przeciwciałami pierwszorzędowymi w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę,
- Trzykrotne przemycie mieszaniny buforem PBS z dodatkiem 10% (v/v) glicerolu,
- Inkubacja próbek z przeciwciałami drugorzędowymi związanymi z barwnikiem fluorescencyjnym (IgG-FITC) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej,
- Umieszczenie próbek na szkiełkach podstawowych i obserwacja ich za pomocą mikroskopu immunofluorescencyjnego (Materiały 4.26).

5.16 Kalorymetria

Analiza kalorymetryczna wykonana została za pomocą różnicowego mikrokalorymetru skanującego (Materiały 4.26), wyposażonego w celkę kapilarną o objętości 0,299 ml. Zakres temperatur podczas eksperymentów wynosił 5-95°C. Dane zebrane zostały za pomocą programu DCSRUn.

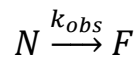
W każdym eksperymencie stężenie badanego białka w próbce wynosiło ok. 1 mg/ml. Próbki badane były przy różnym tempie skanowania (0,5, 1, 1,5, 2°C/minutę). Przed umieszczeniem w celkach, próbki zostały poddane odgazowaniu przez mieszanie w komorze próżniowej przez 10 minut w temperaturze pokojowej (procedurę tę wykonano zarówno dla próbki zawierającej białko, jak i dla próbki odnośnikowej, zawierającej bufor podializacyjny (Materiały 4.24)). Po odgazowaniu, próbki zostały naniesione do celek kalorymetru. Celki te poddawane są podczas analizy działaniu nadciśnienia (0,3 MPa) w celu uniknięcia odgazowania próbek w czasie skanowania. Odwracalność procesu denaturacji termicznej badano poprzez sprawdzenie powtarzalności lini kalorymetrycznych podczas drugiego skanu

grzania próbki (następującym po schłodzeniu celek po pierwszym skanie oraz dodatkowych 30 minutach równoważenia w niskiej temperaturze). Badanie obejmuje wyznaczenie linii bazowej, którą odejmuje się po zakończeniu eksperymentu od linii skanów, uzyskując termogramy DSC.

Proces denaturacji białek stabilnych kinetycznie podczas analizy kalorymetrycznej wykazuje silną zależność pomiędzy tempem skanowania a temperaturą denaturacji. Dla wyjaśnienia tego fenomenu należy odnieść się do modelu denaturacji białek, wyrażonego za pomocą równania Lumry-Eyring:



W równaniu tym N oznacza formę natywną białka, U – formę zdenaturowaną, a F formę finalną, która powstaje w sposób nieodwracalny z formy zdenaturowanej. Model ten zakłada, że na drodze do finalnej formy zdenaturowanej istnieją co najmniej dwa pośrednie etapy: odwracalna denaturacja formy natywnej oraz nieodwracalna zamiana formy zdenaturowanej na formę finalną, niezdolną do powrotu do formy natywnej. Jeżeli etap przemiany na nieodwracalną formę charakteryzować się będzie wysoką stałą szybkości, to model można uprościć do modelu dwustanowego:



gdzie k_{obs} – obserwowalna stała szybkości, ograniczona energią aktywacji wynikającą z konformacji stanu przejściowego.

Dla eksperymentalnych danych z kalorymetrii zastosowano dopasowanie linii skanowania za pomocą metody najmniejszych kwadratów według równania:

$$C_p^{ex} = \frac{1}{v} \Delta H \exp \left[\left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] \right] \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{T_0}^T \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T} \right) \right] dT \right\}$$

gdzie C_p^{ex} – pojemność cieplna, v – temperaturowa prędkość skanowania, ΔH – entalpia denaturacji (stała w zakresie temperatury denaturacji), E_a – energia aktywacji, R – stała gazowa, T^* - temperatura, w której $k = 1 \text{ min}^{-1}$ (Sanchez-Ruiz, 1992). W celu weryfikacji metody zastosowano następujące anamorfozy krzywych eksperymentalnych: zależność $\ln C_p^{ex}$ od odwrotności wartości temperatury, zależność odwrotności wartości temperatury od

$\ln[vC_p^{ex}/(Q_t - Q)]$ oraz zależność $(1 - Q/Q_t)^v$ od temperatury (gdzie Q_t – całkowite ciepło pochłonięte podczas przejścia (entalpia kalorymetryczna), Q – ciepło zaabsorbowane podczas ogrzewania białka od temperatury odniesienia T_0 (temperatura początkowa przejścia) do temperatury T . W przypadku otrzymania dla każdej prędkości grzania krzywych anamorficzyńch o zbliżonym kształcie przyjmuje się, że model dwustanowy dobrze opisuje proces denaturacji (Kurganov *et al.*, 1997).

5.17 Synteza pilicydów

Synteza pilicydów przeprowadzona została w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej zgodnie z procedurą opracowaną przez Svensson i współpracowników oraz Aberg i współpracowników (Svensson *et al.*, 2001; Aberg *et al.*, 2005). W związku z niską rozpuszczalnością kwasowych form tych związków, w eksperymentach wykorzystano ich sole litu. Otrzymane roztwory pilicydów zostały zliofilizowane. W celu wykorzystania ich w eksperymentach, związki te zostały rozpuszczone w czystym DMSO. Stężenie DMSO w hodowlach podczas eksperymentów wynosiło 5% (DMSO dodawano do pożywek w celu zapewnienia rozpuszczenia pilicydów).

5.18 Test adherencji szczepów *E. coli* Dr+ do komórek linii CHO

W teście wykorzystano linie komórkowe CHO oraz CHO-DAF⁺. Obie linie komórkowe zostały przeniesione do płytek 6-dołkowych i hodowane przez 18-24 godzin w pożywce F12 z dodatkiem 10% FBS i roztworu penicyliny-streptomycyny (37°C, 5% CO₂). Przed wykonaniem testu komórki przepłukano dwukrotnie PBS, po czym inkubowano w porcji świeżej pożywki F12 bez antybiotyków, z dodatkiem 1% FBS przez 1 godzinę.

Szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 hodowano z wytrząsaniem w pożywce LB z dodatkiem chloramfenikolu przez dobę w 37°C. Następnie 100 µl hodowli wysiano na płytce TSA z dodatkiem 5% DMSO i chloramfenikolu oraz pilicydów w stężeniach 0 (kontrola negatywna), 0,5, 1,5, 2,5 oraz 3,5 mM. Hodowlę na płytkach TSA prowadzono przez kolejną dobę w 37°C. Jako kontrolę negatywną wykorzystano hodowlę szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pACYC184 na płytkach TSA bez dodatku pilicydów. Po upływie doby, komórki zebrano z płytek, dwukrotnie przepłukano PBS i zawieszono w świeżej porcji PBS do uzyskania OD₆₀₀ równego 1,5.

Z zawiesiny każdego szczepu bakteryjnego pobrano następnie po 50 μl i dodano je do 4 studzienek płytek ze szkiełkami nakrywkowymi zawierających komórki CHO-DAF⁺ lub CHO-DAF⁻. Płytki inkubowano w 37°C (5% CO₂) przez 1,5 godziny. Po tym czasie studzienki przepłukano trzy razy za pomocą PBS, komórki utrwalono 70% metanolem i zabarwiono barwnikiem Giemsy (3 min., 37°C) w celu uwidocznienia związanych komórek bakteryjnych. Szkiełka nakrywkowe analizowano przy pomocy odwróconej mikroskopii z użyciem obiektywu z kontrastem fazowym. Na każdym szkiełku analizowano 40 komórek CHO. Dla każdej kombinacji szczepu bakteryjnego i kultury komórkowej wykonano trzy niezależne eksperymenty (każdy z użyciem nowej hodowli bakteryjnej, świeżych kultur komórkowych i świeżych pożywek) w czterech powtórzeniach uzyskując zestaw 12 danych, które następnie zostały przeanalizowane statystycznie. Otrzymane wartości adherencji są wyrażone jako stosunek procentowy średniej wartości adherencji w odniesieniu do kontroli pozytywnej (CHO-DAF⁺) z uwzględnieniem odchylenia standardowego.

5.19 Test hemaglutynacji

W celu oszacowania aktywności pilicydów wykonano test hemaglutynacji. Test ten opiera się na oddziaływaniu pomiędzy fimbriami Dr a receptorem DAF. Bakterie *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 i BL21(DE3)/pACYC184 (kontrola negatywna) hodowane były na płytkach TSA (Materiały 2.20) z dodatkiem 3,5 mM pilicydu bądź bez dodatku (w sposób identyczny jak dla testu adherencji do komórek CHO). Następnie kolonie bakterii zostały zebrane z płytek, przemyte buforem PBS i zawieszono w nim do uzyskania wartości OD₆₀₀ równej 1,0. Zawiesiny bakteryjne zostały wykorzystane w teście hemaglutynacji w celu oszacowania ilości fimbrii występujących na powierzchni komórek bakteryjnych.

Z próbki ludzkiej krwi (o grupie 0) wyizolowano erytrocyty, przemyto je trzykrotnie PBS i zawieszono w buforze PBS z dodatkiem 2% D-mannozy osiągając końcowe OD₆₀₀ równe 1,4. Przygotowano seryjne rozcieńczenia hodowli bakteryjnych w 12-dołkowych płytkach mikrotitracyjnych. Poprzez dodanie do nich równych objętości zawiesiny erytrocytów wykonano test hemaglutynacji odpornej na mannozę (MRHA, ang. *mannose resistant haemagglutination*). Test hemaglutynacji wykonywano na lodzie. Obejmował on określenie ostatniego rozcieńczenia badanych bakterii, przy którym występuje obserwowalna aglutynacja. Wartość HA-miana oznaczono jako odwrotność ostatniego rozcieńczenia

hodowli bakteryjnej, dla którego obserwuje się aglutynację. W celu potwierdzenia, że występująca aglutynacja jest wynikiem oddziaływania fimbrii Dr z receptorem DAF przeanalizowano również odwracalność tej reakcji na skutek dodania chloramfenikolu do stężenia końcowego równego 2 μ M. HA-miano oznaczono jako średnią z trzech oddzielnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach każdy.

5.20 Test wiązania kolagenu

Studzienki polistyrenowej 96-dołkowej płytki do mikromiareczkowania zostały pokryte kolagenem typu IV wyizolowanym z ludzkiego łożyska (stężenie 20 mg/ml) (Materiały 4.21), po czym inkubowano je przez noc w 4°C. Po tym czasie przepłukano je trzykrotnie buforem PBS, a następnie w celu zablokowania inkubowano w 1% roztworze BSA w PBS przez 2 godziny w 37°C. Po usunięciu buforu blokującego do studzienek dodano 100 μ l hodowli komórek bakteryjnych (Metody 5.1) w PBS ($OD_{600}=1$) i ponownie inkubowano przez 2 godziny w 37°C. Dodatkowo wykonano test z użyciem tej samej hodowli bakteryjnej rozcieńczonej w stosunkach 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 i 1:8.

Fimbrie Dr związane do kolagenu wykrywane były poprzez inkubację przez 40 minut w 37°C w roztworach króliczych przeciwciał pierwszorzędowych anty-DraE i drugorzędowych kozich antykróliczych (rozcieńczenia 1:500 i 1:5000). Po dodaniu substratu Sigma Fast (Materiały 4.21) ilość związanych przeciwciał została zmierzona za pomocą czytnika płytek przy długości fali 490 nm. Eksperyment wykonano trzy razy w dwóch powtórzeniach, przy użyciu nowych hodowli bakteryjnych. Z uzyskanych wyników obliczono wartość średnią wraz z wartością odchylenia standardowego.

5.21 Analiza densytometryczna frakcji fimbrialnych rozdzielonych za pomocą SDS-PAGE

Szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 hodowano przez dobę na płytkach TSA (5% DMSO, chloramfenikol) w obecności pilicydów w stężeniach 0, 0,5, 1,5, 2,5 i 3,5 mM. Kontrolę negatywną stanowiła hodowla szczepu BL21(DE3)/pACYC184 na płytce TSA bez dodatku pilicydów. Z wszystkich hodowli wyizolowano frakcje fimbrialne metodą mechaniczną (Metody 5.6). Ze wszystkich próbek pobrano 20 μ l i zmieszano każdą porcję z 5 μ l buforu Laemmli (Materiały 4.8), a następnie denaturowano w temperaturze 100°C przez 60 minut. W

następnym etapie próbki rozdzielono w 15% żelach SDS-PAGE (Materiały 4.8). W celu potwierdzenia, że wszystkie fimbrie Dr zostały zdenaturowane do monomerycznych podjednostek DraE, jednocześnie wykonano analizę techniką Western blot (Metody 5.14) z użyciem króliczych przeciwciał anti-Dr. Białka rozdzielone na żelu uwidoczniono przez barwienie Coomasie Blue (Materiały 4.8). Steżenie białka DraE w frakcjach fimbrialnych zmierzono przy pomocy analizy densytometrycznej z wykorzystaniem aparatu VersaDoc, oprogramowania Quantity One oraz standardu w postaci zestawu SDS-PAGE LMW calibration kit (Materiały 4.22). Wartość uzyskaną dla szczepu ekspresyjnego fimbrie hodowanego bez obecności pilicydów ustalono arbitralnie na 100%. Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie, używając nowych hodowli. Gęstość optyczną dla analizowanych prążków określono densytometrycznie z trzech pomiarów dla każdego doświadczenia.

6 OPIS WYNIKÓW I DYSKUSJA

W przytoczonej części wstępnej niniejszej pracy rysuje się podział struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych na trzy grupy zależne od budowy białka opiekuńczego biorącego udział w biogenezie tych struktur – grupa FGS, FGL oraz pośrednia grupa FGA. Kryterium tego podziału ma charakter czysto strukturalny i opiera się na długości pętli łączącej β -nici F1 i G1 białka opiekuńczego. Ze względu na fakt, że region ten obejmuje β -nić G1, pełniącą fundamentalną rolę w czasie jednej z dwóch podstawowych reakcji biogenezy struktur adhezyjnych – reakcji DSC – podział chaperonów przekłada się bezpośrednio na różnice strukturalne w budowie szczeliny akceptorowej podjednostek budujących te struktury. Pośrednio obserwuje się zatem również związek pomiędzy grupą, do której należy chaperone a budową adhezyny powstającej z jego udziałem: białka FGS biorą udział w biogenezie struktur heteropolimerycznych, a białka FGL – struktur homopolimerycznych. Celem niniejszej pracy była próba określenia dalszych różnic i podobieństw pomiędzy grupami FGL i FGS na poziomie molekularnym. W czasie prowadzonych w ramach pracy badań skupiono się na dwóch kluczowych etapach mechanizmu biogenezy struktur obu grup:

- reakcji DSC, czyli oddziaływaniach występujących pomiędzy białkiem opiekuńczym a podjednostką oraz
- reakcji DSE – reakcji zachodzącej pomiędzy kompleksem binarnym chaperone-podjednostka a białkiem ushera (rezultaty tej części badań zostały opublikowane w 2013 roku w czasopiśmie BMC Microbiology (Piątek *et al.*, 2013)).

W literaturze dostępne są liczne dane dotyczące mechanizmów reakcji DSC i DSE dla białek z grupy FGS. Jako struktury modelowe uznaje się tutaj pilię P i typu 1, kodowane odpowiednio przez operony *pap* oraz *fim* uropatogennych szczepów *E. coli*. Informacje na temat odpowiednich reakcji dla struktur typu FGL opierają się głównie na badaniach nad modelową strukturą adhezyjną F1 *Yersinia pestis*, kodowaną przez operon *caf*. W niniejszej pracy skupiono się na dwóch funkcjonalnych odkryciach opisanych tylko i wyłącznie dla pili typu 1. Pierwsze z nich dotyczy doniesienia z 2012 roku, wskazującego na fakt, że chaperone FimC katalizuje formowanie pili typu 1 tylko i wyłącznie z podjednostek budulcowych, w obrębie których uprzednio utworzony został mostek disiarczkowy pomiędzy β -nićmi A i B

(Crespo *et al.*, 2012). Autorzy podkreślają, że jest to kluczowy mechanizm zabezpieczający powstające pilie przed wprowadzeniem wadliwych podjednostek nie posiadających mostka S-S.

Drugie odkrycie dotyczy opracowania specyficznych inhibitorów biogenezy pili P i typu 1, jakimi są pilicydy. Związki te, poprzez blokowanie reakcji DSE zapobiegają formowaniu pili, a tym samym skutecznie blokują proces patogenezy.

W prowadzonych badaniach jako model struktur typu FGL wykorzystano fimbrie Dr kodowane przez operon *dra* uropatogennych szczepów *E. coli*. Założenia pracy obejmują uzyskanie odpowiedzi na dwa kluczowe pytania:

- czy podobnie jak w przypadku biogenezy pili P i typu 1 chaperone DraB oddziałuje i wprowadza do rosnącej fimbrii Dr jedynie podjednostki DraE wyposażone w mostek S-S?
- czy pilicydy pierwszej generacji opracowane jako inhibitory biogenezy struktur adhezyjnych typu FGS (pilie typu 1 i P) będą również skutecznie blokować formowanie fimbrii Dr?

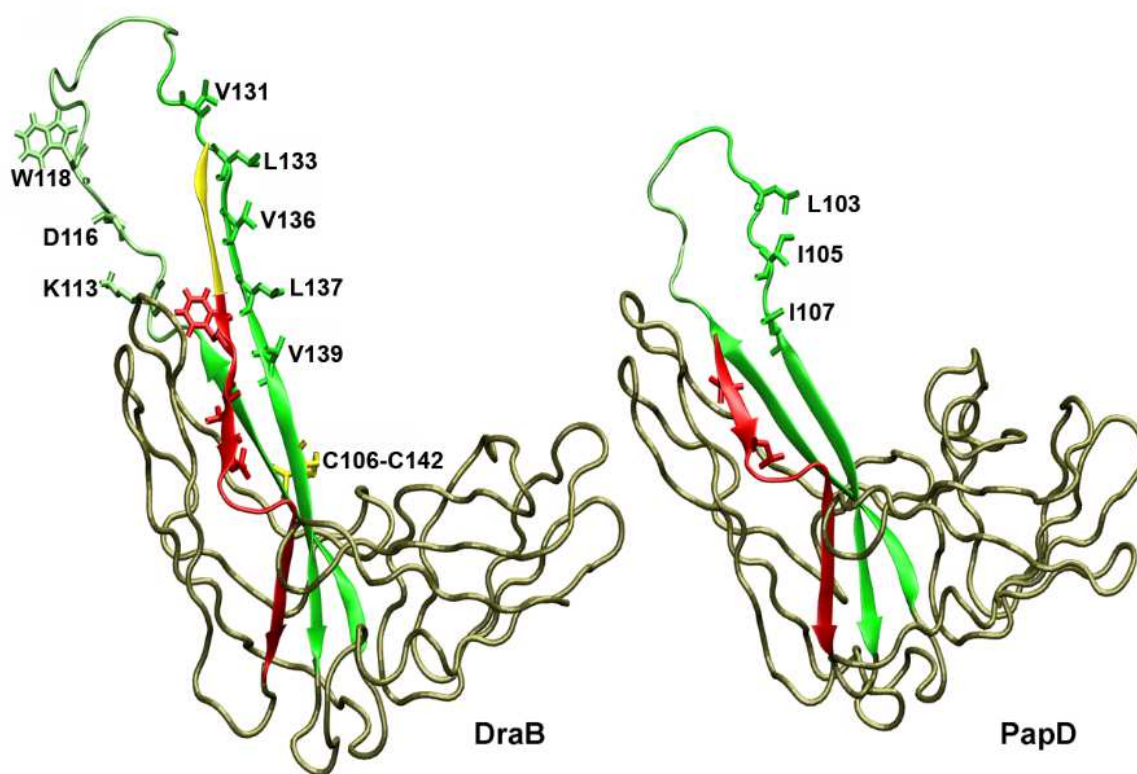
6.1 Fimbrie Dr jako typowy przedstawiciel grupy FGL

Fimbrie Dr wykazują typową dla struktur grupy FGL budowę: stanowią one homopolimery pojedynczych podjednostek białka DraE. Struktury te produkowane są z udziałem białka opiekuńczego DraB. Chcąc stosować w badaniach fimbrie Dr jako modelowy przykład struktur adhezyjnych powstających z wykorzystaniem białek opiekuńczych typu FGL, nie można było się oprzeć tylko na analizie sekwencyjnej białka DraB. W związku z powyższym, w zespole dr Zbigniewa Dautera (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, USA) ustalono strukturę krystalograficzną białka opiekuńczego DraB (kod PDB: 4DJM). Analiza strukturalna pozwala stanowczo stwierdzić, że białko DraB posiada wszystkie cechy charakterystyczne, obserwowane w przypadku białek opiekuńczych z rodziny FGL (Zavialov *et al.*, 2007, Zav'yalov *et al.*, 2010) (Rys. 34):

- pętla zlokalizowana pomiędzy β -nićmi F1 i G1 jest długa i liczy 15 reszt aminokwasowych,
- nić donorowa G1 donuruje szczelinę akceptorową podjednostek za pomocą pięciu masywnych reszt hydrofobowych,

- motyw wiążący podjednostkę zlokalizowany na N-końcu białka, obejmujący trzy masywne hydrofobowe reszty nici A1 jest rozległy – składa się aż z 26 reszt aminokwasowych (w przypadku białka opiekuńczego PapD z rodziny FGS motyw ten zbudowany jest z 7 reszt, z których jedynie 2 stanowią masywne reszty hydrofobowe),
- obecny jest zakonserwowany mostek disiarczkowy stabilizujący motyw szpilki do włosów obejmujący β -nić F1-pętlę- β -nić G1,
- w obrębie szpilki F1-G1 zlokalizowane są trzy zakonserwowane reszty Lys, Asp oraz Trp, charakterystyczne tylko dla podrodziny FGL.

Powyższe cechy pozwalają jednoznacznie przyjąć, że fimbrie Dr kodowane przez operon *dra* stanowią poprawny model struktur adhezyjnych typu FGL.



Rys. 34. Białko DraB jako modelowy przedstawiciel grupy FGL. Porównanie cech strukturalnych DraB i PapD (rodzina FGS). Kolorem czerwonym wyróżniono część β -nici A1 zawierającą hydrofobowe reszty biorące udział w oddziaływaniach z podjednostką, kolorem żółtym – odcinek długiego N-terminalnego regionu nici A1 typowego dla białek FGL. Kolorem zielonym oznaczono motyw szpilki do włosów obejmujący β -nici F1 i G1 i łączący je w pętlę, a naprzemiennie ułożone reszty hydrofobowe biorące udział w reakcji DSC wyróżniono i ponumerowano. W białku DraB

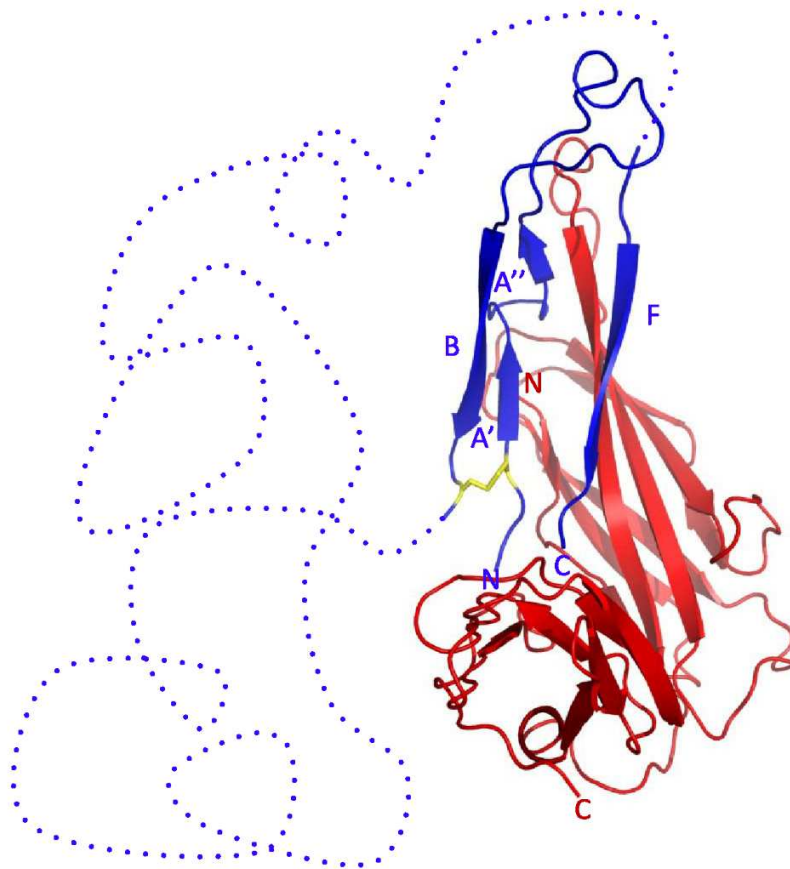
zaznaczono i ponumerowano również reszty cysteiny biorące udział w tworzeniu zakonserwowanego w grupie FGL mostka disiarczkowego.

6.2 Wpływ zakonserwowanego mostka disiarczkowego białek podjednostkowych na reakcję komplementacji nici donorowych

Struktury adhezyjne są odpowiedzialne za bakteryjne przyleganie do komórek gospodarza, umożliwiając w ten sposób kolonizację i przetrwanie w środowiskach o niesprzyjających warunkach. Z tego powodu struktury te muszą charakteryzować się trwałością – możliwość łatwego ich zniszczenia skutkowałaby szybkim wydaleniem bakterii z organizmu. Jednocześnie należy pamiętać, że struktury adhezyjne zbudowane są jako polimery z pojedynczych białek podjednostkowych, a biogeneza odbywa się w przestrzeni periplazmatycznej. Fałdowanie defektywnych strukturalnie podjednostek (wykazujących brak szóstej β -nici) jest możliwe tylko i wyłącznie przy udziale specyficznego białka opiekuńczego. Oznacza to, że potencjalna denaturacja podjednostki budulcowej w obrębie dojrzałej, powierzchniowej struktury adhezyjnej jest procesem całkowicie nieodwracalnym (ponieważ w środowisku występowania struktury nieobecne jest białko chaperonu). W efekcie denaturacja nawet pojedynczej podjednostki białkowej w polimerze składającym się z 1000 podjednostek powodowałaby przerwanie ciągłości struktury adhezyjnej, co skutkowałoby z kolei jej dysfunkcją. W związku z powyższym, białka podjednostkowe struktur powstających na drodze chaperone-usher należą do jednych z najstabilniejszych białek w przyrodzie (czas półtrwania w temperaturze 25°C rzędu 10^{10} lat, $\Delta G=70-90$ kJ/mol). Stabilność białka DraE-sc została szerzej omówiona w rozdziale 5.1. „Oddziaływania podjednostka-białko opiekuńcze oraz podjednostka-podjednostka”.

Jednym z elementów strukturalnych umożliwiających utrzymanie wysokiej odporności podjednostek na denaturację jest mostek disiarczkowy występujący pomiędzy β -niemi A i B (Piątek *et al.*, 2010). Mostek o takiej lokalizacji zaobserwowano u przedstawicieli obu grup, FGS i FGL. Unikalne znaczenie mostka S-S typu A-B jako czynnika wpływającego na ich stabilność została podkreślona dla pili P i typu 1. Udowodniono, że dla tych podjednostek zastosowanie ma specyficzny system kontroli jakości: badania z wykorzystaniem pili typu 1 wykazały, że mostek disiarczkowy podjednostek jest elementem niezbędnym do produkcji funkcjonalnej struktury adhezyjnej typu FGS – jedynie podjednostki wyposażone w mostek

są rozpoznawane przez białko opiekuńcze, fałdowane, a następnie włączane w skład rosnącej fimbrii. Mostek ten jest zatem elementem niezbędnym do powstania kompleksu chaperone-podjednostka, czyli do zajścia reakcji DSC (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994, Crespo *et al.*, 2012). Mechanizm ten zabezpiecza pilie przed możliwością wprowadzenia do ich struktury podjednostek nie zawierających mostka S-S, czyli wykazujących obniżoną stabilność. Crespo i współpracownicy wykazali, że mechanizm detekcji obecności mostka disiarczkowego typu A-B ma również istotne znaczenie dla samej drogi fałdowania podjednostki na etapie formowania kompleksu chaperone-podjednostka. Chaperone FimC oddziałując z fałdowanymi podjednostkami musi wiązać się z przynajmniej dwoma motywami występującymi w obrębie ich struktury. Jednym z nich jest β -nić akceptorowa F, a drugim motyw szpilki A-B, spinany przez mostek disiarczkowy. Wiązanie tych motywów przez chaperone powoduje, że łańcuch polipeptydowy fałdowanej podjednostki ulega zakotwiczeniu na N- i C-końcu. Taka cyrkulizacja powoduje, że w znaczącym stopniu organiczona zostaje złożoność potencjalnej drogi fałdowania podjednostki (Rys. 35). W efekcie przyspieszeniu ulega kinetyka fałdowania podjednostki FimA, dla której połowiczny czas tej reakcji wynosi zaledwie 2 sekundy (Crespo *et al.*, 2012).



Rys. 35. Model oddziaływania białka opiekuńczego FimC z łańcuchem polipeptydowym podjednostki FimA posiadającej mostek disiarczkowy (oznaczony kolorem żółtym). FimC oznaczono kolorem czerwonym, a podjednostkę – kolorem niebieskim. Model zakłada, że łańcuch polipeptydowy podjednostki wiąże się inicjalnie poprzez motyw szpilki do włosów (nici A', A'' i B spięte mostkiem disiarczkowym) oraz C-końcową nić F do chaperonu w taki sam sposób, jaki obserwuje się w strukturze kompleksu binarnego FimC-FimA, przez co ograniczona jest możliwość innych dróg fałdowania podjednostki (Crespo *et al.*, 2012).

Mostek disiarczkowy typu A-B nie jest elementem zakonserwowanym w obrębie całej superrodziny białek podjednostkowych struktur adhezyjnych typu chaperone-usher. Niektóre podjednostki, jak np. Caf1 (będące białkiem modelowym podjednostek typu FGL) nie posiadają reszt cysteiny zdolnych do utworzenia wiązań S-S tego typu. Operon *dra*, kodujący fimbrie Dr zbudowane z podjednostek DraE zawiera również gen *draD* odpowiedzialny za syntezę białka inwazyjnego DraD stanowiącej podjednostkę szczytową fimbrii. DraD posiada mostek disiarczkowy łączący β -nici B i F, a więc o odmiennej

lokalizacji w stosunku do mostka podjednostek głównych DraE czy FimA. Podjednostki DraD-podobne występują w operonach kodujących adhezyny z rodziny Dr i nie tylko, należących wyłącznie do podjednostek typu FGL.

Te unikalne cechy dotyczące obecności i lokalizacji mostka disiarczkowego typu A-B w podjednostkach strukturalnych adhezyn powstających z udziałem chaperonów z podrodziny FGL powodują, że zasadne jest pytanie o poziom zakonserwowania mechanizmu kontroli włączania podjednostek zawierających wiązanie S-S zdefiniowanego dla układów Fim i Pap w kontekście podrodziny FGL.

6.3 Analiza stopnia oligomeryzacji białka DraE- Δ SS w obrębie periplazmy

W celu stwierdzenia, czy biogeneza fimbrii Dr jest kontrolowana przez system detekcji wiązań S-S w białku podjednostkowym DraE opracowano dwa kolejne bakteryjne układy eksperymentalne. Pierwszy opierał się na wykorzystaniu szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE. Szczep ten koprodukuje pod kontrolą wspólnego promotora T7 periplazmatycznie zlokalizowane dzikie formy białka DraB oraz DraE (Materiały 4.3). Na bazie tego szczepu skonstruowałam jego pochodną – szczep *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE- Δ SS, w którym w genie białka DraE trójki kodujące reszty cysteiny zastąpiono kodonami odpowiadającymi resztom alaniny (Materiały 4.3). Oba szczepy nie produkują białka kanałotwórczego DraC, niezbędnego do formowania zewnątrzkomórkowych struktur fimbrialnych Dr. W efekcie, w przypadku obu szczepów w periplazmie następuje akumulacja DraB i podjednostek DraE lub DraE- Δ SS. W przypadku szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE obserwuje się nagromadzenie w przestrzeni periplazmatycznej oligomerów DraE, będących efektem reakcji DSC i DSE.

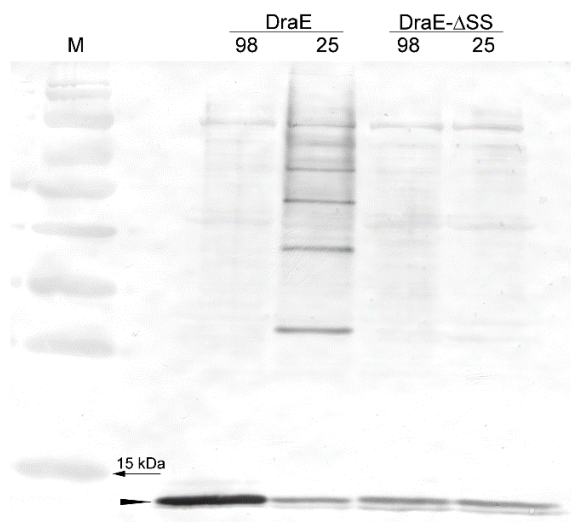
Ze względu na bardzo wysoką stabilność podjednostki białka DraE oligomery inkubowane w temperaturze pokojowej w buforze Laemmli nie podlegają denaturacji. W związku z tym wiążą one mniejszą ilość cząsteczek SDS niż w pełni zdenaturowane w temperaturze 98°C podjednostki. Oligomery te można uwidocznić stosując test retardacji (Wstęp 2.4.2, Metody 5.12) białek stabilnych kinetycznie w żelu SDS-PAGE. W czasie elektroforezy porównuje się migrację próbek inkubowanych przed naniesieniem na żel w

temperaturze pokojowej (25°C) oraz próbek poddanych działaniu wysokiej temperatury (98°C).

Uzyskane preparaty frakcji periplazmatycznych pochodzących z obu analizowanych szczepów poddałam sprawdzającej identyfikacji za pomocą techniki Western Blotting z użyciem króliczych przeciwciał anti-DraE i II-rzędowych przeciwciał antykróliczych (Metody, 5.14). Dla frakcji periplazmatycznych wyizolowanych z hodowli kontrolnego szczepu BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE technika ta uwidoczniała różnice pomiędzy próbkami inkubowanymi w różnych temperaturach. Próbki nie poddane denaturacji termicznej zawierały białko DraE w formie monomerycznej oraz w postaci oligomerów o różnych wielkościach – prążki im odpowiadające widoczne są na różnych wysokościach (Rys. 36). Dla próbek inkubowanych w 98°C obserwuje się tylko pojedynczy prążek na wysokości odpowiadającej wielkości białka DraE w formie monomeru. W przypadku szczepu BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE-ΔSS, analiza frakcji periplazmatycznej uwidoczniała jedynie monomeryczną formę białka DraE-ΔSS, nie zaobserwowałam oligomerów dla próbek inkubowanych w temperaturze pokojowej (Rys. 36). Uzyskane rezultaty wskazują jednoznacznie, że brak mostka disiarczkowego w obrębie podjednostki DraE najprawdopodobniej dyskwalifikuje ją z udziału w oddziaływaniu z białkiem opiekuńczym DraB, wobec czego nie powstaje taka forma tego białka, która zdolna by była do uczestnictwa w reakcji DSE, skutkującej utworzeniem oligomerów. Jednocześnie wcześniejsze badania wykazały, że białko DraE-sc-ΔSS z uzupełnioną przez C-końcowy peptyd fuzyjny (odpowiadający nici Nte) szczeliną akceptorową ulega procesowi poprawnego fałdowania w obrębie periplazmy (Piątek *et al.*, 2010). Tym samym wykluczona została sytuacja, w której oligomery nie powstają na skutek wewnątrzcząsteczkowego defektu białka DraE spowodowanego substytucją reszt cysteiny na reszty alaniny.

Otrzymany wynik opisany w powyższym etapie nie jest jednoznaczny. Badania nad białkiem DraE-ΔSS wykazały, że w wyniku usunięcia mostka disiarczkowego straciło ono stabilność kinetyczną typową dla białka DraE-sc. Białko DraE-sc-ΔSS analizowane testem retardacyjnym SDS-PAGE nie wykazywało różnic w prędkości migracji dla próbek inkubowanych przed elektroforezą w temperaturach 25 i 98°C. Oznacza to, że w przypadku badanego szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-DraBE-ΔSS w przestrzeni periplazmatycznej

mogły pojawić się oligomery zbudowane z białka DraE- Δ SS, jednak nie wykazały one odporności na denaturację w buforze Laemmli.



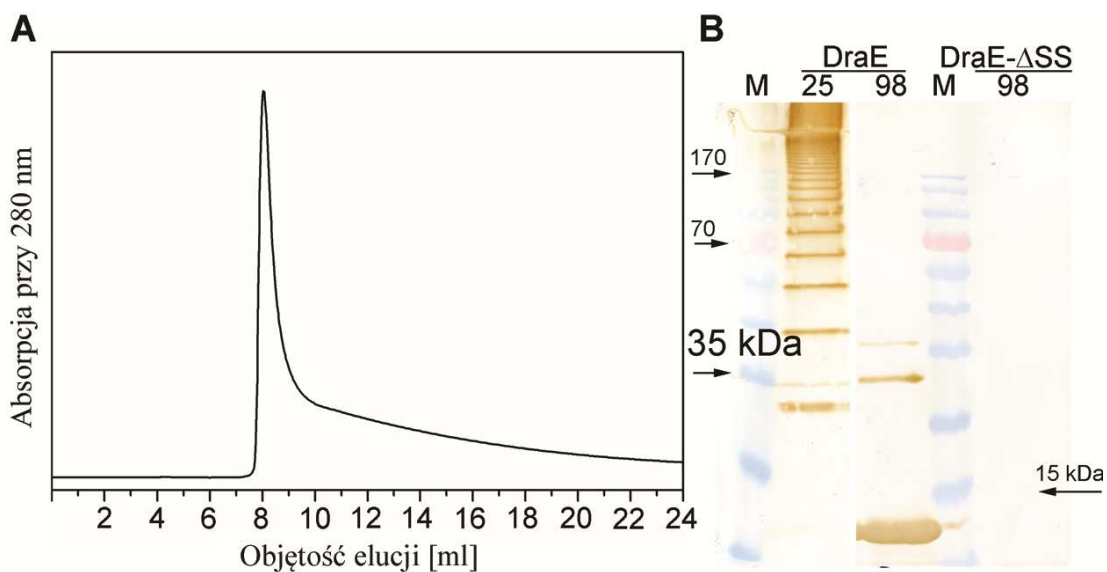
Rys. 36. Analiza Western blot frakcji perioplazmatycznych wyizolowanych ze szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE (oznaczonej jako DraE) oraz BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE- Δ SS (oznaczonej jako DraE- Δ SS) z użyciem przeciwciał anti-DraE. Ścieżki oznaczone numerami 98 i 25 oznaczają próbki białek inkubowane przed elektroforezą w buforze Laemmli w temperaturach odpowiednio 98 i 25°C. Strzałką oznaczono pozycję białka DraE w formie monomerycznej. M – marker PageRuler Prestained Protein Ladder.

6.4 Wpływ braku mostka disiarczkowego w białku DraE na proces włączania podjednostek w fimbrię

Drugie podejście eksperymentalne miało na celu określenie wpływu delecji mostka disiarczkowego w białku DraE (mutacja Cys \rightarrow Ala) na zdolność komórek bakteryjnych do formowania powierzchniowo zlokalizowanych fimbrii Dr. Jako model wykorzystano szczep *E. coli* BL21(DE3)/pCC90 niosący cały operon *dra* bez regionu warunkującego zmienność fazową (Materiały 4.3). Plazmid pCC90 jest powszechnie stosowany w eksperymentach, w których niezbędny jest szczep bakteryjny produkujący w sposób konstytutywny fimbrie Dr. Szczepy *E. coli* zawierające plazmid pCC90 często są używane jako powszechnie akceptowalny odpowiednik szczepu klinicznego IH11128. Stosując technikę mutagenazy ukierunkowanej stworzyłam plazmid pCC90DraE- Δ SS, w którym w obrębie genu kodującego białko DraE kodony cysteiny substytuowano kodonami alaniny. W przeciwieństwie do poprzednio używanego szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30b-sygDraBE- Δ SS, wykorzystany w tym eksperymencie szczep BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS jest zdolny

do ekspresji dodatkowo genów białka kanałotwórczego DraC oraz inwazyjny DraD. W trakcie eksperymentu prowadzono równoległe hodowle szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pCC90 oraz BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS na podłożu stałym LA (Materiały 4.4). Z hodowli nocnych w postaci muraw bakteryjnych wyizolowałam zewnątrzkomórkowe frakcje fimbrialne stosując metodę mechaniczną oraz metodę szoku termicznego (Metody 5.6). Uzyskane frakcje poddane zostały analizie z wykorzystaniem chromatografii rozmiarów wykluczających na kolumnie GE Superdex G-75 (Materiały 4.25). Uzyskane frakcje elucyjne poddałam następnie analizie na obecność fimbrii Dr zbudowanych z białka DraE lub DraE- Δ SS z wykorzystaniem techniki Western Blotting stosując I-rzędowe przeciwciała królicze anti-Dr i II-rzędowe przeciwciała kozie anti-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (Metody 5.14).

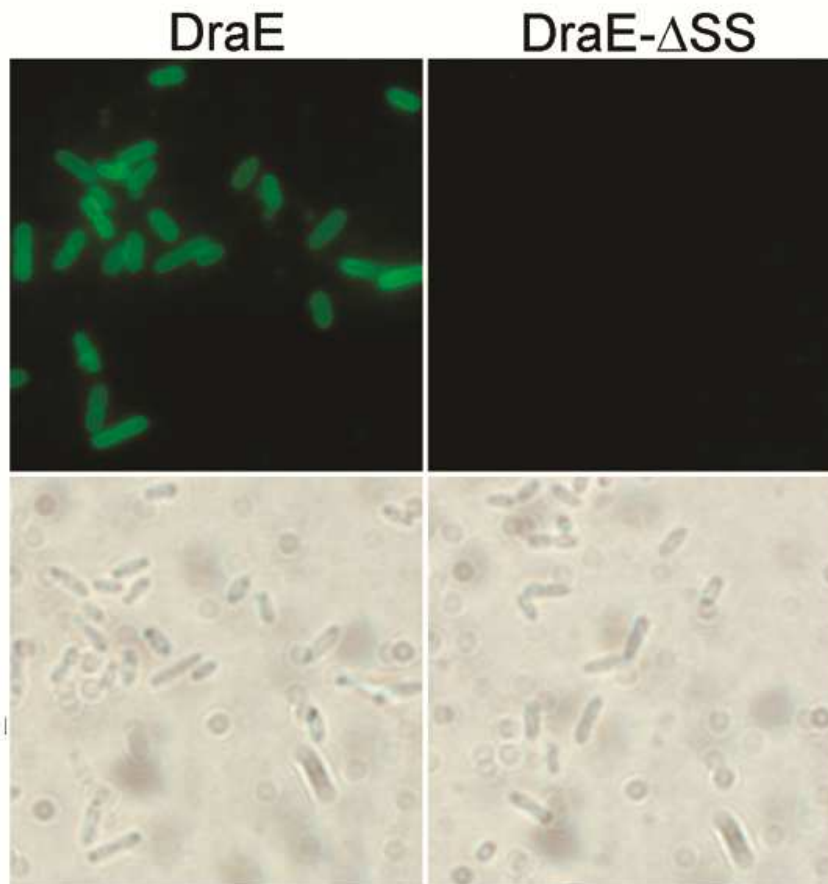
Analiza chromatograficzna frakcji fimbrialnych pochodzących ze szczepu kontrolnego (*E. coli* BL21(DE3)/pCC90) skutkowała występowaniem pojedynczego, intensywnego piku obserwowanego przy objętości elucji równej objętości martwej kolumny (ok. 8 ml) (Rys. 37A). Taki obraz jest typowy dla aglomeratów białkowych o dużej masie cząsteczkowej. Otrzymany wynik wskazuje, że frakcje fimbrialne wyizolowane z hodowli szczepu kontrolnego zgodnie z założeniem zawierają natywne fimbrie Dr, zbudowane z wielokrotnych powtórzeń białka DraE. Badanie sprawdzające za pomocą techniki Western Blotting wykonano inkubując identyczne próbki odpowiadające elucji piku z chromatografii wykluczania w dwóch temperaturach: 25 i 98°C. Uzyskane w ten sposób rezultaty potwierdziły fakt produkcji fimbrii Dr: próbka inkubowana w temperaturze pokojowej zawierała DraE w postaci oligomerów o różnej wielkości, natomiast inkubacja próbki elucyjnej frakcji fimbrialnych w wysokiej temperaturze skutkowała denaturacją wyizolowanych oligomerów DraE do postaci monomerycznej (Rys. 37B). Dla frakcji fimbrialnych wyizolowanych ze szczepu BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS nie uzyskano żadnego piku na chromatografie odpowiadającego fimbriom Dr, nie wykryto również badanego białka (zarówno w postaci oligomeru jak i monomeru niezależnie od warunków inkubacji próbek) w wyizolowanej frakcji fimbrialnej tego szczepu za pomocą techniki Western Blot (Rys. 37B).



Rys. 37. Analiza produkcji fimbrii Dr przez szczepy *E. coli* BL21(DE3)/pCC90 oraz BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS. A – chromatogram dla próbki frakcji fimbrialnej wyizolowanej ze szczepu BL21(DE3)/pCC90. B – analiza za pomocą techniki Western Blot próbek elucyjnych z sączenia frakcji fimbrialnych szczepu BL21(DE3)/pCC90 (oznaczonych jako DraE) i próbek zawierających frakcje fimbrialne wyizolowane ze szczepu BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS (DraE- Δ SS). Liczby 25 i 98 oznaczają próbki frakcji inkubowane przed elektroforezą SDS-PAGE w buforze Laemmli w temperaturach odpowiednio 25 i 98°C. M – marker PageRuler Prestained Protein Ladder.

Metody izolacji frakcji periplazmatycznych bazują na dużej bezwładności mechanicznej fimbrii. Pozwala to na ich łatwe oderwanie z powierzchni komórek bakterii czy to poprzez energiczne worteksowanie zawiesiny, czy też przez jej inkubację w temperaturze 65°C przez godzinę (Metody 5.6). W efekcie zastosowane metody izolacji frakcji fimbrialnej nie są wydajne dla powierzchniowych struktur niskocząsteczkowych. W toku niniejszych badań istniało prawdopodobieństwo, że białko DraE- Δ SS produkowane przez szczep *E. coli* BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS posiadało ograniczoną zdolność do formowania defektywnych (krótszych) fimbrii, jako efekt wprowadzonej mutacji zamieniającej reszty cysteiny na reszty alaniny. W takiej sytuacji w szczepie tym białko DraE- Δ SS podlegałoby reakcjom DSC i DSE, lecz liczba i długość powstających fimbrii byłyby zdecydowanie mniejsza niż w przypadku szczepu produkującego dzikie białko DraE. Takie potencjalnie defektywne fimbrie Dr budowane przez białko DraE- Δ SS byłyby trudne do izolacji z powierzchni opisanymi wcześniej metodami izolacji frakcji fimbrialnej. Aby wykryć takie potencjalne fimbrie Dr na powierzchni komórek szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS zastosowałam nieinwazyjną technikę mikroskopii immunofluorescencyjnej z użyciem

króliczych przeciwciał anti-DraE i kozich przeciwciał anti-króliczych znakowanych fluoresceiną (Metody 5.15). W przypadku szczepu kontrolnego na powierzchni komórek wykryłam znaczną ilość białka DraE, objawiającą się intensywnym zabarwieniem fluorescencyjnym. Natomiast w szczepie *E. coli* BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS produkującym białko bez mostka disiarczkowego nie zaobserwowano żadnej fluorescencji na powierzchni komórek (Rys. 38). Rezultaty świadczą jednoznacznie o tym, że białko DraE pozbawione wiązania S-S nie stanowi substratu do produkcji fimbrii Dr.



Rys. 38. Analiza produkcji białka DraE (szczep *E. coli* BL21(DE3)/pCC90) i DraE- Δ SS (szczep *E. coli* BL21(DE3)/pCC90DraE- Δ SS) w postaci fimbrialnej na powierzchni komórek za pomocą mikroskopii immunofluorescencyjnej przy wykorzystaniu przeciwciał anti-DraE i wyznakowanych fluoresceiną kozich przeciwciał drugorzędowych. Górny rząd zdjęć – obrazy immunofluorescencyjne, dolny rząd – obrazy dla światła widzialnego.

6.5 Określenie potencjalnej roli mostka disiarczowego białek podjednostek adhezyjnych z rodziny Dr w procesie fałdowania

Cechą charakterystyczną części podjednostek budulcowych struktur adhezyjnych typu chaperone-usher jest obecność mostka disiarczowego łączącego początek β -nici A z końcem β -nici B. Taka lokalizacja mostka nie występuje w żadnym innym białku należącym do superrodziny białek o strukturze immunoglobulinopodobnej. W toku badań zdefiniowano dwie istotne funkcje, jakie pełni mostek typu AB w podjednostkach struktur adhezyjnych:

- pełni istotną rolę stabilizacyjną odpowiadając w białku DraE za współgenerowanie nieskończonej stabilności kinetycznej – czas półtrwania 10^8 lat (Puorger *et al*, 2008, Piątek *et al*, 2010),
- stanowiąc element spajający strukturę szpilki AB, która wchodzi w interakcje z białkiem opiekuńczym, wpływa na proces fałdowania podjednostek (Crespo *et al.*, 2012).

W niniejszym podrozdziale przedstawiony zostanie model opisujący wpływ obecności mostka disiarczowego AB na drogę fałdowania podjednostek strukturalnych adhezyn z rodziny Dr. Przedstawiony model bazuje na wcześniej opisanych strukturach cyklicznych trimerów białek DraE, AfaE i DaaE oraz na analizie fizykochemicznej skonstruowanego w ramach niniejszej pracy białka N-Nte-DraE-C-Nte.

6.5.1 Analiza struktur podjednostek układów adhezyjnych rodziny Dr dla białek produkowanych w cytoplazmie i periplazmie

6.5.1.1 Założenia analizy

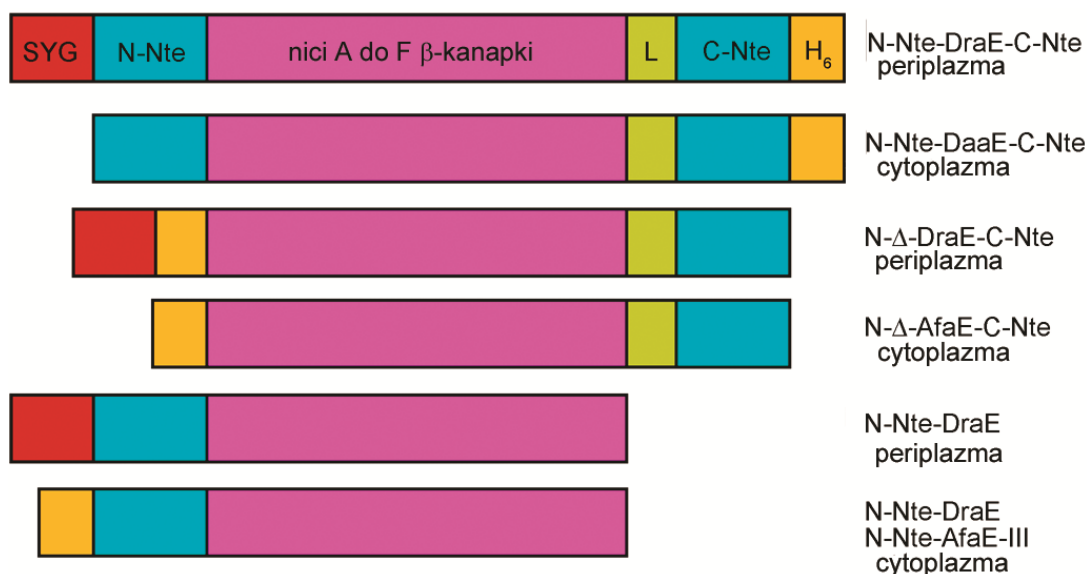
Jednym ze sposobów określenia wpływu mostka disiarczowego w białkach podjednostkowych na drogę ich fałdowania jest porównanie struktur białek produkowanych w cytoplazmie i periplazmie. Cytoplazma jest środowiskiem o charakterze redukującym, w którym stabilne są grupy –SH reszt cysteiny. Formowanie potencjalnych mostków S-S odbywa się najczęściej po etapie fałdowania białka cytoplazmatycznego, podczas preparatyki białkowej. W takiej sytuacji dochodzi do utlenienia reszt cysteiny do cystyny za pomocą tlenu atmosferycznego rozpuszczonego w buforach. Środowisko periplazmy jest

natomiast silnie utleniające – stymuluje potencjałem formowanie w białkach mostków disiarczkowych. Dodatkowo przestrzeń periplazmatyczna dysponuje enzymatycznym układem katalitycznym, w skład którego wchodzi oksydoreduktaza DsbA katalizująca tworzenie mostków disiarczkowych w periplazmie. Powoduje to, że mostki w białkach periplazmatycznych są formowane na bardzo wczesnym etapie fałdowania. W konsekwencji, porównując fałdowanie danego konstrukt białkowego w obrębie cytoplazmy i periplazmy można uzyskać cenne informacje na temat wpływu tworzenia mostka disiarczkowego na drogę fałdowania.

Analiza przeprowadzona w pracy dotyczyła trzech głównych adhezyn z rodziny Dr: podjednostki DraE budującej adhezynę Dr, podjednostki AfaE-III (adhezyna Afa-III) oraz podjednostki DaaE (adhezyna F1845). Białka AfaE-III i DaaE wykazują odpowiednio 98 i 57% identyczności sekwencji z białkiem DraE. Tak wysokie podobieństwo powoduje, że dostępne informacje strukturalne dla poszczególnych białek można bezpośrednio odnosić do pozostałych przedstawicieli z rodziny.

6.5.1.2 Analiza porównawcza dróg fałdowania białek rodziny Dr o różnej konstrukcji

W przypadku analizowanych białek dostępne są ich różne warianty fuzyjne, zaprezentowane na rysunku 39. Obecność lub brak sekwencji sygnałnej (SYG) decyduje odpowiednio o periplazmatycznej lub cytoplazmatycznej lokalizacji białka. Część białek pozbawiona została natywnej N-terminalnej nici donorowej (N-Nte). Obecność na C-końcu fuzji w postaci peptydu o sekwencji N-terminalnej nici donorowej (C-Nte) miała na celu uzyskanie podjednostek w postaci monomerów, w których szczelina akceptorowa jest wypełniona specyficzną nicią donorową. Bardzo ważne jest, że w przypadku wszystkich porównywanych konstruktów typu C-Nte, fuzja została wprowadzona z wykorzystaniem identycznego linkera peptydowego DNKQ. Porównywane białka posiadały również N- lub C-terminalne ogonki fuzyjne sześciu reszt histydyny (H₆) dla łatwiejszego ich oczyszczania chromatograficznego. Porównując poszczególne formy białek zwracano uwagę na następujące cechy strukturalne: oligomeryczność białka w roztworze, położenie β -nici A1, N-Nte i C-Nte w strukturze podjednostek. Analizę prowadzono dla danej formy białka w wersji cytoplazmatycznej i periplazmatycznej.



Rys. 39. Konstrukty białek pojednostkowych rodziny adhezyz Dr. SYG – sekwencja sygnalna umożliwiająca transport do perioplazmy, N-Nte – N-końcowa nić donorowa (natywna), C-Nte – C-końcowa nić donorowa (fuzyjna), L – łącznik peptydowy DNKQ pomiędzy C-końcem nici F i C-terminalną nicią donorową, H₆ – domena fuzyjna His-Tag. Informacje strukturalne dotyczące poszczególnych konstruktów: N-Nte-DraE-C-Nte – lokalizacja perioplazmatyczna, monomer, mostek disiarczkowy wewnątrzcząsteczkowy; N-Nte-DaaE-C-Nte: lokalizacja cytoplazmatyczna, trimer, mostek disiarczkowy międzycząsteczkowy, kod PDB 2BCM; N-Δ-DraE-C-Nte: lokalizacja perioplazmatyczna, monomer, mostek disiarczkowy wewnątrzcząsteczkowy; N-Δ-AfaE-C-Nte: lokalizacja cytoplazmatyczna, monomer, mostek disiarczkowy wewnątrzcząsteczkowy, kod PDB 1RXL; N-Nte-DraE: lokalizacja perioplazmatyczna, niestabilny; N-Nte-DraE: lokalizacja cytoplazmatyczna, trimer, mostek disiarczkowy międzycząsteczkowy, kod PDB: 1UT1, 1USQ, 2W5P, 2JKN, 2JKJ; N-Nte-AfaE-III: lokalizacja cytoplazmatyczna, trimer, mostek disiarczkowy międzycząsteczkowy, kod PDB 1UT2, 1USZ.

Konstrukty białek z nicią donorową zlokalizowaną na N-końcu w zależności od lokalizacji, w której są produkowane zachowują się w różny sposób: perioplazmatyczne białko N-Nte-DraE ulega degradacji, natomiast identycznie zbudowane konstrukty białek DraE i AfaE-III o lokalizacji cytoplazmatycznej podlegają procesowi trimeryzacji z wytworzeniem międzycząsteczkowego mostka S-S zgodnie z zasadami opisanymi w niniejszej pracy w punkcie 2.4.1.

Chcąc uzyskać monomeryczne formy białek DraE i AfaE-III, najczęściej wykorzystuje się strategię polegającą na usunięciu natywnej N-terminalnej nici donorowej i wprowadzeniu jej, poprzez łącznik DNKQ, w postaci fuzji na C-końcu. Białka takie określa się mianem

samokomplementujących (-sc). Białka AfaE-III i DraE typu –sc, produkowane zarówno w periplazmie, jak i cytoplazmie są stabilnymi monomerami o identycznej strukturze. W przypadku obu białek ma miejsce komplementacja szczeliny akceptorowej poprzez C-Nte, która układa się antyrównolegle w stosunku do β -nici F. Dla obu białkowych form – cytoplazmatycznej i periplazmatycznej – obserwuje się typowy wewnątrzcząsteczkowy mostek disiarczkowy typu A-B.

Kluczowy dla prowadzonej analizy był konstrukt białkowy N-Nte-DaaE-C-Nte. Białko to nie posiada sekwencji sygnałnej, co skutkuje jego cytoplazmatyczną produkcją. Konstrukt ten wyposażony jest w natywną N-terminalną nić donorową N-Nte oraz C-terminalną nić donorową C-Nte wprowadzoną poprzez łącznik DNKQ. W efekcie białko N-Nte-DaaE-C-Nte z punktu widzenia stosowanych fuzji jest hybrydą opisanych wcześniej białek cytoplazmatycznych natywnych oraz posiadających delecję N-Nte z jednoczesnym wprowadzeniem nici C-Nte. Powoduje to, że białko takie może ulegać fałdowaniu obiema opisanymi powyżej drogami: z wytworzeniem struktury trimerycznej (uzupełnienie szczeliny akceptorowej przez N-Nte) lub monomerycznej typu –sc (komplementacja za pomocą C-Nte). Białko N-Nte-DaaE-C-Nte produkowane w cytoplazmie tworzy stabilne cykliczne formy trimeryczne. Analiza struktury trimery DaaE wskazuje, że jest ona identyczna ze strukturą trimerów natywnych białek DraE i AfaE-III produkowanych w cytoplazmie.

6.5.1.3 Wnioski z analizy strukturalnej adhezyn z rodziny Dr

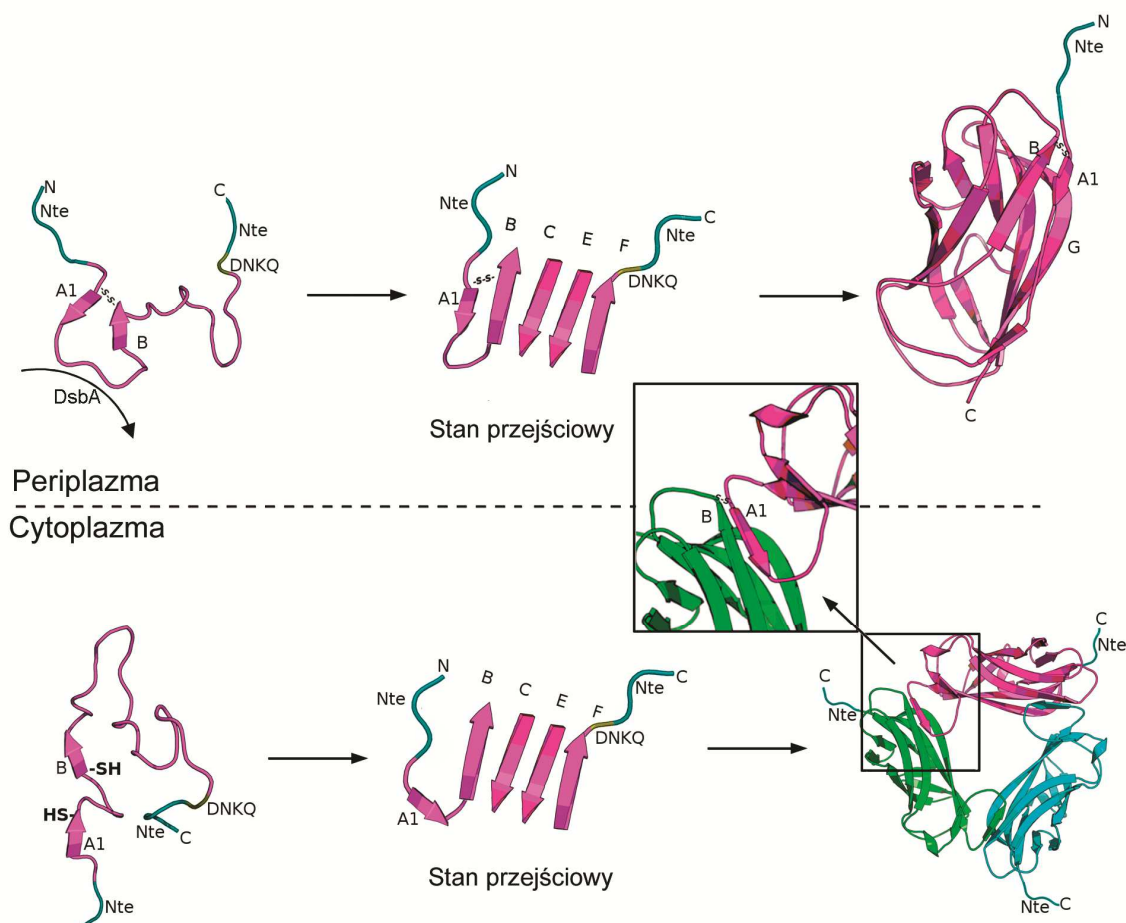
Przeprowadzona analiza pozwala na wyciągnięcie następujących wniosków dotyczących fałdowania białek podjednostkowych z rodziny Dr w warunkach cytoplazmatycznych (redukujących) i periplazmatycznych (utleniających). W środowisku cytoplazmy szczelina akceptorowa może podlegać komplementacji zarówno przez N-terminalną, jak i C-terminalną nić donorową. W pierwszym przypadku następuje formowanie struktur trimerycznych, które charakteryzują się obecnością międzycząsteczkowych mostków disiarczkowych. Mostki takie mogą się wykształcić tylko i wyłącznie wtedy, gdy etap fałdowania białek do formy trimerycznej uległ już zakończeniu. Jest to zgodne z twierdzeniem, że w przypadku białek produkowanych w cytoplazmie tworzenie mostków disiarczkowych następuje po etapie fałdowania. Struktura trimeryczna białka DaaE

wyposażonego zarówno w nić N-Nte jak i C-Nte udowadnia, że preferowana jest komplementacja przez nić donorową zlokalizowaną na N-końcu.

Należy zauważyć, że fizjologicznie bardziej odpowiednia jest struktura podjednostek w postaci monomerycznej ze szczeliną wypełnioną przez nić C-Nte. Cykliczne trimeryczne struktury cytoplazmatyczne są artefaktami, które mogą wynikać z dwóch przyczyn: braku odpowiedniego białka opiekuńczego lub/i utleniających warunków cytoplazmy. W przypadku białka N-Nte-DaaE-C-Nte, które zawiera C-końcową fuzję peptydu donorowego, wpływ braku białka opiekuńczego może zostać wykluczony. Periplazmatyczne i cytoplazmatyczne konstrukty białek DraE i AfaE-III pozbawione N-terminalnej nici donorowej, a zawierające wprowadzoną przez łącznik DNKQ C-terminalną nić donorową obserwowane są w postaci stabilnych monomerów – czyli ulegają one spontanicznemu fałdowaniu przy nieobecności białka opiekuńczego. Oznacza to, że przyczyna formowania struktur trimerycznych jest determinowana obecnością w białku DaaE natywnej N-terminalnej nici donorowej oraz utleniającymi warunkami cytoplazmy. Struktury trimeryczne bazują na samokomplementacji szczeliny akceptorowej podjednostki przez N-terminalną nić donorową o ułożeniu antyrównoległym do β -nici F. Taka samokomplementacja wymaga fizycznego wypełnienia nici A1 i jej wniknięcia do struktury β -kanapki sąsiedniej podjednostki. W tym momencie wyraźnie uwidoczniła zostaje różnica pomiędzy fałdowaniem podjednostek w periplazmie i w cytoplazmie. W przestrzeni periplazmatycznej następuje bardzo szybkie wytworzenie mostków disiarczkowych w fałdowanych białkach. Oznacza to, że na bardzo wczesnym etapie fałdowania podjednostek fimbrialnych następuje wytworzenie mostka disiarczkowego łączącego początek β -nici A1 z końcem β -nici B. Powoduje to, że nie jest możliwe wypełnienie nici A1 konieczne do reakcji samokomplementacji N-końcową nicią donorową i następujące po nim utworzenie cyklicznych trimerów. To wyjaśnia, dlaczego natywne białka AfaE-III i DraE produkowane w periplazmie w przeciwieństwie do identycznych konstruktów produkowanych w cytoplazmie nie tworzą trimerów, lecz podlegają degradacji.

Powyższa obserwacja pozwala sprecyzować hipotezę dotyczącą wpływu formowania mostka disiarczkowego typu A-B na determinowanie drogi fałdowania podjednostek białkowych rodziny Dr (Rys. 40). Cytoplazmatyczne trimery DraE, AfaE-III i DaaE reprezentują potencjalną nieproduktywną drogę fałdowania, która dominowałaby w

periplazmie, gdyby podjednostki nie zawierały reszt cysteiny zdolnych do tworzenia mostka disiarczkowego łączącego nici A i B. Oznacza to, że tworzenie mostka A-B na wczesnym etapie fałdowania podjednostek blokuje potencjalną nieefektywną drogę fałdowania obserwowaną w cytoplazmie. Przedstawiona hipoteza wymagała potwierdzenia doświadczalnego. W tym celu skonstruowałam białko N-Nte-DraE-C-Nte, które posiadało identyczną konstrukcję fuzyjną, jak opisane powyżej białko N-Nte-DaaE-C-Nte tworzące trimery. W przeciwieństwie do niego, skonstruowane białko DraE wyposażone zostało w sekwencję sygnałną warunkującą jego transport do przestrzeni periplazmatycznej. W efekcie stwierdzenie, czy periplazmatyczne białko DraE jest stabilnym monomerem czy też tworzy trimery pozwoliłoby na jednoznaczne zweryfikowanie postawionej hipotezy.

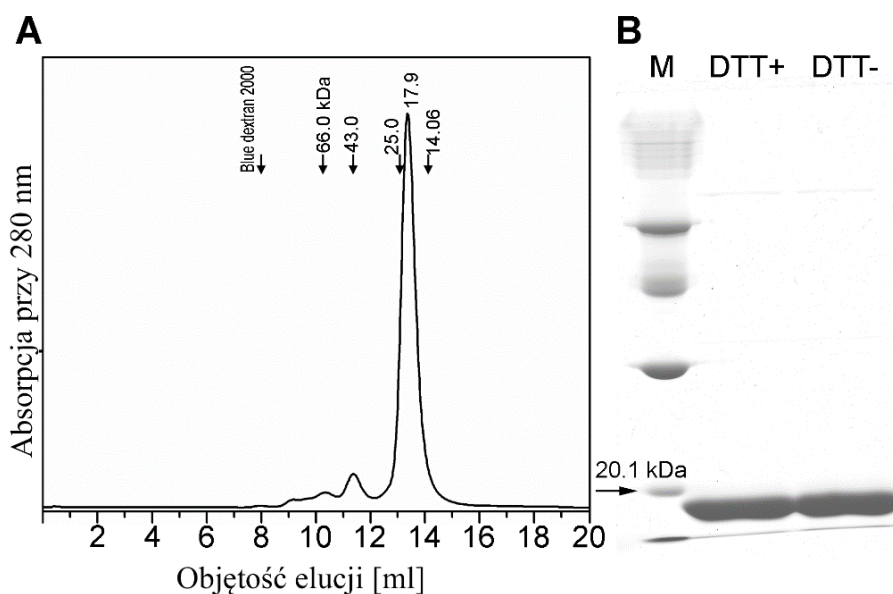


Rys. 40. Analiza wpływu mostka disiarczkowego w obrębie struktury białka DraE na jego stabilność i drogę fałdowania. Warunki utleniające periplazmy (górny panel) sprzyjają szybkiemu tworzeniu mostka disiarczkowego przez oksydoreduktazę DsbA. Środowisko redukujące (cytoplazma, dolny

panel) skutkuje formowaniem mostka po zakończeniu procesu fałdowania. W takich warunkach DraE tworzy struktury trimeryczne o wymienionych między poszczególnymi podjednostkami niciach A1, stabilizowane międzycząsteczkowym mostkiem disiarczkowym. W periplazmie niemożliwa jest wymiana nici A1, ponieważ blokuje ją utworzone wcześniej wiązanie S-S.

6.5.1.4 Białko N-Nte-DraE-C-Nte tworzy w periplazmie stabilne monomery

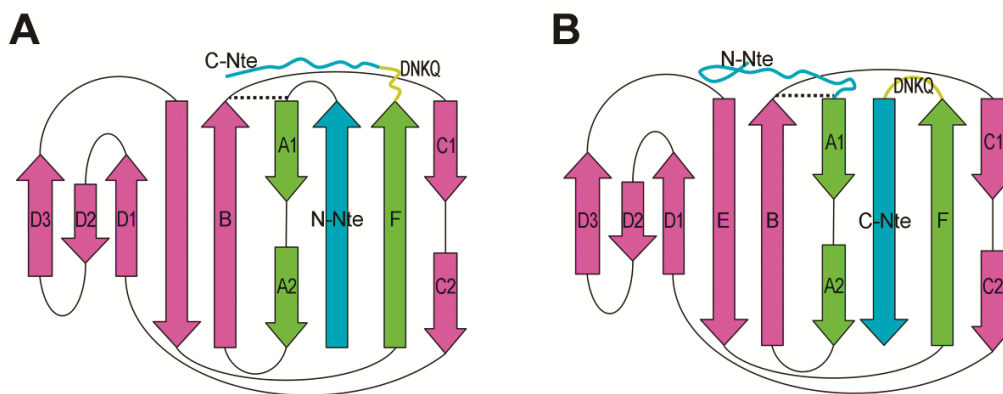
W celu weryfikacji postawionej hipotezy skonstruowałam szczep *E. coli* BL21(DE3)/pET30-N-Nte-DraE-C-Nte produkujący fuzyjne białko DraE o dwóch niciach donorowych na N- i C-końcu (Rys. 39) (Materiały 4.3). Białko to ma konstrukcję identyczną jak homologiczne białko DaaE, tworzące podczas fałdowania w cytoplazmie trimery. Próbkę zawierającą białko N-Nte-DraE-C-Nte po oczyszczeniu za pomocą chromatografii metalopowinowactwa (Metody 5.8) i zagęszczeniu poprzez dializowanie (Metody 5.9) poddałam analizie za pomocą chromatografii wykluczania (Metody 5.10). Na otrzymanym chromatogramie dominuje jeden pik, o czasie retencji odpowiadającym masie cząsteczkowej monomeru (ok. 18 kDa) (Rys. 41A). Uzyskaną podczas rozdziału chromatograficznego frakcję elucyjną poddałam następnie analizie za pomocą elektroforezy SDS-PAGE z użyciem dwóch rodzajów próbek: inkubowanych w typowym buforze Laemmli zawierającym czynnik redukujący mostki disiarczkowe (DTT, Materiały 4.13) oraz inkubowanych w buforze pozbawionym DTT. Dla obu próbek otrzymano identyczny prążek o masie właściwej dla monomeru białka (Rys. 41B). Poprawność utworzenia wewnątrzcząsteczkowego mostka disiarczkowego sprawdziłam przy pomocy reakcji Ellmana (Metody 5.13). Otrzymane wyniki świadczą o tym, że w utleniającym środowisku przestrzeni periplazmatycznej białko N-Nte-DraE-C-Nte ulega fałdowaniu do postaci monomerycznej.



Rys. 41. Analiza stopnia oligomeryczności białka N-Nte-DraE-C-Nte. A – chromatogram przedstawiający elucję badanego białka. Strzałki wskazują objętości elucji standardów białkowych: rybonkleazy A – 14,06 kDa, chymotrypsynogenu A – 25 kDa, owalbuminy – 43 kDa, albuminy – 66 kDa, a także objętość martwą kolumny wyznaczoną z użyciem odczynnika Blue Dextran 2000. B – elektroforeza SDS-PAGE próbek białek w roztworze redukującym (oznaczonym jako DTT+) i nieredukującym (DTT-), inkubowanych w 98°C. M – marker niskocząsteczkowy (14,4, 20,1, 30, 45, 66, 99 kDa; Amersham Biosciences)

6.5.1.5 Szczelina akceptorowa białka N-Nte-DraE-C-Nte jest stabilizowana przez C-terminalną nić donorową

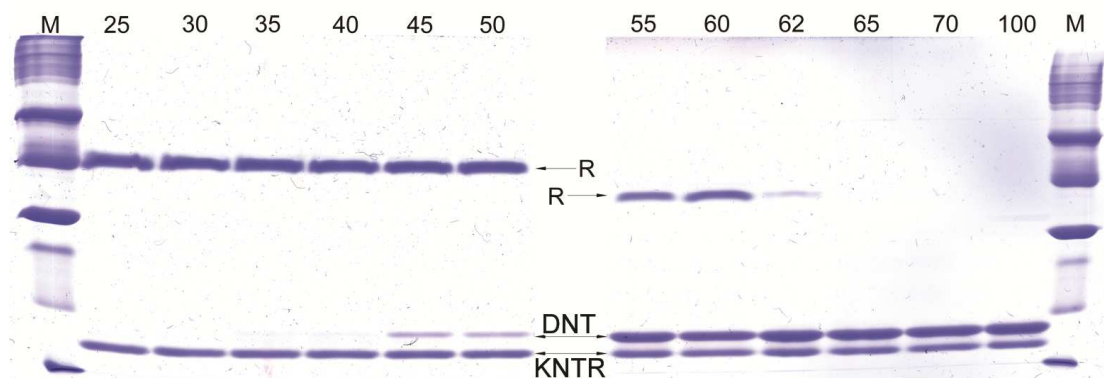
W przypadku białka N-Nte-DraE-C-Nte istnieją dwie alternatywne drogi stabilizacji szczeliny akceptorowej: odpowiednio przez N- lub C-końcowy peptyd donorowy (Rys. 42). Komplementacja przy pomocy nici N-terminalnej skutkowałaby strukturą o wzajemnym równoległym ułożeniu nici F i Nte – położenie antyrównoległe w takiej konfiguracji jest zablokowane przez wewnątrzcząsteczkowy mostek disiarczkowy, który uniemożliwia reorganizację nici A1.



Rys. 42. Diagramy topologiczne obrazujące dwie możliwości komplementacji szczeliny akceptorowej w białku N-Nte-DraE-C-Nte przez nić donorową Nte na N-końcu (A) i nić donorową Nte na C-końcu (B). Przerywaną linią zaznaczono mostek disiarczkowy. DNKQ oznacza łącznik peptydowy pomiędzy F i C-terminalną Nte.

Samokomplementujące podjednostki wykazujące równoległe ułożenie nici charakteryzują się niewielką stabilnością, co zostało wykazane na przykładzie podjednostki FimA (Puorger *et al*, 2011, Walczak *et al.*, 2013). Białko FimA komplementowane przez N-terminalną nić donorową o ułożeniu równoległym do β -nici F posiada energię stabilizacji Gibbsa równą -10 kJ/mol, która jest o 60 kJ/mol mniejsza od energii stabilizacji charakteryzującej podjednostki uzupełniane przez C-terminalny peptyd donorowy o ułożeniu antyrównoległym do nici F. Ułożenie antyrównoległe, wynikające z uzupełnienia szczeliny akceptorowej przez nić donorową umieszczoną na C-końcu, skutkuje wysoką stabilnością kinetyczną i termodynamiczną tak skonstruowanych podjednostek. Dlatego też w celu ustalenia, która z nici uzupełnia szczelinę w przypadku białka N-Nte-DraE-C-Nte przeanalizowano jego stabilność kinetyczną z użyciem testu retardacji migracji w żelu SDS-PAGE białek o wysokiej stabilności kinetycznej (Metody 5.12). Identyczny test wykorzystano wcześniej do analizy stabilności kinetycznej białka DraE-sc posiadającego delecję N-terminalnej nici donorowej. W przypadku tego białka efekt retardacji utrzymywał się dla próbek inkubowanych w temperaturze 70°C przez 10 minut (Piątek *et al.*, 2010). Dla próbki białka inkubowanej w temperaturze 25°C obserwowano 100% efekt retardacji w stosunku do białka poddanego denaturacji termicznej w temperaturze 100°C przez 10 minut. Dla badanego w

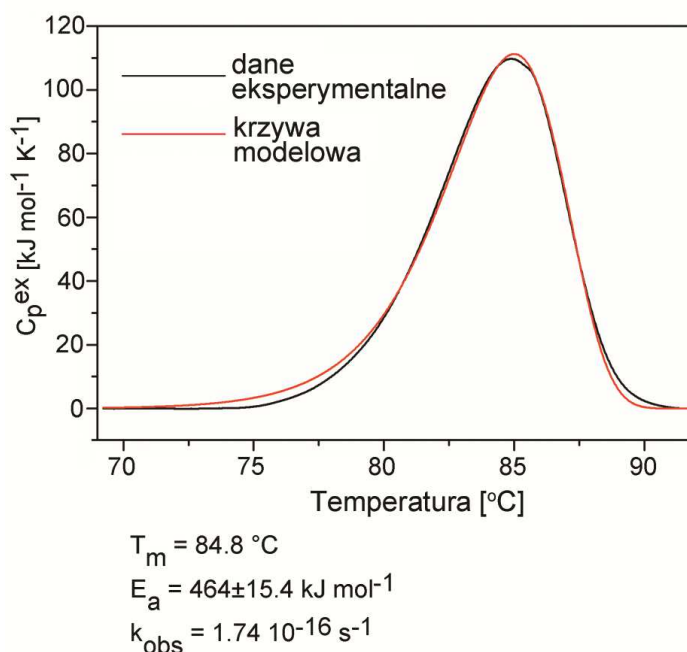
pracy białka N-Nte-DraE-C-Nte efekt retardacji obserwowany był aż do temperatury 62°C. Jako kontrolę wewnętrzną w każdej z analizowanych próbek białka N-Nte-DraE-C-Nte wykorzystałam białko DraD, które nie wykazuje stabilności kinetycznej (Rys. 43).



Rys. 43. Analiza stabilności kinetycznej białka N-Nte-DraE-C-Nte za pomocą testu opóźnienia migracji w żelu SDS-PAGE. Próbkę białka inkubowano przed naniesieniem na żel przez 10 minut w temperaturach zaznaczonych na zdjęciu. DNT – zdenaturowana forma białka o masie ok. 18 kDa, KNTR – białko DraD-sc zawarte w każdej próbce jako białko odnośnikowe (masa 16,34 kDa), nie wykazujące stabilności kinetycznej, R – opóźnione w elektroforezie białko natywne. M – marker „low-molecular mass calibration kit for SDS electrophoresis” (14,4, 20,1, 30, 45, 66, 97 kDa; GE Healthcare).

Test retardacyjny w sposób jakościowy wykazał, że białko N-Nte-DraE-C-Nte jest komplementowane przez fuzję C-terminalną, analogicznie jak białko DraE-C-His o delecji N-terminalnego peptydu donorowego (Piątek *et al.*, 2009). Wcześniejsze badania prowadzone z wykorzystaniem mikrokalorymetrii skaningowej DSC pozwoliły na ilościowe określenie parametrów charakteryzujących stabilność tego białka. Można założyć, że jeżeli białko N-Nte-DraE-C-Nte identycznie jak DraE-C-His jest uzupełniane przez C-terminalną fuzję, to powinno ono wykazywać zbliżone wartości parametrów stabilności. W celu potwierdzenia tego założenia białko N-Nte-DraE-C-Nte poddałam analizie mikrokalorymetrycznej zgodnie z metodologią opisaną w rozdziale Metody 5.10. Proces denaturacji białka N-Nte-DraE-C-Nte jest całkowicie nieodwracalny – w drugim skanie grzania nie zaobserwowano jakiegokolwiek piku odpowiadającego endotermicznej przemianie denaturacji białka. Proces denaturacji jest kontrolowany kinetycznie, czego

dowodem jest zależność temperatury topnienia od prędkości grzania. Eksperymentalne termogramy DSC otrzymane dla białka N-Nte-DraE-C-Nte podlegały analizie z wykorzystaniem zredukowanego do stanu natywnego i finalnego (nieodwracalnego) modelu Lumry-Eyring (Rys. 44).



Rys. 44. Różnicowa mikrokalorymetria skaningowa procesu denaturacji termicznej białka N-Nte-DraE-C-Nte. Wykres przedstawia eksperymentalną zależność pojemności cieplnej od temperatury dla białka skanowanego z prędkością 1°C/min. Na wykresie umieszczono również krzywą uzyskaną poprzez zastosowanie dwustanowego modelu denaturacji.

Taki sam mechanizm denaturacji został wcześniej potwierdzony dla białka DraE-C-His. W tabeli 6 zebrano kinetyczne parametry charakteryzujące stabilność białek DraE-C-His i N-Nte-DraE-C-Nte uzyskane techniką kalorymetrii DSC. N-Nte-DraE-C-Nte odznacza się temperaturą topnienia 84,8°C, która zbliżona jest do wartości uzyskanej dla białka DraE-C-His (87,35°C). Stabilność białka N-Nte-DraE-C-Nte, podobnie jak białka DraE-C-His definiowana jest bardzo wysoką energią aktywacji E_a dla procesu przejścia formy natywnej (N) w formę zdenaturowaną (D), która następnie przechodzi w formę finalną (F). Kinetyka procesu denaturacji determinowana jest stałą szybkością najwolniejszego etapu, którym w

tym przypadku jest przemiana formy N w D. Wartość stałej szybkości dla N-Nte-DraE-C-Nte wynosi $1,74 \times 10^{-16} \text{ s}^{-1}$, czemu towarzyszy czas półtrwania w temperaturze 25°C równy 10^9 lat. Dane te silnie kontrastują z parametrami termodynamicznymi charakteryzującymi podjednostkę FimA, w której komplementacja szczeliny akceptorowej następuje przy pomocy N-końcowej nici donorowej w układzie równoległym do nici F (Puorger *et al.*, 2008, Walczak *et al.*, 2014).

Nazwa próbki	N-Nte-DraE-C-Nte	DraE-C-Nte
Temperatura topnienia T_m [°C]	84,8	87,35
Średnia energia aktywacji E_a [kJ·mol ⁻¹]	$454,3 \pm 15,4$	$463,3 \pm 20,8$
Stała szybkości reakcji k_{obs} [s ⁻¹]	$1,74 \times 10^{-16}$	$3,12 \times 10^{-17}$

Tabela 6. Porównanie eksperymentalnych danych uzyskanych dla analiz białek N-Nte-DraE-C-Nte i DraE-C-Nte za pomocą techniki różnicowej mikrokalorymetrii skaningowej.

Rezultaty tej części badań świadczą o tym, że w białku fuzyjnym N-Nte-DraE-C-Nte szczelina hydrofobowa ulega komplementacji przez nić donorową zlokalizowaną na C-końcu białka, skutkując antyrównoległym ułożeniem nici F oraz Nte. Takie wzajemne ułożenie nici prowadzi do wykształcenia wysokiej stabilności białka.

Przeprowadzona analiza stanu oligomeryczności białka N-Nte-DraE-C-Nte potwierdza pośrednio zaproponowany w punkcie 6.5.1.2 mechanizm wpływu formowania się mostka S-S na determinowanie drogi fałdowania adhezyn z rodziny Dr.

6.6 Mechanizm oddziaływania pilicydów na biogenezę fimbrii Dr

Drugie podejście eksperymentalne wykorzystane w niniejszej pracy obejmowało przeanalizowanie wpływu działania pilicydów na biogenezę fimbrii Dr, jako przedstawiciela struktur typu FGL. Jak wspomniano we wstępie, miejsce wiązania pilicydów znajduje się w rejonie obejmującym nici F1-C1-D1 będącym częścią pętli F1-G1. Długość tej pętli stanowi

wyznacznik dzielący białka opiekuńcze na dwie grupy i różnice w jej strukturze pomiędzy białkami FGL/FGS mogą mieć istotny wpływ na wiązanie pilicydów. W takim przypadku, związki te mogłyby być traktowane jako indykatory odróżniające białka FGL i FGS. Dotychczasowe badania dotyczące antybakteryjnego działania pilicydów koncentrowały się na związkach opracowanych i przetestowanych na najlepiej poznanych przedstawicielach rodziny białek typu FGS: chaperonach PapD oraz FimC. Do badań wykorzystano związki należące do pilicydów pierwszej generacji (Rys. 30 A i B, oznaczone dalej w tekście odpowiednio jako pilicyd 1 i pilicyd 2). Związki te wykazują najsilniejsze działanie hamujące w stosunku do pili P i pili typu 1 (Aberg *et al.*, 2006), a efekt ich stosowania na szczepy produkujące wspomniane pilie jest bardzo dobrze opisany w literaturze – zarówno pod względem strukturalnym (miejsca wiązania do białka opiekuńczego), jak i testów biologicznych na całych komórkach bakteryjnych (Svensson *et al.*, 2001; Pettigrew *et al.*, 2004; Pinker *et al.*, 2006; Aberg *et al.*, 2006; Aberg *et al.*, 2007; Aberg *et al.*, 2008; Chorell *et al.*, 2010). Wybór tych związków, mimo ich mniejszej efektywności wiązał się z ich prostszą, w stosunku do pilicydów drugiej generacji, budową: nie posiadają one podstawnika w pozycji R⁴, w związku z czym ich użycie pozwala na uzyskanie bardziej ogólnego poglądu na wpływ pilicydów na struktury adhezyjne typu FGL. W badaniach wykorzystano testy na całych komórkach szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 (Materiały 4.3), który eksprymuje cały operon *dra*, a funkcję kontroli negatywnej spełniał szczep BL21(DE3)/pACYC184, nie wykazujący produkcji fimbrii Dr (Materiały 4.3). Rezultaty tej części badań zostały opublikowane w 2013 roku w czasopiśmie BMC Microbiology (Piątek *et al.*, 2013).

6.6.1 Wpływ pilicydów na biogenezę fimbrii Dr

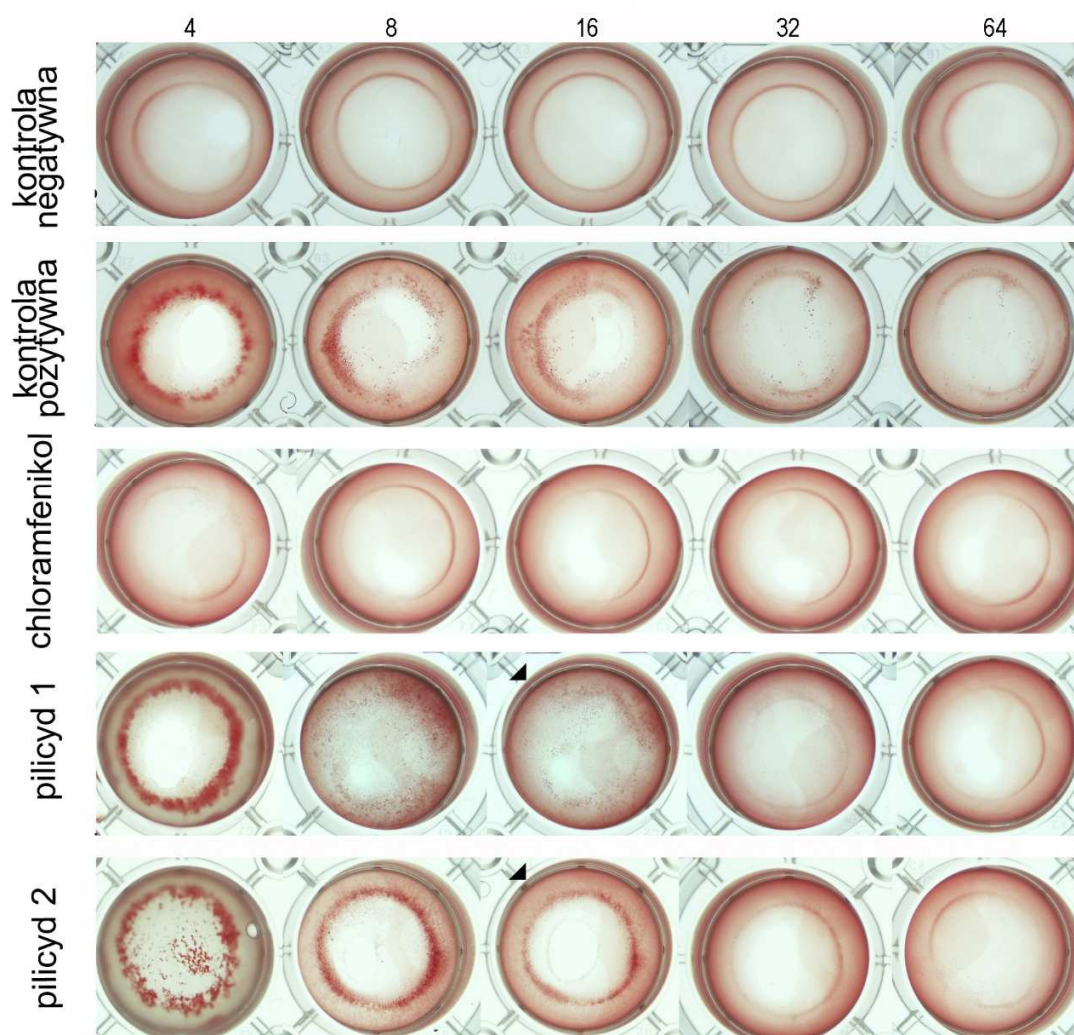
W celu przeanalizowania działania badanych związków jako czynników zaburzających biogenezę fimbrii Dr wykonano test hemaglutynacji (HA, ang. *haemagglutination assay*) (Metody 5.19). Podstawą tej techniki jest zdolność komórek bakteryjnych do wywoływania aglutynacji ludzkich erytrocytów (Materiały 4.20), które na swojej powierzchni prezentują receptor DAF, rozpoznawany przez białko DraE fimbrii Dr. Oddziaływanie DraE-DAF jest hamowane w obecności chloramfenikolu w stężeniu 2 μ M (Pettigrew *et al.*, 2004). Specyficzność występującej w badaniu hemaglutynacji została zweryfikowana poprzez obserwację jej odwracalności na skutek dodania tego antybiotyku. Zdolność hemaglutynacji

jest zależna od ilości fimbrii występujących na powierzchni komórki bakteryjnej w obecności pilicydu. W eksperymencie określiłam miano HA – największe rozcieńczenie bakterii, które nadal wywołuje hemaglutynację (Rys. 45). Niska wartość miana oznacza, że do zaobserwowania aglutynacji erytrocytów niezbędne jest wysokie stężenie bakterii o ograniczonej liczbie fimbrii na powierzchni ich komórek. W teście wykorzystałam szczep BL21(DE3)/pBJN406 hodowany na podłożu stałym TSA w obecności pilicydów o stężeniu 3,5 mM oraz kontrolę pozytywną w postaci tego samego szczepu wzrastającego bez dodatku pilicydów i kontrolę negatywną – szczep BL21(DE3)/pACYC184 (Materiały 4.3). Do znajdujących się w płytkach mikrotitracyjnych hodowli obu szczepów bakteryjnych w różnych rozcieńczeniach dodano równe objętości zawiesiny erytrocytów, po czym określono miano HA. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli 7. Miana zostały obliczone jako średnia z trzech niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach.

Próbka	Miano HA
Kontrola pozytywna (szczep BL21(DE3)/pBJN406)	128
Kontrola negatywna (szczep BL21(DE3)/pACYC184)	1
Szczep BL21(DE3)/pBJN406 hodowany w obecności pilicydu 1	16
Szczep BL21(DE3)/pBJN406 hodowany w obecności pilicydu 2	32

Tabela 7. Wartości miana HA uzyskane dla różnych kombinacji szczep bakteryjny/pilicyd/suplementacja pilicydem.

Miano hemaglutynacji



Rys. 45. Wpływ działania pilicydów na aglutynację ludzkich erytrocytów zależną od fimbrii Dr. Zastosowano oznaczenia: kontrola negatywna – szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYC184, nie wykazujący produkcji fimbrii Dr, hodowany na płytkach z podłożem TSA i 5% DMSO; kontrola pozytywna - szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406, produkujący fimbrie Dr, hodowany na płytkach z podłożem TSA bez pilicydów; chloramfenikol - szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 produkujący fimbrie Dr, hodowany na płytkach z podłożem TSA bez pilicydów, test HA wykonany został w obecności chloramfenikolu w stężeniu 2 μ M; pilicyd 1/pilicyd 2 - szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 hodowany na płytkach z podłożem TSA w obecności odpowiednio pilicydu 1/pilicydu 2 w stężeniu 3,5 mM. Zaprezentowano rozcieńczenia z pominięciem początkowych (1-2) oraz ostatniego, 128. Czarnymi trójkątami zaznaczono największe rozcieńczenia zapewniające obserwowalną hemaglutynację w przypadku szczepów hodowanych w obecności pilicydów (Piątek *et al.*, 2013).

Uzyskane wyniki jasno wskazują na efekt redukcji ilości fimbrii na powierzchni komórek *E. coli* spowodowany oddziaływaniem pilicydów ze szlakiem ich biogenezy.

6.6.2 Wpływ pilicydów na zależną od fimbrii Dr adherencję komórek bakteryjnych

Kolejna część badań z użyciem pilicydów obejmowała określenie wpływu pilicydów na adherencję bakterii produkujących fimbrie Dr do komórek linii CHO-DAF+ (Materiały 4.2, Metody 5.18). Komórki te, w wyniku transfekcji ludzkim cDNA uzyskały zdolność wytwarzania na swojej powierzchni receptora DAF, będącego czynnikiem rozpoznawanym przez adhezynę DraE. W celu uzyskania miarodajnych wyników do porównania wykorzystywałam również komórki linii CHO-DAF- (linii komórek nie poddanych transfekcji) (Materiały 4.2). Szczep bakteryjny BL21(DE3)/pBJN406 hodowany był na płytkach z podłożem TSA (Materiały 4.19) z dodatkiem pilicydów w różnym stężeniu – 0 (podłoże bez dodatku pilicydów, stanowiące podstawę dla eksperymentalnej kontroli dodatniej) 0,5, 1,5, 2,5 oraz 3,5 mM (największe stężenie wybrano z uwagi na możliwość porównania efektów działania badanych związków z udokumentowanymi literaturowo efektami osiągniętymi w przypadku biogenezy pili P i typu 1). Adherencja bakterii do komórek CHO uwidoczniła została poprzez barwienie barwnikiem Giemsy (Materiały 4.18), a następnie obserwację mikroskopową przy powiększeniu x10000. W celach statystycznych dla każdej kombinacji szczepu bakteryjnego i linii komórkowej przeprowadzono cztery powtórzenia eksperymentu, w wyniku czego uzyskano komplet 12 danych. Wartości adherencji w tej części badań wyrażone zostały jako procentowy stosunek średniej wartości adherencji do kontroli pozytywnej, z uwzględnieniem odchylenia standardowego.

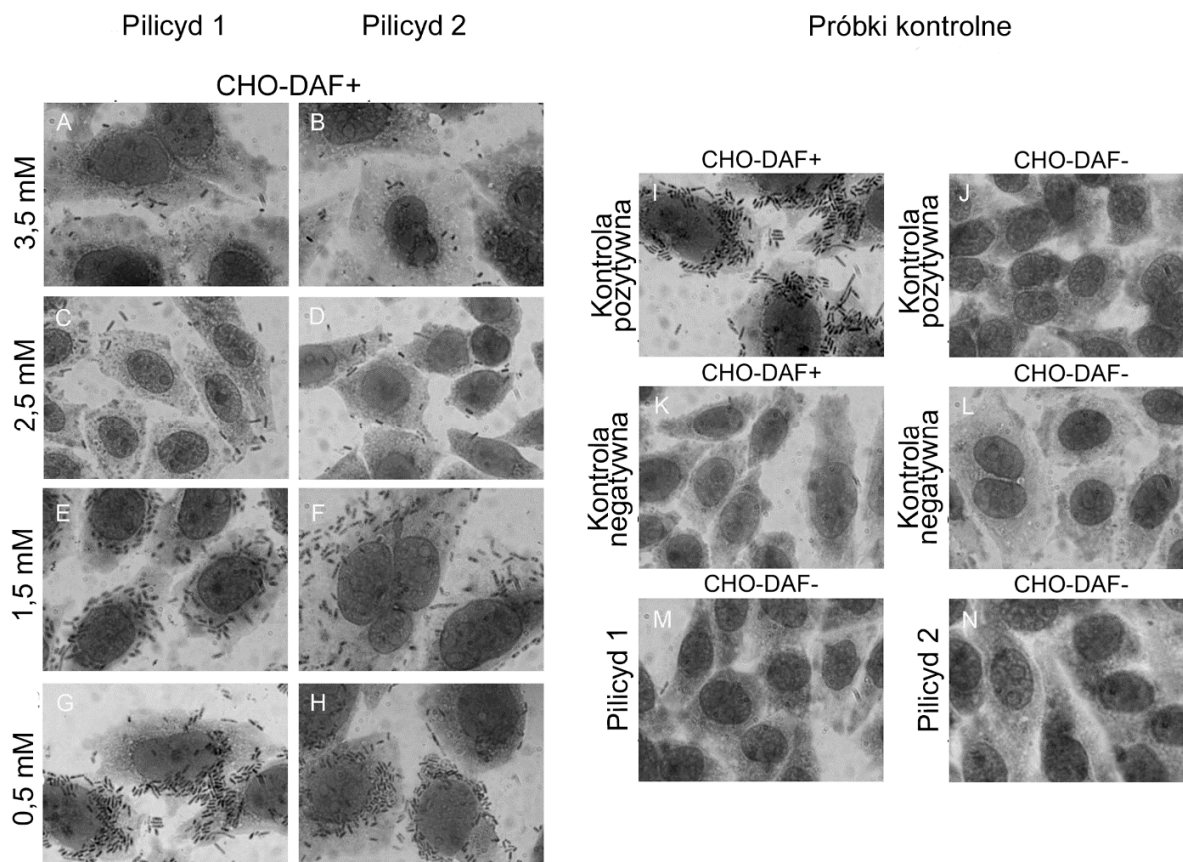
Analiza otrzymanego obrazu w przypadku szczepu kontroli dodatniej (szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 hodowany na podłożu bez pilicydów) potwierdziła występowanie na powierzchni komórek bakteryjnych dużej ilości funkcjonalnych fimbrii Dr, umożliwiających prawidłowe rozpoznanie receptora DAF i przytwierdzenie bakterii do komórek CHO-DAF+ (Rys. 46I). Wartość adherencji dla tego przypadku oznaczono jako odnośnikową (100%) dla pozostałych wariantów eksperymentalnych. W wariantach tych obserwowana adherencja oznaczona została jako procent wartości średniej adherencji w stosunku do kontroli

dotadniej. Dodatek pilicydów w stężeniu 3,5 mM do pożywki bakteryjnej skutkował znaczącym obniżeniem zdolności adhezyjnych bakterii, porównywalnym dla obu użytych związków: dla pilicydu 1 uzyskano względną adherencję na poziomie 25% \pm 7 (Rys. 46A), a dla pilicydu 2 – 13% \pm 3 (Rys. 46B). Dla pozostałych próbek z użyciem szczepu produkującego fimbrie zaobserwowano widoczną zależność pomiędzy zastosowanym stężeniem pilicydów a adherencją względną (Tabela 8, Rys. 46G, E, C, H, F, D).

Stężenie pilicydu [mM]	Adherencja względna dla pilicydu 1	Adherencja względna dla pilicydu 2
0,5	90 \pm 3	92% \pm 8
1,5	60% \pm 5	42% \pm 7
2,5	32% \pm 6	21% \pm 9

Tabela 8. Zależność obserwowanej adherencji względnej dla szczepu *E. coli*BL21(DE3)/pBJN406 od stężenia użytego pilicydu.

Aby udowodnić, że obserwowana adherencja wynika z obecności interakcji DraE-DAF, zastosowałam linię komórkową CHO nieprodukującą receptora DAF (CHO-DAF-, Materiały 4.2). Dla eksperymentów wykorzystujących tę linię, przy zastosowaniu zarówno niesuplementowanego pilicydami szczepu BL21(DE3)/pBJN406 (Rys. 46J) jak i hodowanego w takich samych warunkach szczepu BL21(DE3)/pACYC184 (Rys. 46L) oraz dla szczepu BL21(DE3)/pBJN406 hodowanego w obecności pilicydów 1 i 2 w stężeniu 3,5 mM (Rys. 46M, N) uzyskano adherencję względną na poziomie 3-6% \pm 1-2. Podobną wartość – 5% \pm 6 – otrzymano dla interakcji pozbawionego fimbrii szczepu BL21(DE3)/pACYC184 z komórkami CHO-DAF+.



Rys. 46. Pilicydo-zależna inhibicja adherencji szczepu *E. coli* Dr⁺ do komórek linii CHO-DAF+. Wiązanie bakterii do linii komórkowych uwidoczniło się przez barwienie metodą Giemsa przy zastosowaniu powiększenia x10000. Oznaczenia na rysunku: Kontrola negatywna – szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYC184 nie wytwarzający fimbrii Dr, hodowany na płytkach z podłożem TSA z dodatkiem 5% DMSO. Kontrola pozytywna – szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 produkujący fimbrie Dr, hodowany na płytkach z podłożem TSA bez dodatku pilicydu. Pilicyd 1/Pilicyd 2 – szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 hodowany na płytkach z podłożem TSA z dodatkiem 0,5, 1,5, 2,5 oraz 3,5 mM pilicydu 1/pilicydu 2. Fotografie przedstawiają reprezentatywny wynik uzyskany dla trzech niezależnych eksperymentów w czterech powtórzeniach (Piątek *et al.*, 2013).

Analiza statystyczna potwierdziła istotność zależnej od stężenia pilicydów obniżonej adherencji ($p < 0,05$). Jedynie w przypadku 0,5 mM stężenia pilicydu 2 wpływ w stosunku do kontroli pozytywnej okazał się statystycznie nieistotny ($p = 0,068$). Wzrastające stężenie badanych związków również wpływało na poziom adherencji ($p < 0,05$).

6.6.3 Test ELISA – ocena zdolności produkcji fimbrii Dr w obecności pilicydów

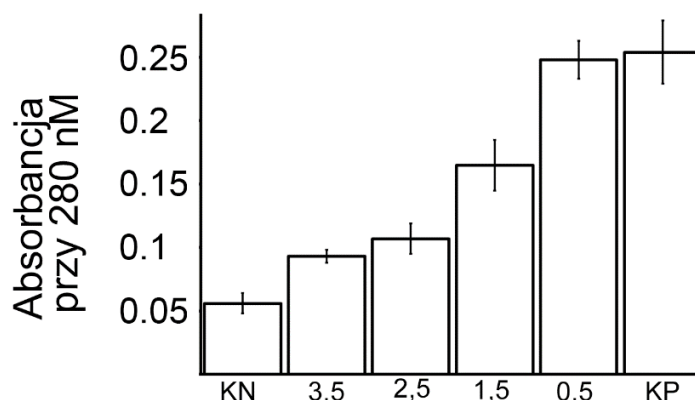
Ocena wpływu obecności pilicydów na wykazywaną przez komórki bakteryjne zdolność produkcyjną fimbrii Dr została wykonana za pomocą testu ELISA z wykorzystaniem przeciwciał anti-DraE oraz anti-króliczych przeciwciał wyznakowanych peroksydazą chrzanową (Metody 5.20). Podstawą do tego badania była zdolność podjednostek DraE do wiązania kolagenu typu IV. W związku z tym, w eksperymencie użyto płytek polistyrenowych, których studzienki opłaszczono ludzkim kolagenem typu IV (Materiały 4.21), a następnie zablokowano roztworem BSA. Do studzienek dodano następnie różne rozcieńczenia hodowli komórek bakteryjnych produkujących fimbrie Dr, zbudowane z rozpoznających kolagen podjednostek DraE. Fimbrie Dr obecne na powierzchni komórek w studzienkach uwidoczniło się poprzez dodanie pierwszorzędowych króliczych przeciwciał anti-DraE i drugorzędowych przeciwciał kozich anti-króliczych, znakowanych peroksydazą chrzanową. Celem eksperymentu było oszacowanie działania pilicydu 1 (w stężeniu 0,5, 1,5, 2,5 oraz 3,5 mM) polegającego na redukcji ilości produkowanych przez szczep BL21(DE3)/pBJN406 fimbrii (Tabela 9). W przypadku tego testu zastosowano hodowle szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 i BL21(DE3)/pACYC184 w pożywce płynnej LB (Materiały 4.4) z uwagi na fakt, że izolacja kolonii z powierzchni płytek z podłożem stałym skutkowałą silnym sygnałem tła. Z powodu konieczności użycia pożywki LB z testu wykluczono pilicyd 2, ponieważ ulegał on w niej precypitacji.

Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że zastosowanie pilicydów w stężeniu powyżej 1,5 mM skutkuje znaczącym obniżeniem ilości fimbrii Dr produkowanych przez szczepy bakteryjne (Rys. 47). Obserwowany efekt jest zależny od stężenia użytego związku.

Analiza statystyczna wykazała, że jedynie w przypadku zastosowania najniższego stężenia pilicydu spadek ilości fimbrii jest statystycznie istotny ($p=0,625$).

Stężenie pilicydu 1 [Mm]	Redukcja ilości fimbrii Dr w stosunku do szczepu hodowanego bez dodatku pilicydu [%]
0,5	3
1,5	45
2,5	74
3,5	81

Tabela 9. Zależność stopnia redukcji produkowanych przez komórki szczepu BL21(DE3)/pBJN406 fimbrii od użytego podczas ich hodowli stężenia pilicydu 1.



Rys. 47. Ocena ilości fimbrii Dr na powierzchni komórek za pomocą testu ELISA z użyciem ludzkiego kolagenu typu IV. Zastosowano oznaczenia: KN – kontrola negatywna, szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYC184, nie wykazujący produkcji fimbrii; 3,5/2,5/1,5/0,5 - szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 hodowany w pożywce LB z dodatkiem pilicydu 1 w stężeniu odpowiednio, 3,5, 2,5, 1,5 oraz 0,5 mM; KP – kontrola pozytywna, szczep *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 produkujący fimbrie Dr, hodowany w pożywce LB bez pilicydu. Słupki wykresu reprezentują odchylenie standardowe średniej z trzech niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach (Piątek *et al.*, 2013).

6.6.4 Ocena ilości produkowanych w obecności pilicydów fimbrii Dr – analiza densytometryczna frakcji fimbrialnych

Efekt wywołany przez obecność pilicydów na zdolność komórek bakteryjnych do produkowania fimbrii Dr został zweryfikowany poprzez analizę densytometryczną żeli SDS-PAGE zawierających próbki frakcji fimbrialnych, zabarwionych barwnikiem Coomassie Blue

(Metody 5.21). Metoda ta pozwala na ocenę ilości wyprodukowanych przez komórki bakteryjne podjednostek DraE. Ocenie poddawane jest białko w formie monomerycznej, powstające na skutek rozpadu i denaturacji termicznej wyizolowanych fimbrii, stanowiących polimery DraE. W tym celu wykorzystywałam szczep BL21(DE3)/pBJN406 hodowany na płytkach z podłożem stałym TSA z dodatkiem pilicydów w stężeniu 0,5, 1,5, 2,5 oraz 3,5 mM. Kontrolę negatywną stanowił niewytwarzający fimbrii szczep BL21(DE3)/pACYC184, a pozytywną – szczep eksperymentalny rosnący na podłożu bez pilicydów. Z wszystkich hodowli wyizolowałam frakcje fimbrialne stosując metodę mechaniczną – poprzez energiczne worteksowanie zawiesiny hodowlanej (Metody 5.6) umożliwiające usunięcie z powierzchni komórek struktur fimbrialnych. Frakcje te zawierały fimbrie Dr w ilości odpowiedniej dla wykorzystanego szczepu bakteryjnego i warunków wzrostu (stężenie pilicydu). W związku z bardzo dużą stabilnością struktur fimbrialnych konieczne było zastosowanie metody umożliwiającej uzyskanie pełnej ich depolimeryzacji do monomerycznych podjednostek DraE. W tym celu próbki poddałam gotowaniu w buforze Laemmli przez 60 minut w 100°C, po czym nałożyłam je na żel poliakrylamidowy i rozdzieliłam poprzez elektroforezę SDS-PAGE (Materiały 4.8, Metody 5.11).

Dla szczepu produkującego fimbrie Dr wykonałam porównanie próbek frakcji fimbrialnych denaturowanych termicznie przed rozdziałem elektroforetycznym oraz próbek inkubowanych w temperaturze pokojowej. Wyraźny prążek, odpowiadający monomerycznej formie białka DraE (ok. 16 kDa) zaobserwowano jedynie w przypadku próbek denaturowanych (Rys. 48A). Potwierdza to nie tylko fakt, że fimbrie Dr są strukturami odpornymi na spontaniczną depolimeryzację, ale również świadczy o tym, że wyizolowane frakcje zawierały jedynie spolimeryzowane białko DraE – otrzymane frakcje przed poddaniem działaniu wysokiej temperatury nie zawierały perioplazmatycznego DraE w formie monomerycznej. W przypadku frakcji wyizolowanych z hodowli prowadzonych w obecności pilicydów uwidoczono znaczny spadek ilości obserwowanego na żelu białka DraE, co podobnie jak w przypadku testu ELISA świadczy o hamującym działaniu tych związków na produkcję fimbrii.

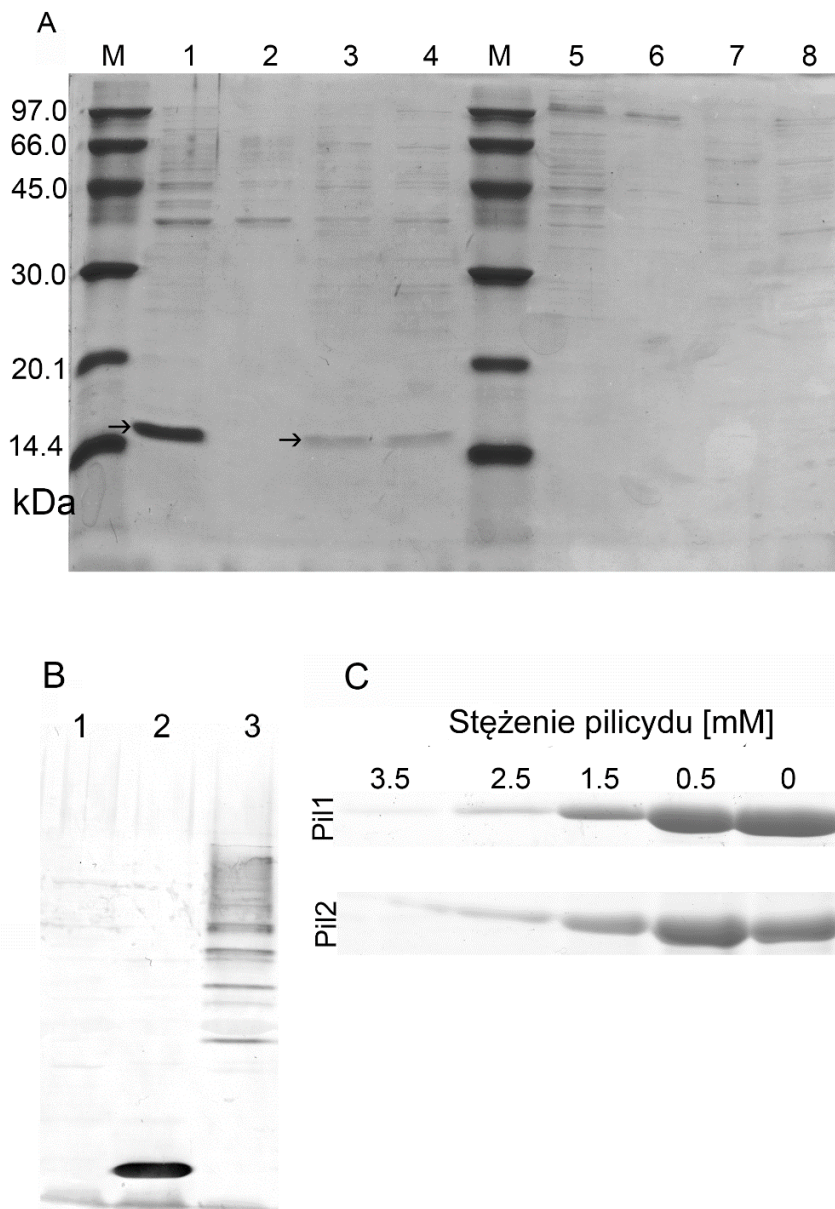
W celu upewnienia się, że warunki denaturacji są wystarczające do wystąpienia całkowitego rozpadu fimbrii Dr do monomerycznego DraE wykonałam analizę próbek frakcji fimbrialnych za pomocą techniki Western Blotting z wykorzystaniem przeciwciał

pierwszorzędowych specyficznych dla DraE oraz drugorzędowych, znakowanych peroksydazą chrzanową. Do tej części badania wybrałam denaturowaną próbkę kontroli negatywnej (frakcję z hodowli BL21(DE3)pACYC184), denaturowaną próbkę zawierającą frakcję z niesuplementowanej pilicydami hodowli szczepu BL21(DE3)/pBJN406 oraz taką samą próbkę inkubowaną w temperaturze pokojowej (Rys. 48B). Uzyskany obraz – prążek odpowiadający monomerycznemu DraE jedynie w przypadku zdenaturowanej frakcji wyizolowanej z hodowli szczepu BL21(DE3)/pBJN406 bez dodatku pilicydów oraz brak charakterystycznej „drabinki” dla oligomerów – potwierdził, że wybrane warunki denaturacji są wystarczające do uzyskania całkowitej depolimeryzacji fimbrii Dr.

prążków uzyskanych w elektroforezie SDS-PAGE dla frakcji fimbrialnych wyizolowanych z hodowli rosnących na podłożach z dodatkiem pilicydu 1 i 2 nie uwidoczniły wyraźnych różnic w działaniu tych związków (Rys. 48C, Tabela 10). W obu przypadkach obserwuje się efekt redukujący produkcję fimbrii, który zależy od stężenia pilicydu – sięga on od 3-8% dla najniższego stężenia i do 75-80% dla najwyższego stężenia.

Stężenie pilicydu [mM]	Efekt działania pilicydu 1 [% redukcji ilości DraE w stosunku do hodowli bez pilicydu]	Efekt działania pilicydu 2 [% redukcji ilości DraE w stosunku do hodowli bez pilicydu]
0,5	8	3
1,5	55	45
2,5	68	75
3,5	75	80

Tabela 10. Zależność stopnia redukcji produkcji białka DraE przez szczep BL21(DE3)/pBNJ406 od stężenia pilicydu dodanego do pożywki hodowlanej.



Rys. 48. Ocena ilości fimbrii Dr wytworzonych przez komórki bakteryjne hodowane w obecności pilicydów. A – rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE białek zawartych we frakcjach fimbrialnych wyizolowanych z hodowli szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pBJN406 na płytkach TSA bez dodatku pilicydu (studzienki 1 i 5), hodowli BL21(DE3)/pACYC184 (studzienki 2 i 6) oraz hodowli BL21(DE3)/pBJN406 rosnącej w obecności 3,5 mM pilicydu 1 i 2 (odpowiednio studzienki 3 i 7 oraz 4 i 8). Próbkę ze studzienki 1-4 przed naniesieniem na żel zostały poddane denaturacji termicznej przez 60 minut w 100°C, a próbki ze studzienek 5-8 inkubacji w temperaturze 25°C przez 60 minut. M – marker SDS-PAGE LMW Calibration Kit. Strzałką zaznaczono prążek odpowiadający monomerycznej formie białka DraE. B – analiza frakcji fimbrialnych za pomocą techniki Western Blot, mająca na celu potwierdzenie całkowitego rozpadu fimbrii Dr do monomerów DraE na skutek denaturacji termicznej. Studzienki 1, 2, 3 odpowiadają studzienkom 2, 1, 5 na panelu A. C – rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE białek zawartych we frakcjach fimbrialnych wyizolowanych z hodowli

szczepu BL21(DE3)/pBJN406 rosnącego na płytkach z podłożem TSA z dodatkiem pilicydu 1 (Pil1) i pilicydu 2 (Pil2) w różnych stężeniach (Piątek *et al.*, 2013).

6.6.5 Określenie potencjalnego spektrum działania pilicydów względem układów adhezyjnych typu FGL i FGS

Jak wspomniano w części wstępnej (Rozdział 2.2.5.4, Struktura i funkcja białek opiekuńczych systemu chaperone-usheer), porównanie białek opiekuńczych FGL i FGS, mimo ogólnego wysokiego stopnia zakonserwowania strukturalnego, pozwala wyróżnić różnice strukturalne zlokalizowane w funkcjonalnie istotnych rejonach przedstawicieli tych rodzin: dłuższy niż w białkach FGS motyw wiązania w pętli F1-G oraz dłuższy rejon wiązania przy N-terminalnym końcu u białek z rodziny FGL. Z tego względu zasadnym staje się pytanie, czy pilicydy mogą stanowić skuteczny środek na blokowanie działania obu, zróżnicowanych w funkcjonalnie kluczowych rejonach, grup białek opiekuńczych. Związki te zaprojektowane zostały oryginalnie jako inhibitory białek opiekuńczych FimC i PapD z rodziny FGS, a badania zawarte w niniejszej pracy dowodzą, że pilicydy 1 i 2 w sposób skuteczny blokują biogenezę fimbrii Dr, przebiegającą z udziałem białka DraB należącego do rodziny FGL. Można zatem przypuszczać, że pilicydy wykazują szerokie spektrum działania, obejmujące obie grupy białek opiekuńczych typu chaperone-usheer. W celu uwiarygodnienia tej tezy przeprowadziłam analizę sekwencyjną kluczowych dla oddziaływań pilicydu z kompleksem podjednostka-chaperone reszt w strukturze białek opiekuńczych – Leu32, Val56 oraz Ile93 (wyselekcjonowanych na podstawie białka wzorcowego PapD). Analiza ta, mająca na celu zdefiniowanie poziomu zakonserwowania reszt homologicznych do Leu32, Val56 i Ile93 obejmowała wyodrębnioną w bazie PFAM klasę N-terminalnych domen białek PapD-podobnych (PapD_N, PF00345), składającą się obecnie z 7954 sekwencji, z których 154 stanowią tzw. sekwencje reprezentatywne (ang. *seeds*). W wyniku analizy ustaliłam, że wybrane reszty są zakonserwowane w obrębie tej klasy na poziomie od 70 (reszty Leu32 i Val56) do 90% (Ile93) (Załącznik 1). Potwierdza to potencjalną możliwość oddziaływania pilicydów z szerokim spektrum białek opiekuńczych typu chaperone-usheer.

7 PODSUMOWANIE

Niniejsza praca doktorska jest częścią prowadzonych od wielu lat badań nad mechanizmem biogenezy fimbrii Dr uropatogennych szczepów *Escherichia coli* Dr+, odpowiedzialnych za przewlekłe infekcje układu moczowego. Fimbrie te należą do struktur adhezyjnych typu chaperone-usher. Rodzinę tych organelli można podzielić na grupy w zależności od cech strukturalnych białek opiekuńczych uczestniczących w ich biogenezie. Fimbrie Dr należą do grupy FGL, natomiast zdecydowanie lepiej poznana i opisana jest grupa FGS. Szczegółowym celem prowadzonych badań była próba określenia, w jakim stopniu podział struktur adhezyjnych na typy FGS i FGL, który opiera się na różnicy strukturalnej w postaci zmiennej długości pętli F-G białek opiekuńczyk przekłada się na konkretne różnice w mechanizmie biogenezy tych organelli. W pracy skupiono się na dwóch kluczowych etapach biogenezy struktur adhezyjnych – oddziaływanie białka opiekuńczego z podjednostką budulcową oraz oddziaływanie kompleksu podjednostka-białko opiekuńcze z białkiem kanałotwórczym. Pierwszy etap obejmował zweryfikowanie występowania opisanego dla struktur FGS mechanizmu kontroli zdatności podjednostek do tworzenia funkcjonalnej organelli na podstawie obecności w ich strukturze specyficznego zlokalizowanego mostka disiarczowego. Wyniki tej części badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- Podjednostki DraE pozbawione na skutek mutacji specyficznego zlokalizowanego mostka disiarczowego nie są odpowiednim substratem dla białka opiekuńczego DraB; DraB nie uzupełnia szczeliny akceptorowej zmodyfikowanego DraE, w związku z czym nie powstają stabilne oligomery podjednostek.
- Zakłócenie pierwszego etapu biogenezy struktury adhezyjnej poprzez usunięcie mostka disiarczowego i uniemożliwienie utworzenia kompleksu podjednostka-białko opiekuńcze skutkuje całkowitym zatrzymaniem produkcji dojrzałej fimbrii.
- System kontroli jakości podjednostek opierający się na obecności mostka disiarczowego w ich strukturze jest wspólny dla struktur z rodziny FGL i FGS.

W ramach pracy doktorskiej przebadalam również wpływ potencjału oksydacyjnego na fałdowanie podjednostek rodziny adhezyn Dr. Proces ten przebiega odmiennie w warunkach redukujących (cytoplazma) i utleniających (periplazma). Porównanie dostępnych struktur

białek DraE, AfaE-III i DaaE produkowanych w tak odmiennych środowiskach pozwoliło na określenie roli mostka disiarczkowego występującego w tych podjednostkach w determinowaniu drogi ich fałdowania, a także umożliwiło zbadanie zachowania nici donorowych umieszczonych na N- lub C-terminalnym końcu białka:

- Struktura białek produkowanych w cytoplazmie może być uzupełniana z równym powodzeniem przez nić donorową zlokalizowaną N- i C-terminalnie. Jeśli komplementacja następuje z wykorzystaniem nici N-końcowej tworzone są trimery stabilizowane za pomocą międzycząsteczkowych mostków disiarczkowych powstających po utworzeniu trimery. Wykorzystanie C-końcowej nici prowadzi do utworzenia monomeru z mostkiem zlokalizowanym wewnątrz cząsteczki.
- W przypadku, gdy dostępne są jednocześnie obie możliwości uzupełnienia struktury, przy produkcji w cytoplazmie preferowana jest droga fałdowania skutkująca utworzeniem cyklicznej struktury trimerycznej z komplementacją za pomocą nici N-terminalnej.
- Produkcja białka z dwoma dostępnymi nićmi donorowymi w obrębie przestrzeni periplazmatycznej skutkuje powstaniem monomeru stabilizowanego nicią C-końcową i wewnątrzcząsteczkowym mostkiem disiarczkowym.
- W obrębie periplazmy obecność oksydoreduktazy DsbA najprawdopodobniej wymusza szybkie tworzenie mostków disiarczkowych na początkowym etapie fałdowania białka, przez co niemożliwe staje się przegrupowanie nici A1 i komplementacja przez nić N-terminalną, obserwowane w przypadku podjednostek produkowanych w cytoplazmie. Takie działanie ułatwia fałdowanie poprzez blokadę możliwości prowadzącej do powstawania trimerów.

Ostatnią część pracy stanowiła analiza zakresu działania nowej generacji leków - pilicydów – skierowanych przeciwko uropatogennym szczepom *Escherichia coli*. Dotychczasowe badania koncentrowały się na potwierdzeniu działania antybakteryjnego jedynie w stosunku do szczepów *E. coli* wykazujących ekspresję organelli typu FGS. Przeprowadzone eksperymenty wykazały jednoznacznie, że:

- Pilicydy wykazują efektywne działanie hamujące adherencję bakterii szczepu *E. coli* Dr+, wykazującego ekspresję powierzchniową fimbrii Dr do komórek gospodarza.

- Wzrastające w obecności pilicydów komórki bakteryjne tego szczepu charakteryzują się znacznie zredukowaną ilością fimbrii na swojej powierzchni.
- Działanie pilicydów polega na ich ingerencji w kluczowy etap procesu fałdowania: utworzenie połączenia pomiędzy kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka a białkiem kanałotwórczym, umożliwiającym transport podjednostek fimbrialnych na powierzchnię komórki. Działanie to jest identyczne dla struktur adhezyjnych grupy FGS i FGL, co świadczy o niewrażliwości pilicydów na różnice strukturalne i funkcjonalne obserwowane dla dwóch klas białek opiekuńczych.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Aberg V, Hedenstrom M, Pinker JS, Hultgren SJ, Almqvist F, *C-Terminal properties are important for ring-fused 2-pyridones that interfere with the chaperone function in uropathogenic E. coli.* Org Biomol Chem, 2005, 3, 3886-3892.
2. Aberg V, Sellstedt M, Hedenstrom M, Pinker JS, Hultgren SJ, Almqvist F, *Design, synthesis and evaluation of peptidomimetics based on substituted bicyclic 2-pyridones—Targeting virulence of uropathogenic E. coli.* Bioorg Med Chem, 2006, 14, 7563-7581.
3. Aberg V, Fallman E, Axner O, Uhlin BE, Hultgren SJ, Almqvist F, *Pilicides regulate pili expression in E. coli without affecting the functional properties of the pilus rod.* Mol Biosyst, 2007, 3, 214-218.
4. Aberg V, Das P, Chorell E, Hedenstrom M, Pinker JS, Hultgren SJ, Almqvist F, *Carboxylic acid isosterases improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in E. coli.* Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18, 3536-3540.
5. Allen WJ, Phan G, Waksman G, *Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens.* Curr Opin Struct Biol, 2012, 22, 500-506.
6. Anderson KL, Billington J, Pettigrew D, Cota E, Simpson P, Roversi P, Chen HA, Urvil P, du Merle L, Barlow PN, Medof ME, Smith RA, Nowicki B, Le Bouguenec C, Lea SM, Matthews S, *An atomic resolution model for assembly architecture, and function of the Dr adhesins.* Mol Cell, 2004, 15, 647-657.
7. Bao R, Fordyce A, Chen YX, McVeigh A, Savarino SJ, Xia D, *Structure of CfaA Suggests a New Family of Chaperones Essential for Assembly of Class 5 Fimbriae.* PLOS Pathog, 2014, 10, 1-14.
8. Barnhart MM, Sauer FG, Pinker JS, Hultgren SJ, *Chaperone-Subunit-Usher Interactions Required for Donor Strand Exchange during Bacterial Pilus Assembly.* J Bacteriol, 2003, 185, 9, 2723-2730.
9. Berry AA, Yang Y, Pakharukova N, Garnett JA, Lee W, Cota E, Marchant J, Roy S, Tuittila M, Liu B, Inman KG, Ruiz-Perez F, Mandomando I, Nataro JP, Zavialov AV, Matthews S,

Structural Insight into Host Recognition by Aggregative Adherence Fimbriae of Enteroaggregative Escherichia coli. PLOS Pathog, 2014, 10, 9, 1-15.

10. Bien J, Sokolova O, Bozko P, *Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage.* Int J Nephrol, 2012, doi:10.1155/2012/681473.
11. Bodelon G, Palomino C, Fernandez LA, *Immunoglobulin domains in Escherichia coli and other enterobacteria: from pathogenesis to applications in antibody technologies.* FEMS Microbiol Rev, 2013, 37, 204-250.
12. Bouwman CW, Kohli M, Killoran A, Touchie GA, Kadner RJ, Martin NL, *Characterization of SrgA, a Salmonella enterica Serovar Typhimurium Virulence Plasmid-Encoded Paralogue of the Disulfide Oxidoreductase DsbA, Essential for Biogenesis of Plasmid-Encoded Fimbriae.* J Bacteriol, 2003, 185, 3, 991-1000.
13. Busch A, Waksman G, *Chaperone–usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism.* Philos T R Soc B, 2012, 367, 1112-1122.
14. Capitani G, Eidam O, Glockshuber R, Grutter MG, *Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from Escherichia coli.* Microbes Infect, 2006, 8, 2284-2290.
15. Carnoy Ch, Moseley SL, *Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of Escherichia coli adhesions.*, Mol Microbiol, 1997, 23, 365-379.
16. Chapman DAG, Zavialov AV, Chernovskaya TV, Karlyshev AV, Zav'yalova GA, Vasiliev AM, Dudich IV, Abramov VM, Zav'yalov VP, MacIntyre S, *Structural and Functional Significance of the FGL Sequence of the Periplasmic Chaperone Caf1M of Yersinia pestis.*J Bacteriol, 1999, 181, 8, 2422-2429.
17. Chorell E, Pinkner JS, Bengtsson Ch, Banchelin TSL, Edvinsson S, Linusson A, Hultgren SJ, Almqvist F, *Mapping pilicide anti-virulence effect in Escherichia coli, a comprehensive structure–activity study.* Bioorg Med Chem, 2012, 20,3128-3142.
18. Chorell E, Pinkner JS, Phan G, Edvinsson S, Buelens F, Remaut H, Waksman G, Hultgren SJ, Almqvist F, *Design and Synthesis of C-2 Substituted Thiazolo and Dihydrothiazolo Ring-Fused 2-Pyridones: Pilicides with Increased Antivirulence Activity.* J Med Chem, 2010, 53, 5690-5695.
19. Choudhury D, Thompson A, Stojanoff V, Langermann S, Pinker J, Hultgren SJ, Knight SD, *X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic Escherichia coli.*Science, 1999, 285, 1061-1066.
20. Cisowska A, *Polisacharydowa otoczka K1 pałeczek Escherichia coli i jej znaczenie w chorobotwórczości tych drobnoustrojów.* Post Microbiol, 2003, 42, 1, 3-22.
21. Cota E, Jones C, Simpson P, Altroff H, Anderson KL, du Merle L, Guignot J, Servin A, Le Bouguéne C, Mardon H, Matthews S, *The solution structure of the invasive tip complex from Afa/Dr fibrils.* Mol Microbiol, 2006, 62, 356-366.

22. Craig L, Volkman N, Arval AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EH, Talner JA, *Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions*. Mol Cell, 2006, 23, 651-662.
23. Crespo MD, Puorger Ch, Scharer MA, Eidam O, Grutter MG, Capitani G, Glockshuber R, *Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC*. Nat Chem Biol, 2012, 8, 707-713.
24. Croxen MA, Finlay BB, *Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity*. Nat Rev Micro, 2010, 8, 26-38.
25. Dehio Ch, *Infection-associated type IV secretion systems of Bartonella and their diverse roles in host cell interaction*. Cell Microbiol, 2008, 10, 8, 1591-1598.
26. Di Yu X, Fooks LJ, Moslehl-Mohebi E, Tischenko VM, Askarieh G, Knight SD, MacIntyre S, Zavialov AV, *Large Is Fast, Small Is Tight: Determinants of Speed and Affinity in Subunit Capture by a Periplasmic Chaperone*. J Mol Biol, 2012, 417, 294-308.
27. Emody L, Kerényi M, Nagy G, *Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli*. Int J Antimicrob Ag, 2003, 22, 29-33.
28. Fersht AR, Matouschek A, Serrano L, *The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding*. J Mol Biol, 1992, 224, 771-782
29. Ford B, Verger D, Dodson K, Volkan E, Kostakioti M, Elam J, Pinker J, Waksman G, Hultgren S, *The Structure of the PapD-PapGII Pilin Complex Reveals an Open and Flexible P5 Pocket*. J Bacteriol, 2012, 194, 23, 6390-6397.
30. Fronzes R, Remaut H, Waksman G, *Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria*. EMBO J, 2008, 27, 2271-2280.
31. Galkin VE, Kolappan S, Ng D, Zong Z, Li J, Yu X, Egelman EH, Craig L, *The Structure of the CS1 Pilus of Enterotoxigenic Escherichia coli Reveals Structural Polymorphism*. J Bacteriol, 2013, 195, 7, 1360-1370.
32. Garnett JA, Martinez-Santos VI, Saldana Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, Simpson PJ, Cota E, Puente JL, Giron JA, Matthews S, *Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the Escherichia coli common pilus*. PNAS, 2012, 109, 10, 3950-3955.
33. Gounon P, Jouve M, Le Bouguenec C, *Immunocytochemistry of the AfaE adhesion and AfaD invasion produced by pathogenic Escherichia coli strains during interaction of the bacteria with HeLa cells by high resolution scanning electron microscopy*. Microbes Infect, 2000, 2, 359-365.
34. Goyal P, Krasteva PV, Van Gerven N, Gubellini F, Van den Broeck I, Troupiotis-Tsailaki A, Jonckheere W, Pehau-Arnaudet G, Pinkner J, Chapman M, Hultgren S, Howorka S, Fronzes R, Remaut H, *Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG*. Nature, 2014, 516, 250-253.
35. Hadenstrom M, Emtenas H, Pemberton N, Aberg V, Hultgren SJ, Pinker JS, Tegman V, Almqvist F, Sethson I, Kihlberg J, *NMR studies of interactions between periplasmic chaperones*

from uropathogenic *E. coli* and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly. *Org Biomol Chem*, 2005, 3, 4193-4200.

36. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Haner M, Taschner N, Burkhard P, Aebi U, Muller SA, *Exploring the 3D Molecular Architecture of Escherichia coli Type 1 Pili*. *J Mol Biol* 2002, 323, 845-857.
37. Halaby DM, Poupon A, Mornon J, *The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons*. *Protein Eng*, 1999, 12, 7, 563-571.
38. Hamill SJ, Steward A, Clarke J, *The Folding of an Immunoglobulin-like Greek Key Protein is Defined by a Common-core Nucleus and Regions Constrained by Topology*. *J Mol Biol*, 2000, 297, 165-178.
39. Han Z, Pinker JS, Ford B, Obermann R, Nolan W, Wildman SA, Hobbs D, Ellenberger T, Cusumano CK, Hultgren SJ, Janetka JW, *Structure-Based Drug Design and Optimization of Mannoside Bacterial FimH Antagonists*. *J Med Chem*, 2010, 53, 12, 4779-4792.
40. Hermanns U, Sebbel P, Egli V, Glockshuber R, *Characterization of FimC, a Periplasmic Assembly Factor for Biogenesis of Type 1 Pili in Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2000, 39, 11564-11570.
41. Hiniker A, Bardwell J, *In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases*. *J Biol Chem*, 2004, 279, 12967-12973.
42. Hung DL, Knight SD, Woods RM, Pinker JS, Hultgren SJ, *Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones*. *EMBO J*, 1996, 15, 15, 3792-3805.
43. Hung DL, Pinker JS, Knight SD, Hultgren SJ, *Structural basis of chaperone self-capping in P pilus biogenesis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 8178-8183.
44. Jacob-Dubuisson F, Pinker J, Xu Z, Striker R, Padmanabhan A, Hultgren SJ, *PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 11552-11556.
45. 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*, 2006, 62, 157-164.
46. Jouve M, Garcia MI, Courcoux P, Labigne A, Goucon 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, 56, 4082-4089.
47. Klemm P, Schembri MA, *Bacterial adhesins: function and structure*. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290, 27-35.
48. Knight SD, Choudhury D, Hultgren S, Pinker J, Stojanoff V, Thompson A, *Structure of the S pilus periplasmic chaperone SfaE at 2.2 Å resolution*. *Acta Crystallogr D*, 2002, 58, 1016-1022.
49. Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WGJ, *The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism*. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 10, 336-351.

50. Korotkova N, Le Trong I, Samudrala R, Korotkov K, Van Loy CP, Bui AL, Moseley SL, Stenkamp RE, *Crystal Structure and Mutational Analysis of the DaaE Adhesin of Escherichia coli*. J Biol Chem, 2006, 281, 31, 22367-22377.
51. Kur M, Piątek R, Kur J, *A two plasmid Escherichia coli system for expression of Dr adhesins*, Protein Expres and Purif, 2007, 55, 361-367.
52. Kurganov BI, Lyubarev AE, Sanchez-Ruiz JM, Shnyrov VI, *Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation*. Biophys Chem, 1997, 69, 125-135.
53. Lara-Tejero M, Galan JE, *Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1-Encoded Type III Secretion System Translocases Mediate Intimate Attachment to Nonphagocytic Cells*. Infect Immun, 2009, 77, 2635-2642.
54. Lawrence MC, Colman PM, *Shape complementarity at protein/protein interfaces*. J Mol Biol, 1993, 234, 946-950.
55. Le Bouguenec Ch, Servin AL, *Diffusely adherent Escherichia coli strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens*. FEMS Microbiol Lett, 2006, 256, 2, 185-194.
56. Le Trong I, Aprikian P, Kidd BA, Thomas WE, Sokurenko EV, Stenkamp RE, *Donor strand exchange and conformational changes during E. coli fimbrial formation*. J Struct Biol, 2010, 172, 380-388.
57. Li YF, Poole S, Nishio K, Jang K, Rasulova F, McVeigh A, Savarino SJ, Xia D, Bullitt E, *Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic Escherichia coli*. PNAS 2009, 106, 26, 10793-10798.
58. Lillington J, Geibel S, Waksman G, *Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili*. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840, 9, 2783-2793.
59. Lublin DM, Coyne KE, *Phospholipid-anchored and transmembrane version of either decay-accelerating factor or membrane cofactor protein show equal efficiency in protection from complement-mediated cell damage*. J Exp Med, 1991, 174, 35.
60. Manning M, Colon W, *Structural basis of protein kinetic stability: Resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role of rigidity and a bias toward β -sheet structure*. Biochemistry, 2004, 43, 11248-11254.
61. Melican K, Sandoval RM, Keder A, Josefsson L, Tanner GA, Molitoris BA, Richter-Dahlfors A, *Uropathogenic Escherichia coli P and Type 1 Fimbriae Act in Synergy in a Living Host to Facilitate Renal Colonization Leading to Nephron Obstruction*. PLOS Pathog, 2011, 7, 2, 1-12.
62. Mortezaei N, Epler CR, Shao PP, Shirdel M, Singh B, McVeigh A, Uhlin BE, Savarino SJ, Andersson M, Bullitt E, *Structure and function of enterotoxigenic Escherichia coli fimbriae from differing assembly pathways*. Mol Microbiol, 2015, 95, 1, 116-126.
63. Mu XQ, Bullitt E, *Structure and assembly of P-pili: A protruding hinge region used for assembly of a bacterial adhesion filament*. PNAS, 2006, 103, 26, 9861-9866.

64. Mulvey MA, *Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli*. Cell Microbiol, 2002, 4, 5, 257-271.
65. Nenninger AA, Robinson LS, Hultgren SJ, *Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF*. PNAS, 2009, 106, 3, 900-905.
66. Nishiyama M, Horst R, Eidam OT, Herrmann T, Ignatov O, Vetsh M, Bettendorff P, Jelesarov I, Grutter MG, Wuthrich K, Glockshuber R, Capitani G, *Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD*. EMBO J, 24, 12, 2075-2086.
67. Nowicki B, Barrish JP, Korhonen T, Hull RA, Hull SI, *Molecular Cloning of the Escherichia coli O75X Adhesin*. Infect Immun, 1987, 55, 12, 3168-3173.
68. 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.
69. Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S, *Family of Escherichia coli Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor Recognition and Invasiveness*. J Infect Dis, 2001, 183, 1, S24-27.
70. Nuccio SP, Baumler AJ, *Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek*. Microbiol Mol Biol R, 2007, 71, 551-575.
71. Pettigrew D, Andreson KL, Billington J, Cota E, Simpson P, Urvil P, Rabuzin F, Roversi P, Nowicki B, du Merle L, le Bouguenec Ch, Matthews S, Lea SM, *High Resolution Studies of the Afa/Dr Adhesin DraE and Its Interaction with Chloramphenicol*. J Biol Chem, 2004, 279, 45, 46851-46857.
72. Pham T, Goluszko P, Popov V, Nowicki S, Nowicki BJ, *Molecular cloning and characterisation 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.
73. Phan G, Remaut H, Wang T, Allen WJ, Pirker KF, Lebedev A, Henderson NS, Geibel S, Volkan E, Yan J, Kunze MBA, Pinker JS, Gord B, Kay ChWM, Li H, Hultgren S, Thanassi DG, Waksman G, *Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC:FimH substrate*. Nature, 2011, 474, 49-53.
74. Piątek R, Zalewska B, Kolaj O, Ferens M, Nowicki B, Kur J, *Molecular Aspects of Escherichia coli Dr Fimbriae: Characterisation of DraB-DraE Complexes*. Infect Immun, 2005, 73, 135-145.
75. Piątek R, Bruździak P, Wojciechowski M, Zalewska-Piatek B, Kur J. *The noncanonical disulfide bond as the important stabilizing element of the immunoglobulin fold of the Dr fimbrial DraE subunit*. Biochemistry, 2010, 49, 7, 1460-1468.
76. Piątek R, Bruździak P, Zalewska-Piątek B, Kur J, Stangret J, *Preclusion of irreversible destruction of Dr adhesin structures by a high activation barrier for the unfolding stage of the fimbrial DraE subunit*. Biochemistry, 2009 48, 49, 11807-11816.
77. 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, 1, 135-145.

78. 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, 3, 639-646.
79. Piątek RJ, Bruździak P, Zalewska-Piątek BM, Wojciechowski MA, Namieśnik JM, Kur JW, *Analysis of the unique structural and physicochemical properties of the DraD/AfaD invasin in the context of its belonging to the family of chaperone/usher type fimbrial subunits.* BMC Struct Biol, 2011, 11, 25.
80. Piątek R, Zalewska-Piątek B, Dzierzbicka K, Makowiec S, Pilipczuk J, Szemiako K, Cyranka-Czaja A, Wojciechowski M, *Pilicides inhibit the FGL chaperone/usher assisted biogenesis of the Dr fimbrial polyadhesin from uropathogenic Escherichia coli.* BMC Microbiology, 2013, 13, 131.
81. Pichon C, du Merle L, Caliot E, Trieu-Cuot P, LeBouguenec C, *An in silico model for identification of small RNAs in whole bacterial genomes: Characterization of antisense RNAs in pathogenic Escherichia coli and Streptococcus agalactiae strains.* Nucleic Acids Res, 2012, 40, 284–6286.
82. Pichon C, du Merle L, Lequeutre I, Le Bouguenec C, *The AfaR small RNA controls expression of the AfaD-VIII invasin in pathogenic Escherichia coli strains.* Nucleic Acids Res, 2013, 41, 10, 5469-5482.
83. Pinker JS, Remaut H, Buelens F, Miller E, Aberg V, Pemberton N, Hedenstrom M, Larsson A, Seed P, Waksman G, Hultgren SJ, Almqvist F, *Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria.* PNAS, 2006, 103, 47, 17897-17902.
84. Pizarro-Cerda J, Cossart P, *Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells.* Cell, 2006, 124, 715-727.
85. Privalov PL, *Thermodynamic problems in structural molecular biology.* Pure Appl Chem, 2007, 79, 1445-1462.
86. Proft T, Baker EN, *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease.* Cell Mol Life Sci, 2009, 66, 613-635.
87. Puorger Ch, Eidam O, Capitani G, Erilov D, Gruetter MG, Glockshuber R, *Infinite kinetic stability against dissociation of supramolecular protein complexes through donor strand complementation.* Structure, 2008, 16, 4, 631-642.
88. Puorger Ch, Vetsch, M, Wider G, Glockshuber R, *Structure, Folding and Stability of FimA, the Main Structural Subunit of Type 1 Pili from Uropathogenic Escherichia coli Strains.* J Mol Biol, 2011, 412, 520-535.
89. Remaut H, Rose RJ, Hannan TJ, Hultgren SJ, Radford SE, Ashcroft AE, Waksman G, *Donor-Strand Exchange in Chaperone-Assisted Pilus Assembly Proceeds through a Concerted β -Strand Displacement Mechanism.* Mol Cell, 2006, 22, 831-842.
90. Remaut H, Tang Ch, Henderson NS, Pinker JS, Wang T, Hultgren SJ, Thanassi DG, Waksman G, Li H, *Fiber Formation across the Bacterial Outer Membrane by the Chaperone/Usher Pathway.* Cell, 2008, 133, 640-652.

91. Rengel DE, Marin-Medina N, Castro JE, Gonzalez-Mancera A, Forero-Shelton M, *Observation of Bacterial Type I Pili Extension and Contraction under Fluid Flow*. PLOS One, 2013, 8, 6, 1-11.
92. Rose RJ, Welsh TS, Waksman G, Ashcroft AE, Radford SE, Paci E, *Donor-Strand Exchange in Chaperone-Assisted Pilus Assembly Revealed in Atomic Detail by Molecular Dynamics*. J Mol Biol, 2008, 375, 908-919.
93. Rother K, Preissner R, Goede A, Froemmel C, *Inhomogeneous molecular density: reference packing densities and distribution of cavities within proteins*. Bioinformatics, 2003, 19, 2112-2121.
94. Ruer S, Pinotsis N, Steadman D, Waksman G, Remaut H, *Virulence-targeted antibacterials: concept, promise, and susceptibility to resistance mechanisms*. Chem Biol Drug Des, 2015, doi: 10.1111/cbdd.12517
95. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
96. Sanchez-Ruiz JM, *Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry*. Biophys J, 1992, 61, 921-935.
97. Sauer FG, Futterer K, Pinkner JS, Dodson KW, Hultgren SJ, Waksman G, *Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis*. Science, 1999, 285, 1058-1061.
98. Sauer FG, Pinkner JS, Waksman G, Hultgren SJ, *Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation*. Cell, 2002, 111, 543-551.
99. Sauer FG, Remaut H, Hultgren SJ, Waksman G, *Fiber assembly by the chaperone-usher pathway*. Biochim Biophys Acta, 2004, 1694, 259-267.
100. Servin AL, *Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 2005, 18, 2, 264-292.
101. Shippy DC, Eakley NM, Mikhell DM, Fadl AA, *Role of StdA in adhesion of Salmonella enterica serovar Enteritidis phage type 8 to host intestinal epithelial cells*. Gut Pathogens, 2013, 5, 43, 1-7.
102. Soto GE, Dodson KW, Ogg D, Liu C, Heuser J, Knight S, Kihlberg J, Jones CH, Hultgren SJ, *Periplasmic chaperone recognition motif of subunits mediates quaternary interactions in the pilus*. EMBO J, 1998, 17, 21, 6155-6167.
103. Soto GE, Hultgren SJ, *Bacterial adhesions: common themes and variations in architecture and assembly*. J Bacteriol, 1999, 181, 1059-1071.
104. Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW, *Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis*. Anal Biochem, 2000, 287, 243-251.
105. Sreerama N, Woody RW, *Structural composition of β I- and β II-proteins*. Protein Sci, 2002, 12, 384-388.

106. Srisailam S, Krishnaswamy SKrT, Rajalingam D, Muthusamy Kathir K, Sheu H, Jan F, Chao P, Yu Ch, *Amyloid-like Fibril Formation in an All β -Barrel Protein. Partially structured intermediate state(s) is a precursor for fibril formation.* J Biol Chem, 2009, 278, 20, 17701-17709.
107. Svensson A, Larsson A, Emtenas H, Hedenstrom M, Fex T, Hultgren SJ, Pinker JS, Almqvist F, Kihlberg J, *Design and Evaluation of Pilicides: Potential Novel Antibacterial Agents Directed Against Uropathogenic Escherichia coli.* Chembiochem, 2001, 12, 915-918.
108. Swanson TN, Bilge SS, Nowicki B, Moseley SL, *Molecular Structure of the Dr Adhesin: Nucleotide Sequence and Mapping of Receptor-Binding Domain by Use of Fusion Constructs.* Infect Immun, 1991, 59, 1, 261-268.
109. Thanassi DG, Hultgren SJ, *Assembly of Complex Organelles: Pilus Biogenesis in Gram-Negative Bacteria as a Model System.* Methods, 2000, 20, 111-126.
110. Van Loy CP, Sokurenko EV, Mosler SL, *The Major Structural Subunits of Dr and F1845 Fimbriae Are Adhesins,* Infect Immun, 2002, vol. 70, no 41, 1694-1702.
111. Van Molle I, Moonens K, Garcia-Pino A, Buts L, De Karpel M, Wyns L, Bouckaert J, De Greve H, *Structural and Thermodynamic Characterization of Pre- and Postpolymerization States in the F4 Fimbrial Subunit FaeG.* J Mol Biol, 2009, 394, 957-967.
112. Vayssier-Taussat M, Le Rhun D, Deng HK, Biville F, Cescau S, Danchin A, Marignac G, Lenaour E, Boulouis HJ, Mavris M, Arnaud L, Yang H, Wang J, Quebatte M, Engel P, Saenz H, Dehio Ch, *The Trw Type IV Secretion System of Bartonella Mediates Host-Specific Adhesion to Erythrocytes.* PLOS Pathog, 2010, 6, 6, 1-10.
113. Verger D, Bullitt E, Hultgren SJ, Waksman G, *Crystal Structure of the P Pilus Rod Subunit PapA.* PLOS Pathog, 2007, 3, 5, 674-682.
114. Vetsch M, Sebbel P, Glockshuber R, *Chaperone-independent Folding of Type 1 Pilus Domains.* J Mol Biol, 2002, 322, 827-840.
115. Vitagliano L, Ruggiero A, Pedone C, Berisio R, *Conformational states and association mechanism of Yersinia pestis CafI subunits.* Biochem Biophys Res C, 2008, 372, 804-810.
116. Waksman G, Hultgren SJ, *Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis.* Nat Rev Microbiol, 2009, 7, 765-774.
117. Walczak MJ, Puorger Ch, Glockshuber R, Wider G, *Intramolecular Donor Strand Complementation in the E. coli Type 1 Pilus Subunit FimA Explains the Existence of FimA Monomers As Off-Pathway Products of Pilus Assembly That Inhibit Host Cell Apoptosis.* J Mol Biol, 2013, 426, 542-549.
118. Weisser NE, Hall JC, *Applications of single-chain variable fragments antibodies in therapeutics and diagnostics.* Biotechnol Adv, 2009, 27, 502-520.
119. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA, *Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli.* Exp Mol Pathog, 2008, 85, 11-19.

120. Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA, *Chaperone-Usher Fimbriae of Escherichia coli*. PLOS One, 2013, 8, 1, 1-11.
121. 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 adhesion*. Microbiology, 2005, 151, 2477 - 2486.
122. Zalewska-Piatek B, Bury K, Piątek R, Bruzdziak P, Kur J, *Type II secretory pathway for surface secretion of DraD invasin from the uropathogenic Escherichia coli Dr+ strain*. J Bacteriol, 2008, 190, 5044-5056.
123. Zalewska-Piątek B, Kur M, Wilkanowicz S, Piątek R, Kur J, *The DraC usher In Dr fimbriae biogenesis of uropathogenic E. coli Dr⁺ strains*. Arch Microbiol, 2010, 192, 5, 351-363.
124. Zav'yalov V, *Polyadhesins: An Armory Of Gram-Negative Pathogens For Penetration Through The Immune Shield*. Biotechnologia Acta, 2013, 6, 4, 144-161.
125. Zavialov A, Zav'yalova G, Korpela T, Zav'yalov V, *FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens*. FEMS Microbiol Rev, 2007, 31, 478-514.
126. Zavialov AV, Batchikova NV, Korpela T, Petrovskaya LE, Korobko VG, Kersley J, MacIntyre S, Zav'yalov VP, *Secretion of Recombinant Proteins via the Chaperone/Usher Pathway in Escherichia coli*. Appl Environ Microb, 2001, 67, 4, 1805-1814.
127. Zavialov AV, Berglund J, Pudney AF, Fooks LJ, Ibrahim TM, MacIntyre S, Knight SD, *Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from Yersinia pestis: preserved folding energy drives fiber formation*. Cell, 2003, 113, 587-596.
128. Zavialov AV, Knight SD, *A novel self-capping mechanism controls aggregation of periplasmic chaperone CafIM*. Mol Microb, 2007, 64, 1, 153-164.
129. Zavialov AV, Tischenko VM, Fooks LJ, Brandsdal BO, Aqvist J, Zav'yalov VP, Macintyre S, Knight SD, *Resolving the energy paradox of chaperone/usher-mediated fibre assembly*. Biochem J, 2005, 389, 685-694.
130. Zav'yalov VP, Zav'yalova GA, Denesyuk AI, Korpela T, *Modelling of steric structure of a periplasmic molecular chaperone CafIM of Yersinia pestis, a prototype member of a subfamily with characteristic structural and functional features*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995, 11, 1, 19-24.
131. Zav'yalov V, Zavialov A, Zav'yalova G, Korpela T, *Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint*. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34, 317-378.

9 OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ang.	z angielskiego
ATP	adenozynotrifosforan
BSA	albumina osocza krwi (ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CHO	komórki jajnika chomika chińskiego (ang. <i>Chinese hamster ovary</i>)
CNF1	cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący 1 (ang. <i>cytotoxic necrotising factor 1</i>)
CU	szlak chaperone-usher
DAB	3,3'-diaminobenzzydina
DAEC	dyfuzyjno adhezyjne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>diffusely adhesive Escherichia coli</i>)
DAF	czynnik przyspieszający rozpad konwertaz układu dopełniacza (ang. <i>decay-accelerating factor</i>)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DSC	reakcja komplementacji nici donorowych (ang. <i>donor strand complementation</i>)
DSE	reakcja wymiany nici donorowych (ang. <i>donor strand exchange</i>)
EAEC	enteroagregacyjne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enteroaggregative Escherichia coli</i>)
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
EHEC	enterokrwotoczne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enterohaemorrhagic Escherichia coli</i>)
EIEC	enteroinwazyjne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enteroinvasive Escherichia coli</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPEC	enteropatogenne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enteropathogenic Escherichia coli</i>)
ETEC	enterotoksyczne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>enterotoxigenic Escherichia coli</i>)
ExPEC	pozajelitowe szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>extraintestinal Escherichia coli</i>)
FBS	plodowa surowica bydłęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)

FGA	białka opiekuńcze o charakterze pośrednim (ang. <i>F1-G1 alternate</i>)
FGL	białka opiekuńcze o długiej pętli F1-G1 (ang. <i>F1-G1 long</i>)
FGS	białka opiekuńcze o krótkiej pętli F1-G1 (ang. <i>F1-G1 shortsp</i>)
GSP	mechanizm ogólnej sekrecji (ang. <i>General Secretion Pathway</i>)
Ig	immunoglobulina
IPTG	izopropylo-β-D tiogalaktozyd
kDa	kilodalton
LPS	lipopolisacharyd
M	stężenie molowe [mol/dm ³]
PBS	ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pz	par zasad
RNA	kwasy rybonukleinowe
-sc	podjednostka samokomplementująca (ang. <i>self-complemented</i>)
SDS	sól sodowa siarczanu dodecyłu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z użyciem SDS (ang. <i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
T3SS	system sekrecji typu 3 (ang. <i>Type 3 Secretion System</i>)
T4CP	białka sprzężenia systemu sekrecji typu IV (ang. <i>type IV secretion coupling protein</i>)
T4SS	system sekrecji typu 4 (ang. <i>Type 4 Secretion System</i>)
TLR4	nerkowy receptor LPS (ang. <i>Toll-like Receptor 4</i>)
Tris	tris[hydroksymetylo]aminometan
UPEC	uropatogenne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. <i>Uropatogenic Escherichia coli</i>)
UTI	infekcje dróg moczowych (ang. <i>Urinary Tract Infections</i>)

10 DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

- Piątek R., Bruździak P., Zalewska-Piątek B., Wojciechowski M., Namieśnik J., Kur J. *Analysis of the unique structural and physicochemical properties of the DraD/AfaDinvasin in the context of its belonging to the family of chaperone/usher type fimbrial subunits.* – BMC Structural Biology, 2011,11:25.
- Piątek R., Zalewska-Piątek B., Dzierzbicka K., Makowiec S., Pilipczuk J., Szemiako K., Cyranka-Czaja A., Wojciechowski M. *Pilicides inhibit the FGL chaperone/usher assisted biogenesis of the Dr fimbrial polyadhesin from uropathogenic Escherichia coli.* BMC Microbiology – BMC Microbiology, 2013, 13, 131.

Doniesienia posterowe:

- Piątek Rafał, Zalewska-Piątek Beata, Bruździak Piotr, Wojciechowski Marek, Kur Józef, Pilipczuk Justyna; *The bacterial DraEadhesin - the example of immunoglobuline-like protein with infinite stability resulting from the specific localization of disulfide bond* - Multi-pole Approach to Structural Biology Conference, Warsaw, Poland, 16-19.11.2011.
- Zalewska-Piątek Beata, Dzierzbicka Krystyna, Makowiec Sławomir, Pilipczuk Justyna, Cyranka-Czaja Anna, Wojciechowski Marek, Piątek Rafał; *Pilicydy – cyklo-2-pirydony – jako skuteczny inhibitor biogenezy modelowego przykładu struktury adhezyjnej typu FGL: fimbrii Dr uropatogennych szczepów E. coli* - XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów "Drobnoustroje bez granic", Lublin, 5-8.09.2012.
- Zalewska-Piątek Beata, Piątek Rafał, Wilkanowicz Sabina, Pilipczuk Justyna, Bruździak Piotr, Kur Józef; *Analiza właściwości biochemicznych biofilmu formowanego przez uropatogenne szczepy Escherichia coli Dr+* - XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów "Drobnoustroje bez granic", Lublin, 5-8.09.2012.

- Pilipczuk Justyna, Zalewska-Piątek Beata, Dzierzbicka Krystyna, Makowiec Sławomir, Piątek Rafał, Cyranka-Czaja Anna; *Pilicides effectively hinder chaperoneusher interactions in all Gram-negative bacteria* - 47th Congress of the Polish Biochemical Society, Polish-German Biochemical Society Joint Meeting, Poznań, Poland, September 11th-14th 2012.
- Pilipczuk Justyna, Piątek Rafał, Zalewska-Piątek Beata; *Stabilność natywnej formy białka DraD uropatogennych szczepów E. coli* – III Międzyuczelniane Sympozjum Biotechnologiczne „Symbioza” im. Prof. Krzysztofa W. Szewczyka, Warszawa, 16-18.05.2014.
- Zalewska Piątek Beata, Piątek Rafał, Pilipczuk Justyna, Śpibida Marta, Olszewski Marcin; *Białko DraD jako czynnik urowirulentny zlokalizowany na powierzchni komórek bakteryjnych szczepów Escherichia coli Dr+* - I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz, 18-20.09.2014.
- Śpibida Marta, Szemiako Kasjan, Krawczyk Beata, Olszewski Marcin, Pilipczuk Justyna; *Fuzja polimerazy DNA Taq z białkiem wiążącym DNA o zwiększonej użyteczności w diagnostyce molekularnej* - I Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”, Bydgoszcz, 18-20.09.2014.

Stáže zagraniczne:

- Trzymiesięczny pobyt w ramach projektu InterPhD w Laboratory of Microbiology, Parasitology and Hygiene, University of Antwerp, Belgia – realizacja projektu “*Dissecting the role of viral protein glycosylation for respiratory syncytial virus (RSV) replication and pathogenesis using a novel RSV reverse genetics system.*”

ZAŁĄCZNIK NR 1. - Analiza stopnia zakonserwowania kluczowych dla oddziaływań pilicydu z kompleksem chaperone-podjednostka reszt homologicznych dla Leu32, Val56 i Ile93 białka PapD w obrębie N-terminalnych domen klasy białek PapD-podobnych (Pfam:PF00345) wykonana przy pomocy programu Jalview z użyciem algorytmu bazy Pfam. Analizowane reszty zaznaczono kolorem niebieskim. Białka oznaczone zostały zgodnie z systemem EMBL-EBI.

A0A507_EDWIC NFSIGQSGVVVSA --TTG-EAHI AVK-NLGSQELIFASES ---EDETKAIAGRSLFML
A0KFM9_AERHH AIVLDRTRVVYPG --GAK-SISLNIK-NENQKLPYLAQSWI --ED---AQQQK-IASP----FAV
A1A716_ECOK1 DIVISGTRVVYKS --EQK-SVNVRLK-NKGN-NPLLVSQSWL ---GDDNA-EPG-SITV-P---FTA
A1JTK4_YERE8 GLVASSTRMIYQP --ESR-ERTMLA-NTND-YPVWVQTWW ---DN---GDV DSTP---DQAEAP---FMV
A1RPW4_SHESW GVVADRSRIFAA --SDR-EQGLSLV-NTND-YPVWVQTWW ---DD---GDPD SGP---ETANAP---ILP
A1V426_BURMS AIVPDRTRVILNE --GEQ-AAIVTLS-NKSDAYPVLVQS WL ---ED---ERGNR-ITTP---LMV
A2I2U0_SALTM GLRLGTRRVIYKE --DAP-STSFWIM-NEKE-YPILVQTQV ---YND DKSSKAP---FIV
A3L5P1_PSEAI GITLGGTRVV LQA --PAK-EAAILVR-NQAS-KDVMIQSWW ---EA---DNGA---DKREV-P---FVI
A3LFH6_PSEAI GLIAQGTRVVVFP --SER-EVTLRVS-NTSG-TPVLQAQAWI ---DD---GRQDV-PPE-ELQV-P---FSV
A3NFN6_BURP6 AIVITGTRVVVPE --SSR-EVNVR LN-NVEQ-SPVLVQAWI ---DD---GNAGA-SPD-EIKV-P---FVL
A3NV13_BURP0 GIOVGGTRVVFDKVDVR-DASVAVR-NKGE-TPYMIQIFV ---DD---GNG---NTRRMP---FAV
A4W7S1_ENT38 SVILGVKRVYRQ --SQK-HTSTDLI-NKQG ---VKSSG ---VKSSG---FFI
A4WBN8_ENT38 GIOGRTRIVYEA --GKK-EISLPLV-NKDSILPWL VQS WT ---DT---GDG---KTRG-P---FIV
A4Y251_SHEPC GV IADNTRIIYNI --DKK-EQSFQVV-NIND-YPVLVQLWV ---DD---GGVDS S PE---KASNSP---VIP
A5W6W1_PSEP1 QLKVEGTRLIYPG --SNK-EASISVV-NRSD-LDTVMQSWV ---SST---DK---RDDA-P---FAI
A5WGG7_PSYWF DVVIHGTRVYPS --DAR-EITVKVT-NEGT-SPALVQAWI ---DE---GDAKI-TPD-QSKS-P---FVI
A5XNC2_BURML TLQISPVTVEMAA --DNP-AAGV TLS-NPGA-RPVYGGVVRT ---FR---WTQE-QGDDM-LAPAPE---LVA
A6AJW3_VIBHA AVDIDRTRIVMDE --GDT-EAGFMLA-NTGK-NNVLLQMWV ---DT---GDL SVSP---AEVETP---LFV
A6AJW6_VIBHA NIVMTGSRIIYPE --GEP-FVNVYLK-NKSK-NVFMVQSWF ---EN---EDG I KAT-QNEV-P---FIV
A6AMM6_VIBHA ALALDRTRVVYEG --DSK-VETVRK-NPAD-IPFLAQS WL ---TD---MDGKD-V---EDK---FIV
A6BWZ4_YERPE SVIAERTRIVFSE --GST-EESLQLV-NSNS-YPVAVQVWV ---DD---GNLMATP---DKAVSP---ILV
A6D0K0_9VIBR AIAIPGARVVYIE --GSK-YFQGEIV-NNSE-SATLVQLSI ---LD---DNFDEEKL P---II
A6T558_KLEP7 TVSVGGTRLVFHG --DEK-EASITVS-NTDKGIPVL IQSWV ---DE---GENS---KAKA-P---FMI
A6T5S1_KLEP7 SMVIDGTRIFSG --DKK-EIAVRAT-NMGE-TPSLTQVWV ---DD---GRVQN-QPE-KDAA-P---FIV
A6T932_KLEP7 GVAIAGTRVIYNE --QSH-EADITVK-NTNPHDPVLIQS WV ---DD---LAD-NNKS-P---FIV
A6TCS0_KLEP7 AITIDASRVYSG --KDK-SASL KIN-NRSS-KNYIVQ TWL ---DTG---PETP---SSGL-P---IVA
A6TCS4_KLEP7 GIOVGGTRVIYQE --GKR-EAAISVT-NADHTPVLVQS WV ---ENY---AEND---KARV-P---FIV
A6TDK5_KLEP7 NIVNGTRFVIYPG --NEK-EITVQLS-NNAD-RPALAQA WL ---DN---GDADA-TPD-TITT-P---FII
A6TDX7_KLEP7 GIKLQSTRVIYPG --ESHNGITFTVT-NNTA-KPFLVQS RV ---IPW---QADEQDNVSGNQSGVP---FIV
A6TDX8_KLEP7 GLQLSQRVIFDA --RAK-DTQATIK-NNSG-QVYLIKADVFATPDGRN --- ---TQTDPKSAVP---FMV
A6TDY1_KLEP7 GISIDSSRI FQSSDDAR-GRSVGTSSVSVAPYL VRAQV ---SR---DIEGNNVQTP---FIT
A6TGZ3_KLEP7 SVVVGTRLVFDG --TKN-NAVITVE-NKDK-NSNIVQS WL ---SVV---DAAS---PAKD-A---FII
A6TH61_KLEP7 GIOVVGSTRVLYKE --GAR-EITAQIE-NKDD-IPYL I KSWV ---EA---PAGKAP---SFMA
A7FIQ9_YERP3 SVVMTGTRIIYPE --GSR-EKVLQLS-NKDD-HPNLVQLWM ---DD---GNNQS-SPS-KSDV-P---FAL
A7FNA7_YERP3 SFKLESTTVILQE --SEA-RTSFTID-NISS-NPILVTKL ---TD---LDG-KSFSKQ---LI
A7ME56_CROS8 GIOVVGTRVIYEG --NKK-EAALGVK-NNSTESFLLQSWV ---DN---GNG---KTRG-P---FMV
A7MPA3_CROS8 GVIIEGTRVIYQP --GQK-QHSLTVR-NQSK-ERWL IESWV ---DS---DAV TG-TTD-SASTPP---FEV
A7MQC6_CROS8 ALTL SADR LVYSE --KDG-DASITIH-SNED-RAYLVQSWL ---DA---GDSTV---KKDL-P---FVV
A7ZGQ2_ECO24 EAILGATRVYHL --DGN-GESL RVK-NPQD-YPIL IQSKV ---MD---EGS-KDNA-D---FIV
A7ZXX8_ECOHS ALQPDTRIVFN A --NDK-ATSLRVD-NRSDKLPYLAYS WL ---EN---EKGEK-SDDL---LVA

10 20 30 40 50 60 70 80
 A8AFU5_CITK8 GVSIGGTRVYDGGKKEASLSVSNPDNIPYL IQSWI ET QNDG QGKAP
 A8AIY3_CITK8 GVINGLRVLVYQGDKKESSLGLSNPDS TDYL VQSWV DS GSKN PGNT P
 A8AL42_CITK8 GMVPDTSLLINEEEGGSMVKNTDA DAQL LYTKI VN LPD DPQPG L IV
 A8ALX4_CITK8 GMVPASTLLVIEESHNGGTVNKNDSTFVPM L YTTI ED VKD DSGIT VNV
 A8AP82_CITK8 SITMTGTRIIYNGSAN SVDVHLKNSDKFPYV VSTWF DN GNMADGPEKSAQLP FIA
 A8AP85_CITK8 MVNTEVTRVIFNAGESHYSALANSAQHPALVQIWT DE GDPLSQP AETITP IVA
 A8APK7_CITK8 GIVLNQTRIIYPLNQKQSNITVRNTSELERMIQSWV ED ASGG KNRD FIL
 A8APL4_CITK8 GVEIGGTRLIYNGSGNQAASVNPDPNKPYL IQSWV SKS ENGD DSDN A FIT
 A8ARQ0_CITK8 ATYINSTRVINEKARETSFTIYNEGLKPVLLQLWT EK DNIFDRPEEIKT P FII
 A8ARQ3_CITK8 DVVINGTRVIFNADKESTVQLKNRGNNPYL LQIWM VP LPQDKTAL FLI
 A8EG68_SERP5 GVVDPSSVIVEAADGEGTINQVNTDPYPL L LTTL DD GINS TPE TANV P FLL
 A8GJF8_BURM1 GMVPETSIVLIDEAVGETAMKVRNTDDKPALLYTII EH VPD DQEK L FTV
 A9C1A2_DELAS SLVLYGTRVIFSGDET EATLKISNEGKLP SLVQSWL DT GDGM APE GIDV P FVI
 A9CH21_AGR75 SLRVAPVLLDLKAPTAASSLRIW NDAKTPIN VQVRI FR WTQQNGQDV YTA VND VVA
 B1IRR9_ECOLC AII PDRTRIIMNESDKGEALKLTNQSKKLPYLAQTWI ED TKG NKSR D FIV
 B1J4Y3_PSEPW ALTISSTRIIYES TQR SASVVA NPSQRPFAAQTWV NT QA DDT STPV P FMT
 B1YQ84_BUR44 ALSVIGTRVYPGDARALTFARNSGDAPILVQAWL DD GDANA DPS RL RV P FVV
 B1Z6H6_BUR44 GVVVSATRVVYSSDSREVSVRTNEGKSPVLVQWL DT GDEAA KPE ALQV P FTL
 B2T9W8_BURPP SVTIGGTRLVYPLDQREVTAKLNNDSHVPSLVQVMM DD GNADA KPG EVKV P FLI
 B4SQ28_STRM5 SLQVSPTQFELRANQNAEALWISNSGT EPVQVQVRI YR WQQADGRDQ LEASDA LLP
 B8E3T6_SHEB2 SVVMTNTRIIYPNVQETTQVLTNNDMSPNVVQVWT DN GDAQS TPD TANG P FLA
 CLPE_ECOLX SLAADQTRYIFRGDKDALTITVNTNDKE RTFGGQAWV DN IV E K DTRP T FVV
 FANE_ECOLX AFTLNSTRYIYNEGQQSVSVNIHNESEHKYGGQVWI DN IDK NGEVVF FSP
 O68439_PHOLE AFILNGTRVYIYNE NDKNISITISNESKETYGGQVWV DN INESDNSV S FIA
 P72210_PROMI GVS LGATRIIYNS NIKQTNLVVTNSDKENSFL IQSWV SD KND FIV
 PSAB_YERPS TVKIGTTRVYIYPS SSTKGVSVSVA NPQD YPILVQTVV KD EDK TSPA P FIV
 Q02GH2_PSEAB GVTAEERTRAIAEGHR ETSLLLVNQNA YPVI VQTWI DD GAPNSTP QSARAP IMP
 Q02LR9_PSEAB SVVVTGTRVYIPGEAR EKTQVLSNRDAFPNVVQAWV DI DAPDA PPD QADA P FLV
 Q02SP9_PSEAB SLSVIGTRFIYPA GVSALTIRVG NVGT RPALVQAWL DR GDETA DPS AVTV P FIL
 Q0AAK4_ALHEH GLQVTPLRVHLDE DTPAAALTLR NHGD RSRV IQTEV VH WTQE EGEDI HAPTDE VLV
 Q0B8E7_BURCM SVVIAGTRVIFPSTER ETVIQLT NDSK RPALVQAWL DD GDSRA LPE NIDV P FTL
 Q0BF38_BURCM GVVVPETSVVIVDEADGEGTISVRNTDT HPTLHTTV EP IPEDKAEL LIV
 Q0FFL3_9RHOB DIGVSPVRVLELSDNQKMGAI TLRNAGT EPVSMQLEVLN WSQA EGEDV LTPTRE MLA
 Q0H09_SHESM SVVLDNTRIIYRS DKEEVS LKLT NKS EPFLVQSWI DN GELNL DPS NIKV P FVI
 Q0HR81_SHESR GISINGTRLIYDGNKSEAQLTVKNTGN SPYL IQSWV EE KRNSG FII
 Q0SZH7_SHIF8 KLKLSATRLIYEQGSDGAAITVT NPQDWPMLVQSKV FE EDK VTAAP FIV
 Q0T695_SHIF8 GIGLAATRLVYSEGEEQISLGVNTPSPDVPYL IQSWV MT PDNK K SAD FII
 Q0TB96_ECOL5 FFGPRESRLLFEEKKGNTFYRIDNSDKKLPWL VQAWI ED AS EKTTA LTA
 Q0TC33_ECOL5 GFGLGVTRLIYPAESKQITLSVQNSGDNTSYL IQSWV DD SKTEK KSQD FVI

Q0VTH1_ALCBS AFVLGGTRVVYNA -- GDN - DVTLSVM - NTSS - LPYAGQAWT - - - - - DP - - - - - FHQEAGNSI - HSDAPN - - - - - FVI
 Q157S5_ECOLX NFEINKTRV IYSD - - STP - - - SVQIS - NNKA - YPLI IQSNV - - - - - YD - - - - - WDESNNKNHD - - - - - FIA
 Q1C011_YERPA GVTIGESRI IYPL - - DAA - GVMVSVK - NTQD - YPVL IQSRI - - - - - DS - - - - - ENKEKESDP - - - - - FVV
 Q1C0R2_YERPA SVMVTGSR IYPA - - AAS - EHSIQLT - NNDN - FPNALQVWL - - - - - DS - - - - - GDEKS - TPE - TGKA - P - - - - - FIV
 Q1CID2_YERPNI GVAIGLTRV IVTG - - ADK - SGSVQIL - NDGL - HPAL LQLWV - - - - - DN - - - - - NIAEMDKPIEQ INV - P - - - - - FVV
 Q1LDF4_RALME SVVLGGTRV ILDE - - KDK - EATIRAS - NEGN - TPAL IQTWW - - - - - DK - - - - - GDPKA - SPT - SIEV - P - - - - - FTV
 Q1LMS9_RALME SVTLTGTRV IYDG - - RSP - GESLQFT - NQGS - SPSVMQVWV - - - - - DS - - - - - GNEQS - TPK - TADA - P - - - - - FIV
 Q1LMT2_RALME GVTPEVSRVVYAA - - DAA - EQSLQVF - NVND - YPVL AQAWI - - - - - DD - - - - - GRIDALP - - - - - QESTAP - - - - - IVV
 Q1LQW5_RALME SVVLTGTRV IYPE - - SER - EVSLKLT - NEGD - APSL VQAWI - - - - - DD - - - - - GDPNA - TPE - NAKS - L - - - - - FVL
 Q1R2V5_ECOU SVVIMGTRVVYPA - - TQK - SISRNLN - NDNE - SPAL VQSWL - - - - - ES - - - - - GDAAA - PPE - SVHV - P - - - - - FII
 Q1Z6V0_PHOPR AFTLNATRVVYTE - - GTK - GANLVIK - NNNE - KKYGGQVWL - - - - - ES - - - - - EADAIPD - - - - - NSFVI
 Q1ZU81_PHOAS GIALGQTRV IFDG - - SKK - EVELSVS - NNKKSNYL IQSYI - - - - - TK - - - - - SNNK - - - - - KTNND - - - - - FII
 Q2C0X1_9GAMM ALQLNATRY IVNE - - GDK - SIEIKIE - NIAD - KTYAAQIWI - - - - - EN - - - - - ED - E - K - DKKV - N - - - - - FIP
 Q2C0X3_9GAMM GLKMNKTRY IYNE - - GQG - DITLNIS - NDTD - VNYGGQVWI - - - - - DN - - - - - LH - KVN - TKS - V - N - - - - - FIV
 Q2C8W4_9GAMM SVRLDQTRV IFHG - - ASK - SANLSIS - NDSETDKYFKGKV - - - - - EK - - - - - LNNKNA - - - - - FII
 Q2L0Z6_BORA1 S IQLGSTRV ILNE - - SSR - NAVVGAK - NVGT - DPVWVQAWI - - - - - DA - - - - - DGE - KMET - P - - - - - FFI
 Q3KBS3_PSEPF G ILSLSSTRL IFDG - - KHK - EASITVR - NS - G - ADVL VQSWV - - - - - DT - - - - - DSD - - - - - E - AGSA - P - - - - - FAV
 Q3RE51_XYLFA G I I I AGTRVVYPA - - QSR - DVTVQVT - NTGE - NPAL LQTWM - - - - - DD - - - - - GDSKQ - TPD - ESKA - P - - - - - FLV
 Q3YXD3_SHISS AVSIN - - - - - SQG - EGNVRI - KSGNEVQY - I - KATVFRIDNPST - - - - - DD - - - - - PQENEVEIK - SGDANH - - - - - LVV
 Q3ZV22_ENTSA SMTISGTRI IFPG - - NEK - DVSVRTN - NKGS - QPAL VQVWV - - - - - DD - - - - - GKTDS - DIN - QVKI - P - - - - - FVV
 Q46992_ECOLX AFGPTENRL IFDG - - SKS - FISYQIS - NSDKKIPWL VQAWI - - - - - ED - - - - - AK - ENRTND - - - - - FTA
 Q48BA8_PSEF14 SVNLGATRI VYPO - - KSS - GEQLSVS - NLQD - YPIL VQSSV - - - - - TG - - - - - EDN - KSAA - P - - - - - FLV
 Q48MA5_PSEF14 G I V L N T T R V I Y Q G - - N E K - E V S L G V H - N S G G - G E I L L Q S W L - - - - - E S P T V A T N K T D N N D - - - - - T - P A Y L - P - - - - - F I V
 Q4FBG4_ECOLX AVSLDRTRAVFDG - - SEK - SMTLDIS - NDNKQLPYL AQAWI - - - - - EN - - - - - ENQEKI - TGP - - - - - VIA
 Q4KGP1_PSEF5 DLSIVGTRF IYPA - - DKP - AISIRVG - NSGR - APIL LQAWL - - - - - DK - - - - - GDAEV - DPS - ALVV - P - - - - - FVL
 Q4KGP3_PSEF5 G I V L E G T R L V Y P A - - E A R - E V T L K L S - N T G S - V A L L A Q S W I - - - - - D E - - - - - G D A N K - S P E - E I K V - P - - - - - F L L
 Q4USR7_XANC8 S L Q L A P T S L T L T A - - Q Q S - A D G L W L S - N S G S - A P V Q V Q T R A - - - - - Y R - - - - - W T Q R - E G Q D Q - L D P T Q E - - - - - L L I
 Q57K89_SALCH AVNVDRTRI IMDA - - P Q K - T V A I T L N - N D D K T T P F L A Q S W V - - - - - T D - - - - - A D G V R - T D A - - - - - L M A
 Q57TN4_SALCH G I A L G A T R V I Y P Q - - G S K - Q T S L P I I - N S S A S N V F L I Q S W V - - - - - A N - - - - - A D G S - - - - - R S T D - - - - - F I I
 Q5PDB2_SALPA D I V I S G T R I V Y P A - - S S K - D V I V N L D - N R G N - K P L L V Q T W L - - - - - D D - - - - - G R D G V - D P Q - E L K L - P - - - - - F V I
 Q5UDS2_ECOLX G V V V G G T R F V Y P E - - K Q S - S I S V E L K - N T A S - K D M L V K I S V - - - - - - - - - - T P D D G R Q L K G T L E S Q P L L P D K A F I A
 Q60C06_METCA Q F D V S P T R I E L T A - - A K P - T A A V T L K - N E S G - D K L V I Q N S I - - - - - V S - - - - - W T R E - G K E D R - Y A P T K D - - - - - L I V
 Q663Y0_YERPS A I N L D R T R I I F N S - - T D K - S A S V I L Q - N Q S P S S P Y L A Q S W L - - - - - E N - - - - - T K G Q K - I E S P - - - - - L V A
 Q669V9_YERPS E V M I S G T R V I Y E E - - K Q R - E G V V K V S - N T G D - M P V L L Q A W I - - - - - D K - - - - - G D A N A - R P E - A I K V - P - - - - - F S V
 Q68N1_ERWCT A L S L D R T R V I F N D - - D E Q - S A T I M L M - N Q N A E N P F L A Q S W L - - - - - T D - - - - - E H N K - V S T P - - - - - L M V
 Q6FFQ7_ACIA D G I L P E N T R V I F D G - - T A S - S R S F I V A - N Q N P - Y P I L V Q T W V - - - - - D H - - - - - G L G D P - - - - - D H D Q A P - - - - - F V I
 Q6FFR0_ACIA D N V V M T G T R V I Y P A - - E Q K - E K T L Q F S - N N A D - Q S Y L V Q I W L - - - - - D K - - - - - D N P Q S - T P E - T A D A - P - - - - - F L I
 Q6Q279_9GAMM G V S I D G T R I I F P S - - N A K - S V S V Q L R - N G F A - T P A L V Q T W I - - - - - D Q - - - - - G D M S S - I P A - A D Q I - P - - - - - F V L
 Q6S361_ECOLX S L H L G A T R V V Y N P - - A S S - G E T L T V I - N D Q D - Y P M L V Q S E V - - - - - L S - - - - - E D Q - K S P A - P - - - - - F V V
 Q7BQT3_9ENTR A L S V D H S R L I L N E - - G E K - A V S I T V H - N Q N N H V P Y L A Q A W L - - - - - E D - - - - - A S G Q K - I S Q P - - - - - L V A

Q7N502_PHOLL GVVIGGTRVIYMS--DKK-EASISIS-NPEKDAPYL IQSWI-----QD-----END-----NMKT-P-----FIV
 Q7N8D9_PHOLL GISLNKTRVIFTQ--GER-AQTLTVV-NTP-QAWL VQVRI-----MED-----VEKIA-P-----AFVV
 Q7N8E0_PHOLL GVGINTTRI IYPA--DSR-ATTASVS-NTSKEAVYL IQATV-----SS-----TST-GDKTAP-----FLV
 Q7N9P8_PHOLL GLHLNDRTRI IYPE--SSNGVSSSTL I--NNSD--NNYL IQSIV-----QE-----LNPETGLPL-GVKA-P-----FIV
 Q7N9P9_PHOLL GLMLRKTRI IYHQ--GDK-VQSMSLQ--NSGD-EVYL IQAAV-----TP-----GDSNSTRSSE-----FTV
 Q7N9Q2_PHOLL GFGINATRI IFLQ--DKA-EAIVSVR-NTTTNIPLY VTTKI-----TS-----TVDGKGT-P-----FVY
 Q7NYH9_CHRVO GVVVSGTRVVYKA--EDR-EVTVKVN-NPGK-EPSSL VQVMA-----DK-----GNEKS-VPD-TADA-P-----FLI
 Q7WI62_BORBR SLVITGTRVIYNA--GSP-ETTVKMS-NEGQ-APAL MQAWI-----DD-----GNAEA-KPD-EVQV-P-----FFL
 Q83Q20_SHIFL GIVLQRTTRVIYDA--SRK-EAALPVA-NKGAETPYL LQSWV-----DN-----IDG-----KSRA-P-----FII
 Q846B1_ECOLX AFGPRESKLI FES--DKA-YIQYRID-NTGKDMPWLVQAWV-----ED-----SK-EKKTKE-----FTP
 Q846R3_MYXXA ELDVSPVRLELDS--SAR-GVVMNVR-NKSS-ESTRFQASV-----YS-----WVQDEEGRMS-LAPTQD-----LFF
 Q84IF7_EDWTA GIQVDATRVIYNG--DEK-SASLPIH-NDSA-DAYMVQTWL-----DK-----GDS--TKV-ENKL-P-----MUV
 Q887H9_PSESM AIALSGTRLIFDG--RYH-EVSIQVIR-NRGK-AEAL VQTWL-----SDA-----RDDGDRL-PAE-RRSL-P-----FVV
 Q88LN9_PSEPK AITLNNTRL VFNG--DKR-STSVVVR-NPSK-SIYAVQAWI-----NT-----DA-DDN-TTSV-P-----FAT
 Q8GFD0_PHOLU GITLGGTRLIYNG--SQK-EATISIT-NSDTERPYL VQSWV-----DN-----IDNS-----QNKV-P-----FVI
 Q8X5C5_ECO57 GIMPASSRIYRD--GDR-EKTLMLV-NTND-YPVL VQSWV-----DN-----GEGSP-----EAAASP-----FVV
 Q8X5K6_ECO57 GVGLSSTRVIYDG--SKK-EASLTVQ-NKSKTEEFL IQSWV-----DD-----AAG-----SKKT-P-----FII
 Q8XAP6_ECO57 SVVMTGTRIFPG--DAK-EKTIQLR-NTSD-QPYI INIHV-----ED-----ERGS-D-K-----NV-P-----FMP
 Q8XAX5_ECO57 AVALGATRVIYPA--NQK-QVLLPVT-NNDPASVYL IQSWI-----EN-----AGDQ-----KDTQ-----FVI
 Q8XCP6_ECO57 SVTPDRTRLIFNE--SDK-SISVTLR-NNDPKMPYLAQSWM-----ED-----GQGNR-ISSP-----LTV
 Q8XCT5_ECO57 GIALGATRIIYPA--DAK-QTAVWIR-NSHTNERFL VNSWI-----EN-----SSGV-----KEKS-----FII
 Q8XPY7_RALSO ALQISPIRLDLP--GQS-AGSLTLR-NRGT-QPLINAQVRV-----FR-----WTQD-AEGDR-LEPAPA-----LVA
 Q8XVY1_RALSO NFTPVPVRVELSQ--QRP-SAALTVK-NEMTDESIVVELRA-----VA-----WTQT-NGEDV-YAPAQD-----LLA
 Q8Z2Q0_SALT1 GIVVGGTRVIFHG--NDP-DSTISIY-NKEVDLPYL IQVWV-----DPF-----SKDD-----KSKP-P-----FTV
 Q8Z454_SALT1 AIVPDRTRVIFNG--NEN-SITVTLK-NGNATLPYL AQAWL-----ED-----DKFAK-DTRY-----FTA
 Q8Z5C5_SALT1 GIVYIGTRVIYPA--EKK-EVVVQLV-NQGE-QASLVQSWI-----DD-----GNTSL-PPE-KIQV-P-----FML
 Q8Z930_SALT1 AVNIDRTRIFAS--DEV-AQSLTLS-NDNT-TPMLLQVWT-----DD-----GNIDASP-----DNSKTP-----LVA
 Q8ZR10_SALT1 SVTILGSRIYPS--TAS-SVDVQLK-NNDA-IPYILVQTFW-----DA-----GDMNT-SPE-NSSAMP-----LIA
 Q8ZRK3_SALTY SVKLGATRVIYHA--GTA-GATLSVS-NPQN-YPI L VQSSV-----KA-----ADK-SSPA-P-----FLV
 Q933K1_9PAST NVVITGTRVIYPA--GQK-NVIVKLE-NNDD-SAALVQAWI-----DN-----GNPNA-DPK-YTKT-P-----FVI
 Q937J4_ECOLX AFVLNGTRFIEE--GKK-NVSFEVT-NNAD-KTYGGQVWI-----DN-----TNQ-GNGV-Y-----MVP
 Q985D6_RHILO SLRVAPNTIEMIA--PDS-AAALTLR-NDAK-QPINVQIRV-----FR-----WTQE-GGIER-LEPTSD-----VVA
 Q9RH98_SALTM GVVIGGTRF IYHA--GAP-ALSVPVS-NRSE-ASWL IDTHI-----LP-----GGRWPGTKN-EGNIMR-----FVV
 YHCA_ECOLI GMVPETSULLVDE--KRG-EASINIK-NTDD-HPSL LYTTI-----VD-----LPESNKSIR-----LIP

	90	100	110	120	130	140	150	160
A0A507_EDWIC	S - PPI	ISKLPGESQVVR	I - FL - KDKT	- - - - IS -	- - - - K - EMLGRLRFQE	ITSEP	- - - - N -	- - - - NKT -
A0KFM9_AERHH	L - PPV	QVRVDANQKS	I - VRI - AS -	VPAI - DSLPKD	- - - - R - ES	IYFNLRRE	IPPKS	- - - - E -
A1A716_ECOK1	T - PPI	SRIDAKRGQTI	KL - M - Y -	ASSA -	- - - - R - ES	VFWNVLE	VPPKPD	- - - - AAKAA -
A1JTK4_YERE8	L - PA	VFKMQSGTAQAL	RI - IN -	KGDN -	- - - - R - ES	VYWLNL	YE -	- - - - RRNTDAHA -
A1RPW4_SHEWY	- PGL	LQIAPKERKHIN	- LN -	IAEQ -	- - - - Q - EQL	YWLNL	YE -	- - - - AKNIDETEG -
A1V426_BURMS	Y - PPL	QRVEPKERNVLR	I - AR -	MPGA -	- - - - R - ES	VYLNIRE	VPPKT	- - - - D -
A2I2U0_SALTM	T - PPI	LKVESNARTRL	KV - IP -	TSNL -	- - - - E - ES	YWL	CVKGM	- - - - NESNKNNTTNL -
A3L5P1_PSEAI	T - PAL	SRLGGNKQQLRI	- L - FQ -	GEG -	- - - - R - ES	VFRNLVQE	IP -	- - - - QKSAS -
A3LFH6_PSEAI	T - PAV	TRVDPNGGAVLR	I - A - YL -	KAP -	- - - - R - ES	LFWNL	ILE -	- - - - EDE -
A3NVI3_BURP6	M - PPI	FRVEPKKQQLRV	- M - Y -	GDD -	- - - - R - ES	VYWLNVLE	IPPKP	- - - - TVEAE -
A3NVI3_BURP0	T - PPL	FRLDGGKEQRVSV	- R - YV	KRGAG -	- - - - V - ES	VYWLNVKE	IPSTE	- - - - KRNAD -
A4W7S1_ENT38	N - PPI	QWVQLQSKMNVLR	I - YV -	GQI -	- - - - K - ES	VYLN	LNKA -	- - - - KEDDO -
A4WBN8_ENT38	T - PPL	FRLDPEKEQSLRI	- A - WN -	GAA -	- - - - K - ES	LFYMNIRT	IPATA	- - - - KEDDO -
A4Y251_SHEPC	L - PA	IFKLKSKEAKS	IRL - VK -	IDDN -	- - - - R - ET	LYWLT	IYE -	- - - - GDKADAENNTDNA -
A5W6W1_PSEP1	V - QPL	ALIPPNGRHMLRV	- L - YA -	GKG -	- - - - R - ES	LFWNL	ILE -	- - - - RKPEQ -
A5WGG7_PSYWF	T - PPI	TRVEPGKQSLRVSA	- LP -	GVNS -	- - - - Q - ES	LFWNL	VLD -	- - - - KDADSGS -
A5XNC2_BURML	S - PPL	VQIGGGEQLVRL	- VR -	VAHD -	- - - - R - EE	YRVL	IDELPT	- - - - PDAPVVN -
A6AJW3_VIBHA	V - PPI	FRMAPEEVKGARL	- LL -	NREDL -	- - - - QFDD -	- - - - R - EN	LWLN	FQVNE
A6AJW6_VIBHA	L - PPI	IAKIEPQQQTLRI	- I - KG -	VEGE -	- - - - K - ES	VYFN	FLQ -	- - - - AISKVSSGN -
A6AMM6_VIBHA	V - PPL	RIESKDYAMLR	I - KS -	LPTA -	- - - - R - ET	AYFLH	VRE	- - - - EKSADKADTATG -
A6BWZ4_YERPE	L - PPI	FRLQQAQRSLRL	- LL -	SGSK -	- - - - R - ES	AFWLN	IYE -	- - - - TPKSGDES -
A6D0K0_9VIBR	T - PNI	LISKADRSRGFR	I - YN -	LESV -	- - - - E - VE	TYRTL	SAAS -	- - - - D -
A6T558_KLEP7	T - PPL	FRLEPGQDNTLRA	- V - FT -	GAN -	- - - - R - ES	LFWNL	IKT -	- - - - KNEVQ -
A6T5S1_KLEP7	L - PPI	IVRIIEPGKQSWRL	- V - FN -	GSR -	- - - - R - ES	LFWN	LLE -	- - - - KNGKT -
A6T932_KLEP7	T - PPL	FRLDAGSDNLRV	- L - LT -	SPQ -	- - - - R - ES	FTLN	IKV -	- - - - APAG -
A6TCS0_KLEP7	T - PPL	VKLREPEQSAQLRF	- I - YS -	GTG -	- - - - R - ES	LFWN	IQE -	- - - - PAPEE -
A6TCS4_KLEP7	T - PPL	FRLDPEQNNVLR	I - N - FI -	GAS -	- - - - R - ES	VWLN	VKS -	- - - - QGE -
A6TDK5_KLEP7	T - PPI	SRVDAKSGQTLRI	KL - GS -	SAG -	- - - - K - ET	LWNL	LLE -	- - - - NQKNEG -
A6TDX7_KLEP7	L - PPL	QRLEASDALTLRI	- RL -	TRNT -	- - - - R - ES	VIL	SLKT -	- - - - KN -
A6TDX8_KLEP7	T - PPL	FRLEPNSQNSVL	I - VR	NGAAQ -	- - - - R - ES	VYLS	FLA -	- - - - DAAEGTQSGVSA -
A6TDY1_KLEP7	T - PSL	FRLEPGSTNQVLV	- V - VK	KPGAD -	- - - - R - ES	LYFR	SVAMPAGE	- - - - KQSASPSVVGG -
A6TGZ3_KLEP7	T - PPL	FRLKAGEKGFVRV	- V - RS -	GKK -	- - - - R - ES	MWLN	IKG -	- - - - YVPD -
A6TH61_KLEP7	T - PPL	FRLEKQKQTVRL	- FS	NGNVN -	- - - - R - ES	MYFN	VMA -	- - - - DAKANN -
A7FIQ9_YERP3	T - PQ	IFRMEANSQVVRL	- T - YI -	AHN -	- - - - R - ES	VYLN	FLQ -	- - - - ADTQP -
A7FNA7_YERP3	S - PPI	TRINAGQSQQVNF	- VL -	KKGS -	- - - - N - EV	L	KASFE	- - - - GN -
A7ME56_CROS8	T - PPL	FRLEPLEDHELRI	- A - KT -	GS -	- - - - R - ES	FLN	IRA -	- - - - QDA -
A7MPA3_CROS8	S - PAL	FRDPNNVRKLHI	- I - HK -	NAP -	- - - - R - ES	VYWI	IKAS	- - - - EOK -
A7MQC6_CROS8	T - PPL	FRLAPKSDNVR	I - V - YL -	GNG -	- - - - R - ES	LWLD	VKG	- - - - DEESKV -
A7ZGQ2_ECO24	T - PPL	FRLDAKRETDIR	I - VM -	VNGL -	- - - - R - ES	LK	TCVRG	- - - - WANNKEF -
A7ZXX8_ECOHS	L - PPI	QRLEPKATTQVRI	- VK -	QAST -	- - - - R - ET	L	FFYNI	- - - - E -

90 100 110 120 130 140 150 160
 ABAFU5_CITK8 T - PPL YRLDNGQQVMRI - I - R - - - AGN - - - - L PED - - - - K - E S L F W L N I K S I P S A Q - - - - - R K D - - - - - N -
 ABAN73_CITK8 T - PPL FRLNAKEDNVLRI - I - R T - - GGN - - - - L PED - - - - R - E S L Y W L N I K A I P S S K - - - - - H V E G - - - - - V N -
 ABAL42_CITK8 T - QP VTRVDAGKTQRVRF - - V L - K N S A - - - - E P L K - - - - V - E H L K R V I F T T I P Q R D - - - - - K N -
 ABALX4_CITK8 T - QP VVRVEPGEQQLRF - - - I M - E S S A - - - - P L T - - - - K - E H Y K R V T F E G I P P S G - - - - - V S - K G A M -
 ABAP82_CITK8 T - P P V F R I Q P G E G I R I - V - F T - A A Q S - - - - L P Q D - - - - R - E S L F Y F N F E G I P P P A N - - - - - V G O R S Q D Q G N Q N -
 ABAP85_CITK8 I - P P V F K M Q P T E I R T V K L - - - Q L A E K P E - - - - L A R E - - - - R - E S L Y W L N I Y Q I P P M T - - - - - D Q D A K T R Q -
 ABAPK7_CITK8 T - P P L F V S N P G D E N A L R L - M - F L - - G G T - - - - L P T D - - - - R - E S L Y R L T V K A I P A V N - - - - - K D E V K E - - - - - R N -
 ABAPL4_CITK8 T - P P L F K L N S Q A G N S V R V - M - L S - - G D T - - - - L P T D - - - - R - E S V Y W L N I K A I P S S S - - - - - P D A - - - - - K N -
 ABARQ0_CITK8 L - P P I I F R L E G K T S R A V R V - Q - F T G D Q H T - - - - L P A D - - - - R - E S L F W L N T L E M P P V A - - - - - D S K A E - - - - - K G -
 ABARQ3_CITK8 A - P P V V R I D P A K G Q A V R I - M - A T - - N P S - - - - L P Q D - - - - R - E S L F W F N M L E I P P K A - - - - - Q D S T S G - - - - - K T -
 ABEGE8_SERP5 T - P P A A R V E P G K S Q V R F - - - L L - T D K T - - - - P L S - - - - T - E R L M R V I F E G I P P P Q - - - - - K - - - - - D K S -
 ABGF8_SERP5 S - P P V V K V S A N S Q Q L R I - K - K I - - G P K - - - - L A G D - - - - R - E S V F Y L N V L D I P P V P - - - - - E N L Q G - - - - - Q N -
 A9ALF9_BURM1 T - P P V A R V D P G Q T Q L V R F - - - I L - - T N K - - - - T P L K - - - - T - E R L A R V V F D T I G E R K - - - - - D P D - - - - - A S -
 A9C1A2_DELAS A - P S L T R L E A S D Q Q M L R I - I - H S - - G Q P - - - - L L Q D - - - - R - E S L F W I N V L D M P P K T - - - - - E N A K G - - - - - S Q G -
 A9CH21_AGR75 S - P P M T Q L K G G A E N L I R I - - - V R - - L S K - - - - T P V R - - - - A - E E S Y R I V D E L I P P A G - - - - - K P Q - - - - - S G -
 B1IRR9_ECOLC T V P P M V R L N P N E Q I Q I R M - I - T Q E K I A Q - - - - L P K D - - - - R - E T L F Y F N V R E I P P K T - - - - - D K - - - - - K N -
 B1J4Y3_PSEPW S - P A L F R L A A G K D Q S V Q I - S - G L - - P N D - - - - L P Q D - - - - R - E S L F F F N L Q E I P P A T - - - - - S D A - - - - - Q N -
 B1YQ84_BUR44 A - P P L A R L D P G Q P L S I R V - Q - S I - - G G S - - - - L A A D - - - - R - E S C F F W I N L L E M P P A A - - - - - P A G - - - - - D H -
 B1Z6H6_BUR44 A - P P V F R M N P G R G Q T I R M - M - Y T - - K E P - - - - L P Q D - - - - R - E T V F W L N V L E I P P K V - - - - - K G A D G - - - - - A N -
 B2T9W8_BURPP T - P P I I F R M N A M K A Q T L R V - M - Y T - - G E P - - - - L P Q D - - - - R - E S I Y W L N V L D I P P K A - - - - - N H E P Q - - - - - A N -
 B4SQ28_STRM5 S - P P M Q S L A A G Q R Q L V R L - - - V R - - V D A - - - - S A P A - - - - V - Q Q A F R V I V D E I P A Y D - - - - - P T - - - - - R Q -
 B8E3T6_SHEB2 L - P A I I F K I E P K R G Q L I R L - I - Y T - - G G E - - - - L P K D - - - - R - E S I F Y F N F L Q I P P S L P - - - - - K S D R D - - - - - E N -
 CLPE_ECOLX T - P S F F K V K P N G Q Q T L R I - I - M A - - S D H - - - - L P K D - - - - K - E S V Y W L N L Q D I P P A L - - - - - E - - - - - G S -
 FANE_ECOLX S - P M V F K L N P K Q K I V R I - V - N I - - N D N - - - - L P K D - - - - R - E S I F W L N V Q E I P P A P - - - - - K G D - - - - - G G -
 O68439_PHOLE I - P S F F K V D G N D N Q I R I - M - K T - - S E A - - - - L P K D - - - - R - E S I F W L N V Q E I P P K S - - - - - K D K K - - - - - S N -
 P72210_PROMI T - P P L Y I L D A N K E N A L R I - M - Y T - - G E P - - - - L P A D - - - - R - E S L F W M N V K A I P S L D - - - - - E K L A N - - - - - E N -
 PSAB_YERPS T - P P L F R L D A G L Q G R V R I - - - I R - T G G K - - - - F P E D - - - - R - E T L Q W L C L T G I P P K N G D A - - - - - W G N T Q N P K N S P T M - - - -
 Q02GH2_PSEAB L - P P V F R L E P G Q R S L R L - - - L R - T G Q A - - - - L P G D - - - - R - E S L Y W L N L Y E I P P Q A - - - - - T G L L A E G Q S - - - -
 Q02LR9_PSEAB N - P A V F R M A P D S G Q T L R I - V - Y T - - G Q G - - - - L P G D - - - - R - E S L F H L N V L Q I P P R N - - - - - S S H A D - - - - - R N -
 Q02SP9_PSEAB S - P P L L R M D P Q E T Q A L Q L - R - H T - - G E P - - - - L P D D - - - - R - E S L F W N L L E M P G R E - - - - - D G S - - - - - G N -
 Q0AAK4_ALHEH T - P P I I F T V E P G E S Q V V R V - - - A H - A G R N - - - - A D S T R A Y - E Q A Y R I Y L Q E S P P - - - - - P T E G D G A - - - -
 Q0B8E7_BURCM T - P S M F R M E A G N G Q T L R L - V - H T - - G E P - - - - L P A D - - - - R - E S L F W L N V L E M P P K A - - - - - A A T E N - - - - - R N -
 Q0BF38_BURCM T - P P I I A R V E G G A V Q L V R F - - - V L - A G N E - - - - P L V - - - - T - Q R L A R V S F G I P P K R - - - - - Q - - - - - N K N -
 Q0FFL3_9RHOB N - P P I I F T I P A G G S Q L V R I - - - G L - R R A P - - - - D A K - - - - R - E L T Y R I I L Q E L P P - - - - - P P S I G F N - - - -
 Q0H109_SHEM S - P P I I N K I N A G E G Q H L R I - F - Y T - - G E T - - - - L P D N - - - - K - E S I F W L N V L S M P P K N - - - - - N S N - - - - - A N -
 Q0HR81_SHERS T - P P L F R I E G H E R H I L R I - Y - K L - - S D N - - - - F P K D - - - - R - E S I F W I N I K S I P R S D - - - - - K S E - - - - - L N -
 Q0SZH7_SHIF8 T - P P L F R L N P G Q N K M W V - - - V Q - T A P A - - - - L - Q D - - - - R - E K L H W L C A T G I T P K K S D V - - - - - W A E K D K E K I A E N V N L - - - -
 Q0T695_SHIF8 T - P P L F V L N P A N E L L R I - M - Y I - - G A P - - - - L A K D - - - - R - E T L F F T S V R A M P S T T - - - - - K R E E - - - - - G N -
 Q0TB96_ECOL5 T - P M V F R V E P S S V F T V R V - - - V K - - T G A - - - - L P E D - - - - R - E T L F W A V S N S L P G G A - - - - - S T K O D N E E G K I S A - - - -
 Q0TC33_ECOL5 T - P P L F M L P T R K E A S L R I - M - F L - - G K T - - - - N L P T D - - - - R - E T L Y W M N V K A I P P T D - - - - - E K N T Q - - - - - K N -

90 100 110 120 130 140 150 160
 Q0VTH1_ALCBS T - PPIVFRVPEGETQKLR - I - L - ATPP - - - PSEE - - - V - ESVYWINVQEIIPPEP - - - - - K - - - NSN - - -
 Q157S5_ECOLX T - PPIIFKMESESRNIKI - I - K - TNIK - - - LPDS - - - Q - ESMRWLCIESMPPIE - - - - - KSTKINRKEGRD - - -
 Q1C0T1_YERPA T - PPIFLRLDAKQNSLR - I - AQ - AGGV - - - FPRD - - - K - ESLKWL CVKGIIPKDEDI WV - - DDA TNKQKFNPKDVG - - -
 Q1CBR2_YERPA T - PPIFRIEANSQT - RL - K - Y - T - GSG - - - LPTD - - - R - ESFYL N FLQIIPPVN - - - - - KVEK - - - - DN - - -
 Q1CID2_YERPN D - SPVFRINAKTNKSIRI - Y - YTGANQ - - - LPSD - - - R - ESMFWLNVLEVPKA - - - - - SANQSS - - - - QN - - -
 Q1LDF4_RALME M - PPIVARIDPSKQTLRV - L - Y - T - GEP - - - LPTD - - - K - ESFVWLNVEIIPKA - - - - - TGD LAE - - - - AN - - -
 Q1LMS9_RALME T - PPIVFRIGPNAGQIRL - L - Y - M - GKD - - - LPKD - - - R - ESFYLNTLEIIPSLN - - - - - ATYAN - - - - QN - - -
 Q1LMT2_RALME I - PPIIFRLGRGDQTSRL - - - IN - SGAA - - - LPSD - - - R - ESFLWLNIEIIPSTP - - - - - NGSMAESQ - - -
 Q1LQW5_RALME T - PPIFLRLDAKQKQTLRI - I - QL - QQA - - - LSRD - - - Q - ESFLWLNVEIIPPIA - - - - - SSSKDP - - - - QN - - -
 Q1R2V5_ECOUPT T - PPIIFRMDKSGQTVRI - V - Y - T - GES - - - LPKD - - - R - ESFLYLVNLDIIPAKPRAKK - - - - - DSDNSEQRN - - - - NN - - -
 Q1Z6V0_PHOPR S - PSLFTLASSKQNLRI - - - MQ - TSAN - - - LPID - - - R - EALFWLVVQELPPAL - - - - - E - - - - EAN - - -
 Q1ZUB1_PHOAS T - PPIFLVMKGKEENLRI - VGVN - KDS - - - LAKD - - - R - ESLYWINVKAIPSL - - - - - EKDKG - - - - KN - - -
 Q2C0X1_9GAMM M - PPIFKFNKGETQIVRI - L - NT - QKS - - - PSIK - - - N - ESLYWLNQEIIPVD - - - - - KSK - - - - KS - - -
 Q2C0X3_9GAMM L - PSMFKIVKNGRQIRL - K - NI - GND - - - IRKD - - - Q - ESFFI NVLEIIPPRP - - - - - KNAP - - - - DS - - -
 Q2C8W4_9GAMM T - PPIISSLDHNDKITLRI - - - SR - AFGD - - - LPKD - - - K - ESTYTTITAIIPKVK - - - - - K - - - DGHS - - -
 Q2L0Z6_BORA1 T - PPIUGRFDGGVERNLSI - T - RV - ADG - - - LPKD - - - R - ESQYWINVLEIIPQQG - - - - - AAN - - - - TN - - -
 Q3KBS3_PSEPF T - PPILVRSGDQQLRV - I - YE - GTG - - - MPD - - - R - ESVVWLVNVEIIP - - - - - QSAKT - - - - AN - - -
 Q3RE51_XYLFA T - PPIISRVEPGSQALRL - F - FT - GTT - - - TLPED - - - R - ESFLWLNVEIIPPTPLEHSDKNAPT SADKSDG - - - - - QN - - -
 Q3XYD3_SHISS M - PPIKALPAGSSKTVRF - - - - VAM - - - EPEQ - - - K - EKRYRVKFEAVPSI - - - - - D - - - VATD - - -
 Q3ZV22_ENTSA T - PPIVYRVPEGRGQSVRL - V - YN - GMT - - - LPOD - - - R - ESFVFNMLEIIPPA - - - - - DGNVK - - - - KN - - -
 Q46992_ECOLX A - PLVFRVPESSQFSARL - - - IK - KGS - - - VRED - - - Q - ETIYVWVSNAIIPGGE - - - - - EVKTEQERKISA - - -
 Q48B48_PSE14 T - PPIFLRLEAHQQRSLRV - - - IR - TDDN - - - LPTD - - - R - ESFLFWMCVKAVPP - - - S - - - - DDDATTAPEKVS - - -
 Q48MA5_PSE14 T - PALTRMAGGGKQLLRI - I - HS - GAD - - - MPTD - - - R - ESVLWLVNVEIIP - - - - - QTA - A - - - EN - - -
 Q4FBG4_ECOLX T - PPIVQRLEPGAKSMVRL - - - ST - TPD - I - SKLPQD - - - R - ESFLYFNLRREIIPRS - - - - - E - - - KAN - - -
 Q4KGP1_PSEF5 S - PPIISRLEPRQNAALVL - R - YS - GEP - - - LPGD - - - R - ESFVWLNVEIIPPLA - - - - - AAK - - - - DD - - -
 Q4KGP3_PSEF5 A - PAVSRVEAGGSAIRV - S - YS - KEP - - - LAKD - - - R - ESFLWLVNVEITPRR - - - - - KQD - - - - EN - - -
 Q4USR7_XANG8 S - PPMRTLAAGERQLIRV - - - IR - AGPP - - - PRG - - - E - EVCYRIIVDELPS - - - - - VD - - - ADRN - - -
 Q57K89_SALCH L - PPLQRIDAGQKSQVRI - - - TQ - VRGLTDKLPQD - - - R - ETLFWFNVRGVPPKS - - - - - E - - - DDN - - -
 Q57TN4_SALCH T - PPLFVIQPKKENILRI - M - YV - GPS - - - LPTD - - - R - ESFYLNSKAIIPSD - - - - - KNKLT - - - - - GN - - -
 Q5PDB2_SALPA T - PPIVSRIDPQKQSLRI - T - YM - GST - - - LPOD - - - R - ESFLWLVNVEIIPKSK - - - - - AKEGES - - - - LN - - -
 Q5JDS2_ECOLX T - PPIVLVKQDKNTKIRI - - - NR - VGGQ - - - LPID - - - R - ESFLILNIAVLPAQE - - - - - QNSQLKNE - - -
 Q60C06_METCA T - PPIITVPPGGSQVLRV - - - GL - RRPV - - - DPR - - - R - ELAYRLFVQEMPP - - - - - PPQTGFT - - -
 Q663Y0_YERPS L - PPMQRIDAGQKSQVRI - - - MK - LPDA - DKLPD - - - R - ETLFYFNVREIIPQS - - - - - E - - - MNN - - -
 Q669V9_YERPS T - PPIVVRLDPKRDQTLRI - F - RT - DGG - - - LAAD - - - R - ETLFWFNLEIIPKPI - - - - - QSAAGG - - - - EN - - -
 Q6D8N1_ERWCT L - PPLQRIEAKGYSILRI - - - VK - TEKI - TQLPTD - - - R - ESFLYLVNREIIPKA - - - - - E - - - KPN - - -
 Q6FFQ7_ACIA D N - PPIIFKMQPDAIQVLKI - - - IY - TGDD - - - KQTD - - - F - ESQFVLNLYEIPGKK - - - - - KLSNQKPETNH - - -
 Q6FFR0_ACIA D N - PQVFRINPKRQGMVRM - V - Y - T - GDA - - - ILPAD - - - R - ESFYL NFKQIIPALE - - - - - KNKLD - - - - QN - - -
 Q6Q279_9GAMM T - PPLSRVEAKKQIIRI - I - PT - GSP - - - ALPQD - - - R - ESLYWFNMLDIIPED - - - - - SANKD - - - - KN - - -
 Q6S361_ECOLX T - PPIFLRDGQSSRLRI - - - VR - TGGE - - - FPPD - - - R - ESLQWICVKGIIIPKEGDR - - - - - WAEGKDGEKKADKVS - - -
 Q7BQT3_9ENTR L - PPIIQRIEAGSKTSVRV - - - QD - - - INSH - AQLPSD - - - - - R - ESFVYFNLRREIIPKPS - - - - - E - - - KKN - - -

	90	100	110	120	130	140	150	160
Q7N502_PHOLL	T-PP	IFKLAADHENILRI-V-KT--ESN----	L-PQD--R-ESLFWLNVKSI PTSV-	-----KSN-----	-----QN----			
Q7N8D9_PHOLL	T-PP	LRLEANSQNSLRI-LPTF-NQPL--K-TG	PS--R-ESLGYVQMNAI PATQ--	-----QMTDESVRE--				
Q7N8E0_PHOLL	T-PP	LRMEPDSQNSQVRI--K-TG	PS--R-ESLFWFTAKAI PLSS--	-----ESDNRSQRNVSG--				
Q7N9P8_PHOLL	I-PP	IAKVGADERLVLKI--LR-IGGV--L	PKD--R-ESLFFLNHLML PSEN--	-----QLPVSRDGSG--				
Q7N9P9_PHOLL	L-PP	LRMEGNSLNVMRV--IR-TGGD--L	PKD--R-ESLFRFRINAI PAKKTLD--	-----ESKANGKPGEIGA--				
Q7N9Q2_PHOLL	T-PP	LRDPKGTNVLHI--LG-DTSK--LPTD--	R-ESVYFNAAI PSSK--	-----PSGQRLEGDKIAG--				
Q7NYH9_CHRVO	M-PP	LRVDPKAGQTLRL-T-FT--GAD--L	PKD--R-ESVFWLNVLD MPPLP--	-----KAASEQ--RN--				
Q7W62_BORBR	T-PP	LRVDPKAGQTLRI-F-FN--GYD	DKTLPD--R-ESVFWLNVLE VPPKA--	-----TPEEG--HG--				
Q83Q20_SHIFL	T-PP	LRLEASDDSSLRI-I-KT--ADN--L	PEN--K-ESLFYINVRAI PAKK--	-----KSDDVN--AN--				
Q846B1_ECOLX	T-PL	LRVPESSVFSVRV--MK-TGS--P	DEH--K-ETLYWIVSN SLPGGD--	-----KTELKSHDDKITA--				
Q846R3_MYXXA	F-PS	MLTLEPESRPIRV--GSS--SAP	QD--T-ERSFRIVVEEL PP--	-----LQPSTPTT--				
Q84IF7_EDWTA	V-PP	LRKDAQKSAILRF-I-YS--GQG--L	PQD--Q-ETLLWNVQEI PPTP--	-----KQ-----EN--				
Q887H9_PSESM	T-PP	LRKSAGDRQVLRV-L-YQ--GAG--L	PQE--R-ESLHLVYLE VP--	-----RRQNG--VR--				
Q88LN9_PSEPK	S-PP	LRKINPNSQLLKI-I-GL--PNT--L	PHD--R-ESLFFFNQEI PQVS--	-----SDT--GN--				
Q8GFD0_PHOLU	T-PP	LRKMSKSEHQIRV-S-YI--GNH--L	PAD--R-ESIFLLNVNAI PAVE--	-----KND-----NS--				
Q8X5C5_ECO57	L-PP	LRLAARRTQGLRI--IY-NHDP--L	PQD--R-ESAFWNLVEM PET--	-----PH-QDPT--				
Q8X5K6_ECO57	T-PP	LRKLDPEKNNILRI-V-NI--TPG--L	PQD--R-ESVYWNVKAI PSKS--	-----DDSEN--KN--				
Q8XAP6_ECO57	T-PQ	LRMEAAAGQALRL-L-YT--GNN--L	PQD--R-ESVFWFSQ LPLYLN--	-----KNDKS--QN--				
Q8XAX5_ECO57	T-PP	LRSMQKKEKENTLRI-INAT--NHQ--L	PGD--R-ESLFWNVKAI PAME--	-----KDQKN--EN--				
Q8XCP6_ECO57	L-PP	LRIDSMNGQVQV--QG--MPDI--N	KLPAD--R-ESVYFNVREI PPKS--	-----N--KPN--				
Q8XCT5_ECO57	T-PP	LRVSEPKSENTLRI-I-YT--GPP--L	AAD--R-ESLFWNVKTI PSVD--	-----KNALNG--RN--				
Q8XPY7_RALSO	S-PP	LRVQISGEGEQLVRV--VL-TQPA--	AGN--D-EQTYRLLI DELPE--	-----RRPQAQT--				
Q8XVY1_RALSO	T-PP	LRFTLAPGATQVIRV--GL-RHPP--	ADD--G-EVSYRFLR REVPP--	-----PPKPGFA--				
Q8Z2Q0_SALTI	I-PP	LRLEPSQEKVLRV-I-KT--AGE--L	PKD--R-ESVFWNVKNI PPSS--	-----KNKD--SS--				
Q8Z454_SALTI	L-PP	LRVRIEPKSDGQVQV--QP--L	PAA-AGLPQD--R-ESLFFNVREI PPKS--	-----D--KPN--				
Q8Z5C5_SALTI	T-PP	LRVAAESGQKI-K-KM--PNS--L	PDN--K-ESLFLNVLDI PPNS--	-----QENAG--KN--				
Q8Z930_SALTI	L-PP	LRVFKMQPGELRTLRL--LLSSRQ--	LATD--R-ESLFWLNIIQI PPVT--	-----QDIKNHPR--				
Q8ZRI0_SALTY	T-PP	LRVRIQPKAGQVVRV-I-YN--NT	KK--L-PQD--R-ESVFWNVLQ VPPTN--	-----IGSDG--QN--				
Q8ZRK3_SALTY	M-PP	LRLEANQSQLRI--VR-TGGD--M	PTD--R-ETLQWVCIKAV PPP--E--	-----NEPSTQAKGATL--				
Q933K1_9PAST	T-PP	LRVVEAKSQSLRI-T-FT--GGEP--	L-PDD--R-ESLFFNLDI PPKP--	-----DAEFLAKHGS--				
Q937J4_ECOLX	Q-PP	LRVFKVGAKQKQIRI-I-NT--DSN--	L-PPK--R-ESLFWNVQEV PPPK--	-----EVKDS--EG--				
Q985D6_RHILO	S-PP	LRVAKLPGADYLVRV--VR-VSKS--	AVA--G-EESYRVI DELPD--	-----PSRKKAG--				
Q9RH98_SALTM	T-PP	LRVMSARQENSMRV--VY-TGAP--	L-PAD--R-ESLFTLSIAI PSGK--	-----P--EAN--				
YHCA_ECOLI	T-QP	LRVVEAGQVQVRF--LL-QATV--	PLQ--S-EELKRVTFEGI PPKD--	-----D--KSS--				

A8AFU5_CITK8	170	180	170	180
A8AIY3_CITK8	TLQIAVKTRIKLIYR-P	---ALLS	A0A507_EDWIC	KTIINSSYNIAAVAR-P
A8AL42_CITK8	TLQIAINTRIKLLYR-P	---SSVK	A0KFM9_AERHH	VMQIAVQSKIKLFYR-P
A8ALX4_CITK8	KVKVVSQNLPIIH-P	---SGLD	A1A7I6_ECOK1	LLQLAFTRIKLFYR-P
A8AP82_CITK8	KVFNLRQDLPLIR-P	---KNLP	A1JTK4_YERE8	QVAMAMNTQMKIFYR-P
A8AP85_CITK8	SLLIMLRNRVKLFYR-P	---AELN	A1RPW4_SHESW	LLIIVALRTQMKVFYR-P
A8APK7_CITK8	KLVLPLIRIMKVFIR-P	---QGVG	A1V426_BURMS	ALQIALHTQMKLFYR-P
A8APL4_CITK8	VLMLATAIRIKLFVIR-P	---DGLL	A2I2U0_SALTM	NVNVVTNSCIKIYR-P
A8ARQ0_CITK8	ELLIAVKSMMKLFYR-P	---AGLK	A3L5P1_PSEAI	TLQIALRQRIKVFYR-P
A8ARQ3_CITK8	ALQVAFRTRVKLFWR-P	---TALA	A3LFH6_PSEAI	ALQFSFRSRFKLFFR-P
A8GEG8_SERP5	HMQLAFRTRIKLFYR-P	---DNLQ	A3NFM6_BURP6	LLQLAFTRIKLFFR-P
A8GJF8_SERP5	EVRMTVRQNLPLIR-P	---AGLA	A3NVJ3_BURP0	TLKIAVLTTRIKLFYR-P
A9ALF9_BURM1	TLQLAVKSRIKLFYR-P	---KDLQ	A4W7S1_ENT38	-----NKMQGMNN-PPSDQTL
A9CH21_AGR75	VVAIRVRQNLPIVIMH-P	---KGLA	A4WBN8_ENT38	VLRLIYKTRLKLFWR-P
B1IRR9_ECOC	SLALAFRTRIKLIYR-P	---KGLP	A4Y251_SHEPC	VLILTMRTQMKLLR-P
B1J4Y3_PSEPW	TVNLVVRHSIPVFFS-P	---ASTG	A5W6W1_PSEP1	TLQFAVRQRLKLFYR-P
B1YQ84_BUR44	VMQVTMQHALKLFWR-P	---KAIE	A5WGG7_PSYWF	FLQAIARSLKFFYR-P
B2T9W8_BURPP	QLNIALRTRIKLFLYR-P	---AQVQ	A5XNC2_BURML	GIAIRLRSIPVFV-P
B4SQ28_STRM5	ALRLAYRLRMKLLYR-P	---PGLD	A6AJW3_VIBHA	RIVLPLRLKLVFVR-P
B8E3T6_SHEB2	HLQVAFRSRIKVFVR-P	---KGLA	A6AJW6_VIBHA	KLVTVKHKVKLFYR-P
CLPE_ECOCX	TLSLAYRTRIKVFVR-P	---ASLP	A6AMM6_VIBHA	SIIAIESVIKFFYR-P
FANE_ECOCX	GMQFVLRYSIPVFVQ-P	---EGKP	A6BWZ4_YERPE	FVTALARMQYKVFYR-P
O68439_PHOLE	KMVLMLKNRIKVFYR-P	---VEMP	A6DOK0_9VIBR	DVIASLDMHYKLFIR-P
P72210_PROMI	GIAVAVRTKLFYR-P	---KALI	A6T558_KLEP7	TLQLAIKRLKFIYR-P
PSAB_YERPS	SLSLAINNVRKLIYR-P	---IALK	A6T5S1_KLEP7	YLQLAIRSRIKLFYR-P
Q02GH2_PSEAB	IIVVAINTKVKLIYR-P	---DNL	A6T932_KLEP7	ILQFAIKNQLKIYR-P
Q02LR9_PSEAB	TLQIAIQSRIKLFYR-P	---SGLS	A6TCS0_KLEP7	ILQFAIRTRKLFYR-P
Q02SP9_PSEAB	DIQMSISTCIKLLFR-P	---DKVK	A6TCS4_KLEP7	KLQVNIKSFKIFYR-P
Q00AAK4_ALHEH	RLTTLRTQMKVIYR-P	---RPLA	A6TDK5_KLEP7	VLQLAIRSRFKFIYR-P
Q00B8E7_BURCM	QMLLMLRNRLKLFYR-P	---AGIQ	A6TDX7_KLEP7	SLTLAMQNLLKLFYR-P
Q00BF38_BURCM	LLLVSYRLRMKLLFR-P	---QGLA	A6TDX8_KLEP7	RISVGIQSVIKLFYR-P
Q00FFL3_9RHOB	RLQILRLGVPLFVA-P	---EGGE	A6TDY1_KLEP7	SLQVSTATVVKLFYR-P
Q00HI09_SHESM	RIQLAFRSRIKLMYR-P	---AGLA	A6TGZ3_KLEP7	VVQFAINSKIKIYR-P
Q00HR81_SHESR	EIQTIIRQNLPLIQ-P	---QDLA	A6TH61_KLEP7	TIQLAVRHRMRLVYR-P
Q00SH7_SHIF8	GTRMLMRVSI PVFVL-P	---ELTA	A7FIQ9_YERP3	KLVLIVNNRLKVFVR-P
Q00T695_SHIF8	KLQLAFKTKIKLFFR-P	---TSLD	A7FNA7_YERP3	AAVMPIRQEIQFLIQ-P
Q00TB96_ECOC	SLQIAVTKTIKLIYR-P	---ENIS	A7ME56_CROS8	TLKLVVKTTRKLFYR-P
Q00TC33_ECOC	NIQVNVHTCIKLIYR-P	---SGIE	A7MPA3_CROS8	ALAVAMNQRMKLFYR-P
	TLKIAATQSVIKLFWR-P	---KGLA	A7MQC6_CROS8	RMVLAINNRIKFFYR-P
	KISLAYRFKVIYR-P	---AALD	A7ZGQ2_ECO24	KLNVSINTCIKILR-P
	TLQLALQNKIKLFYR-P	---ENLP	A7ZXX8_ECOHS	VLQVAIQSRIKVFWR-P

Q7N502_PHOLL	170	180	Q0VTH1_ALCBS	170	180
Q7N8D9_PHOLL	QLQITVKS	KFKLFYR	TLQFAQR	IRIKLFYR	P-----DALN
Q7N8E0_PHOLL	QASMSV	GMRIKFF	SINISIR	GCIKLYR	P-----ASVP
Q7N9P8_PHOLL	GIQFAI	ANTIKLM	FVQFAI	NNCKLLV	R-----NELK
Q7N9P9_PHOLL	KMKMVT	ALAVKLF	AVQIAFR	SRKLFYR	P-----ESII
Q7N9Q2_PHOLL	SLSIAL	GMNIKL	RLQAFR	TRVKLFYR	P-----AGIP
Q7NYH9_CHRVO	GVVYAI	GNTKLF	QMLVML	RNRKILYR	P-----TDIE
Q7WI62_BORBR	FMQVAF	RRSRKLF	LVTVMR	TQIKVFVR	P-----RKLP
Q83Q20_SHIFL	VLQLTIR	SRKLFYR	SLQFAFR	SRKLFYR	P-----TGLP
Q846B1_ECOLX	ELTLVF	KTRVKMF	YLQLAIR	SRKFFFR	P-----AHLK
Q846R3_MYXXA	KMNLAY	RFKVPMF	QLQFAM	RKIKLIAR	P-----ANLV
Q84IF7_EDWTA	GLNVLTR	ISVVFVA	IQIADSR	IKLFYR	P-----HKFK
Q887H9_PSESM	VLQVAV	TRIKLFYR	RITLALK	TRVKLIYR	P-----KTL
Q88LN9_PSEPK	QLNIAVR	RQRINVF	FMQVAL	QTRVKLIYR	P-----SSLQ
Q8GFD0_PHOLU	QLNIAL	RTRIKLFYR	KLVMAI	ATQVKLIYR	P-----EGIS
Q8X5C5_ECO57	KMIITIK	NIKL IYR	SLTLAT	RTRIKLFYR	P-----TAIK
Q8X5K6_ECO57	HLTLAM	NTQLKIF	TLQAVR	RQRKVFYR	P-----AGLP
Q8XAP6_ECO57	VLQIAV	RTRIKLFYR	YLQLAF	RSR KVFYR	P-----SKLK
Q8XAX5_ECO57	QLIALA	TNRVKIF	KKDLSM	QLTVNLIW	P-----GIV
Q8XCP6_ECO57	TLQLAI	SRKMFYR	RLEAFR	TRIKIFFR	P-----QTLT
Q8XCT5_ECO57	TLQIAL	QTRIKLF	KLSLAY	RYKVPMIYR	P-----KSL
Q8XPY7_RALSO	VLQLAI	LSRMKLF	AINMAV	NTCEKILYR	P-----SGLK
Q8XVY1_RALSO	GVTMQL	RYSPVFN	TLQIAI	RQRKVFYR	P-----DGLQ
Q8Z2Q0_SALTI	GLEIAI	KTRIKLF	VLQIAL	QTKIKLFYR	P-----AAIK
Q8Z454_SALTI	TLQALQ	TRIKFFYR	LLRLAS	RRMKLLYR	P-----QGLS
Q8Z5C5_SALTI	VLKFAM	QNRKLIWR	VLQFAF	RTRIKIFFR	P-----DNL I
Q8Z930_SALTI	KLVLPL	RLRLKIL	GMQFV	LRYSVPIFVL	P-----PGIA
Q8ZRI0_SALTY	KMLVML	RSR KLFYR	VLQLAM	QSQLKLFYR	P-----KAI I
Q8ZRK3_SALTY	DLNLSI	NACDKL	SLQIAT	QSVIKLFI	R-----KNLA
Q933K1_9PAST	FMQIAI	RSRLKLFYR	QLQLAF	RTRIKLFYR	P-----DGLK
Q937J4_ECOLX	VLAIAM	NSRVKLIYR	QLQVAV	RNRMKIFYR	P-----ETLS
Q985D6_RHILO	TVSLVL	RYSPVFFR	GVQIAL	RLSLPLLVQ	P-----ATPA
Q99RH98_SALTM	RVQMAF	RSALKLLYR	VVQIAI	QNRKLFYR	P-----MAIK
YHCA_ECOLI	RVTVS	IRQDL	KMQLAF	RTRIKMFYR	P-----EGLT
			VLQIAI	QSEIKVFYR	P-----RSVK
			QLDLS	IQTLKVFYR	P-----AKIL
			MLVLL	VKSRKVFYR	P-----KTI I
			ILTFN	VRSRKLFYR	P-----TGLK
			NVQLS	VSSCIKLFYR	P-----PAVK
			SLQLA	LQTRKVFYR	P-----KQLK