



Rozprawa doktorska

**Badanie oddziaływań kanałotwórczego białka DraC z białkiem opiekuńczym DraB i adhezyną DraE w biogenezie fimbrii Dr uropatogennych szczepów *Escherichia coli***

mgr inż. Marta Kur

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Mikrobiologii

Promotor:

prof. dr hab. Józef Wojciech Kur

Gdańsk 2009

*Pracę dedykuję Rodzicom, Krzyskowi i Kubusiowi.*

*Dziękuję wszystkim,  
którzy przyczynili się do powstania  
niniejszej pracy.*

# SPIS TREŚCI

## Spis treści

<b>1. STRESZCZENIE</b> .....	7
<b>2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA</b> .....	10
2.1. Wprowadzenie .....	10
2.2. Struktury adhezyjne uropatogennych szczepów <i>E. coli</i> .....	11
2.3. Biogeneza struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych na przykładzie fimbrii Dr uropatogennych szczepów <i>E. coli</i> Dr+.....	13
2.4. Białka kanałtwórcze błony zewnętrznej uropatogennych szczepów <i>E. coli</i> nie ...	17
2.5. Budowa i rola N-terminalnej domeny zewnątrz błonowych białek kanałtwórczych FUP uczestniczących w procesie biogenezy struktur adhezyjnych .....	23
2.6. Pilicydy jako potencjalne chemoterapeutyki blokujące oddziaływanie kompleksu białko opiekuńcze-podjednostka adhezyjna z białkiem „usher” .....	26
<b>3. CEL PRACY</b> .....	29
<b>4. MATERIAŁY</b> .....	30
4.1. Szczepy bakteryjne.....	30
4.2. DNA .....	33
4.3. Podłoża.....	33
4.4. Antybiotyki .....	33
4.5. Odczynniki podstawowe .....	33
4.6. Roztwory do elektroforezy agarozowej.....	34
4.7. Roztwory do elektroforezy poliakryloamidowej.....	35
4.8. Enzymy i bufory reakcyjne.....	35
4.9. Bufory i odczynniki do reakcji PCR.....	35
4.10. Odczynniki do mutagenyzy miejscowo-specyficznej .....	38
4.11. Bufory i odczynniki do techniki Western blotting.....	38
4.12. Odczynniki do izolacji frakcji fimbrialnych.....	40
4.13. Bufory i odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej .....	40
4.14. Materiały do wykonania testu hemaglutynacji .....	41
4.15. Bufory i odczynniki do izolacji białka kanałtwórczego DraC ze szczepu <i>E. coli</i> TOP10F' pACYCpBAD-sygDraC-C-His.....	41
4.16. Roztwory do izolacji białek z frakcji perioplazmatycznej.....	41
4.17. Bufory do oczyszczania białek metodą chromatografii metalopowinowactwa.....	41
4.18. Bufory dializacyjne .....	42
4.19. Materiały do badań na liniach komórkowych .....	42
4.20. Bufory i odczynniki do testu ELISA.....	42
4.21. Przygotowanie kulek fluorescencyjnych .....	43
4.22. Aparatura .....	43
<b>5. METODY</b> .....	45
5.1. Reakcje PCR .....	45
5.2. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi .....	46
5.3. Reakcje ligacji DNA .....	46
5.4. Izolacja plazmidowego DNA .....	48
5.5. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego.....	48
5.6. Elektroforeza agarozowa .....	48
5.7. Transformacja komórek <i>E. coli</i> plazmidowym DNA.....	49
5.8. Mutagenyza ukierunkowana.....	49
5.9. Ekspresja genów kodujących białka rekombinantowe w komórkach <i>E. coli</i> .....	51
5.10. Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów <i>E. coli</i> eksprymujących fimbrie Dr.....	51

## SPIS TREŚCI

5.11. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących .	52
5.12. Detekcja białek rekombinantowych metodą Western blotting .....	53
5.13. Badanie zdolności białek podjednostkowych DraE rekombinantowych szczepów <i>E. coli</i> ekspresyjnych fimbrii Dr do hemaglutynacji ludzkich erytrocytów .....	56
5.14. Ekspresja białka kanałotwórczego DraC w szczepie <i>E. coli</i> Top 10 F'/pACYCpBAD-DraC-C-His .....	56
5.15. Izolacja zewnętrznych błon komórkowych szczepu <i>E. coli</i> Top 10 F'/pACYCpBAD-DraC-C-His .....	57
5.16. Izolacja białka DraC-C-His z błon zewnętrznych komórek <i>E. coli</i> .....	58
5.17. Izolacja białek z frakcji perioplazmatycznej .....	58
5.18. Izolacja białka podjednostkowego adhezyny DraE fimbrii Dr .....	59
5.19. Oczyszczanie białek metodą chromatografii metalopowinowactwa .....	60
5.20. Dializa frakcji i zagęszczanie .....	60
5.21. Analiza domeny N-terminalnej białka DraC techniką IR .....	60
5.22. Hodowla linii komórkowej HeLa .....	61
5.23. Badanie adhezji komórek <i>E. coli</i> do komórek linii HeLa .....	61
5.24. Badanie adhezji fimbrii Dr opłaszczonych na kulkach fluorescencyjnych do komórek linii HeLa .....	62
5.25. Badanie oddziaływań między białkami z zastosowaniem mikrokalorymetrii izotermalnej .....	63
<b>6. WYNIKI</b> .....	<b>64</b>
6.1. Analiza sekwencyjna zewnątrz błonowych białek kanałotwórczych rodziny FUP ..	64
6.2. Analiza sekwencyjna N-terminalnej domeny białek rodziny FUP .....	69
6.3. Modelowanie homologiczne N-terminalnej domeny białka DraC .....	71
6.4. Konstrukcja modelu doświadczalnego do badań <i>in vivo</i> .....	74
6.5. Badanie zdolności białka DraC do biogenezy fimbrii Dr .....	78
6.5.1. Badanie powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr metodą Western blotting .....	78
6.5.2. Badanie powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr metodą mikroskopii fluorescencyjnej.	79
6.5.3. Badanie powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr metodą hemaglutynacji ludzkich erytrocytów .....	81
6.6. Zastosowanie skonstruowanego dwuplazmidowego modelu badawczego do produkcji chimerycznych fimbrii Dr .....	82
6.7. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych zawierających mutacje punktowe w genie <i>draC</i> .....	84
6.8. Badanie zdolności zmutowanych form białka DraC do biogenezy fimbrii Dr .....	86
6.8.1. Wykrywanie fimbrii Dr metodą mikroskopii immunofluorescencyjnej .....	86
6.8.2. Wykrywanie fimbrii Dr metodą Western blotting .....	87
6.8.3. Wykrywanie fimbrii Dr metodą hemaglutynacji ludzkich erytrocytów .....	89
6.8.4. Badanie adhezji rekombinantowych szczepów <i>E. coli</i> do komórek linii HeLa .....	92
6.8.5. Badanie właściwości adherentnych fimbrii Dr opłaszczonych na kulkach fluorescencyjnych do komórek linii HeLa .....	93
6.8.6. Badanie właściwości adherentnych fimbrii Dr do komórek linii HeLa metodą ELISA ..	94
6.9. Badanie struktury mutantów białka DraC .....	96
6.10. Ekspresja i oczyszczanie białka DraC-C-His do badań <i>in vitro</i> .....	97
6.11. Konstrukcja szczepu <i>E. coli</i> produkującego N-terminalną domenę białka DraC .	99
6.12. Ekspresja i oczyszczanie domeny N-terminalnej białka DraC-C-His .....	101
6.13. Badanie struktury drugorzędowej i stabilności termicznej domeny N-terminalnej białka DraC techniką spektroskopii w podczerwieni .....	104
6.14. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych zawierających mutacje punktowe w genie kodującym fuzyjne białko N-DraC-C-His .....	106
6.15. Próby otrzymywania kompleksów białko opiekuńcze DraB - podjednostka DraE107	

## SPIS TREŚCI

---

6.16. Badanie oddziaływań między białkami z zastosowaniem mikrokalorymetrii izotermalnej .....	109
<b>7. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA .....</b>	<b>110</b>
<b>8. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>117</b>
<b>9. OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....</b>	<b>122</b>
<b>10. DOROBEK NAUKOWY.....</b>	<b>123</b>

### STRESZCZENIE

Zakażenia dróg moczowych, wywoływane przez uropatogenne szczepy *E. coli*, należą do najczęściej występujących zakażeń bakteryjnych. Dlatego tak ogromnie ważne są badania dotyczące molekularnych aspektów podstaw patogenności tych szczepów, dzięki którym możliwe jest projektowanie skutecznych chemoterapeutyków.

Kluczowym etapem patogenezы wielu chorobotwórczych mikroorganizmów jest ich adhezja do powierzchni komórek gospodarza, możliwa dzięki obecności na powierzchni patogena struktur adhezyjnych, do których należą fimbrie Dr. Są one homopolimerami złożonymi z białek podjednostkowych adhezyny DraE i stanowią główny czynnik wirulencji uropatogennych szczepów *E. coli* Dr<sup>+</sup>, wywołujących przewlekłe infekcje górnych dróg moczowych. W transporcie podjednostkowych białek fimbrialnych na zewnątrz komórki bierze udział białko opiekuńcze DraB oraz białko kanałotwórcze DraC. Białko opiekuńcze DraB jest odpowiedzialne za dostarczenie adhezyny DraE do miejsca polimeryzacji fimbrii Dr, czyli do zlokalizowanego w błonie zewnętrznej białka DraC.

Białko kanałotwórcze DraC, będące przedmiotem badań pracy doktorskiej, jest najmniej poznany białkiem kodowanym przez operon *dra* uropatogennych szczepów *E. coli* Dr<sup>+</sup>. Uzyskane rezultaty dostarczyły nowych informacji, a także zweryfikowały niektóre dane dotyczące białka DraC.

Przeprowadzona porównawcza analiza sekwencyjna białek rodziny FUP, do których należy DraC, wykazała, iż białka te charakteryzują się wysokim poziomem homologii, będącym bezpośrednim efektem funkcji, jakie te białka pełnią w systemie biogenezy struktur adhezyjnych typu „chaperone – usher”. Pokazała także, iż w sekwencji i strukturze białek FUP można się doszukiwać adaptacji związanych z udziałem tych białek w biogenezie struktur adhezyjnych, w której biorą też udział białka opiekuńcze typu FGS i FGL. Podobnie jak w przypadku rodziny periplazmatycznych białek opiekuńczych również białka typu FUP można podzielić na dwie podrodziny. Podstawą tego podziału w obu przypadkach jest udział tych białek w biogenezie struktur adhezyjnych o formie homopolimeru (struktury typu FGL) lub heteropolimeru (struktury typu FGS).

## STRESZCZENIE

---

Skonstruowano szczep *E. coli*, charakteryzujący się kontrolowaną ekspresją genów kodujących białko „usher” DraC z domeną oligohistydynową na C-końcu oraz białek DraB i DraE. Szczep ten stanowił wygodny model badawczy do doświadczeń *in vivo* badania oddziaływań kompleksu białko opiekuńcze DraB-podjednostka strukturalna DraE z kanałotwórczym białkiem DraC i jego formami mutantowymi oraz wyznaczenia kluczowych reszt aminokwasowych w sekwencji białka DraC odpowiedzialnych za to oddziaływanie. Na bazie tego modelu badawczego skonstruowano 17 plazmidów zawierających różne mutacje punktowe w obrębie genu *draC* i w wyniku przeprowadzonych doświadczeń z wykorzystaniem mikroskopii immunofluorescencyjnej, techniki Western blotting, testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów oraz doświadczeń na linii komórkowej HeLa wykazano, że szczepy produkujące zmutowane formy białka DraC w miejscach Trp142/Ala, Cys64/Ala, Cys100/Ala i Phe4/Ala charakteryzują się obniżoną zdolnością do biogenezy fimbrii Dr. Pokazano ponadto użyteczność skonstruowanego modelu badawczego w produkcji różnych zewnątrzkomórkowych struktur adhezyjnych z rodziny Dr lub chimerycznych adhezyn, zawierających heterologiczne wstawki, np. determinanty antygenowe.

Zweryfikowano sekwencje nukleotydowe genów *draC* i *afaC-3* zdeponowane w bazie NCBI. Porównanie otrzymanych sekwencji *draC* i *afaC-3* wykazało 100% homologię między tymi genami.

Do badań *in vitro* oddziaływań białka DraC z pozostałymi białkami procesu biogenezy fimbrii Dr, DraB i DraE, otrzymano oczyszczone preparaty białkowe DraB, DraEdsc, DraDdsc i N-terminalnej domeny białka DraC. Mimo wielokrotnych prób nie udało się otrzymać kompleksów białka opiekuńczego DraB i podjednostki adhezyjnej DraE, a także białka DraC w wystarczającej ilości. Z powyższych powodów możliwe było tylko wykonanie badań oddziaływania domeny N-terminalnej białka DraC z poszczególnymi białkami DraB, DraEdsc i DraDdsc. Badania techniką mikrokalometrii izotermalnej wskazały na brak oddziaływań między tymi białkami, najprawdopodobniej do utworzenia funkcjonalnego kompleksu z białkiem DraC konieczne jest pierwotne utworzenie kompleksu DraB/DraE. Brak oddziaływań domeny N-terminalnej białka DraC z białkiem DraDdsc potwierdza wyniki innych badań przeprowadzanych w Katedrze



## STRESZCZENIE

---

Mikrobiologii PG, że białko inwazyjne DraD nie jest białkiem inicjującym proces polimeryzacji fimbrii Dr.

### 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

#### 2.1. Wprowadzenie

Bakteryjne zakażenia dróg moczowych, wśród których wyróżniamy m.in. zapalenie pęcherza moczowego, zapalenie gruczołu krokowego oraz odmiedniczkowe zapalenie nerek, należą do najbardziej rozpowszechnionych schorzeń infekcyjnych występujących u ludzi. Według statystyk stanowią one około 20% wszystkich zakażeń pozaszpitalnych oraz około 50% zakażeń szpitalnych [Duława, 1998]. Pomimo, iż nie stanowią zagrożenia dla życia pacjenta, są bardzo uciążliwymi infekcjami, a ponadto koszt ich leczenia w samych tylko Stanach Zjednoczonych przekracza miliard dolarów rocznie [Orłowski, 1998]. Na dolegliwości związane z chorobami układu moczowego bardziej podatne są kobiety niż mężczyźni, co związane jest z różnicą w budowie anatomicznej. Zakażenie występuje u nich 3-4 razy częściej. Szacuje się, że co druga kobieta przynajmniej raz w życiu doświadczyła infekcji dróg moczowych, u 20-40% z nich rozwijają się nawracające infekcje [Stanton i Dwyer, 2000]. Szczególnie narażone na zakażenia są kobiety w ciąży, u których infekcja prowadzi do wielu groźnych powikłań (opóźnienie rozwoju płodu, uszkodzenie nerek, przedwczesny poród).

Ponad 80% infekcji dróg moczowych powodowana jest przez uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (ang. Uropathogenic E*scherichia coli* – UPEC) [Svanborg i Godaly, 1997].

Organizm wytworzył wiele mechanizmów obronnych przed zakażeniem. Swobodny przepływ moczu powoduje splukiwanie bakterii, natomiast jego kwaśny odczyn znacznie hamuje namnażanie bakterii. Innymi czynnikami chroniącymi przed infekcją są komórki układu immunologicznego. Dodatkowo barierę ochronną stanowi złuszczenie zainfekowanych komórek nabłonkowych pęcherza moczowego. W obliczu tak silnej obrony komórkowej gospodarza, uropatogenne szczepy *E. coli*, aby przetrwać, produkują szereg czynników wirulencji, które umożliwiają im kolonizację układu moczowego. Należą do nich hemolizyny, antygeny O oraz struktury adhezyjne, występujące w różnych postaciach morfologicznych (pilie, fimbrie lub otoczki). Powierzchniowo zlokalizowane adhezyny są głównym czynnikiem zjadliwości tych bakterii, gdyż ich zdolność wiązania się do komórek nabłonkowych wyściełających drogi

moczowe jest pierwszym i zarazem decydującym etapem determinującym patogenność szczepów *E. coli*.

Przewlekłe i nawracające infekcje układu moczowego stanowią także poważny problem terapeutyczny, a możliwości opanowania tych zakażeń za pomocą antybiotyków i chemoterapeutyków, wobec narastającej oporności drobnoustrojów, są niewystarczające. Z tego powodu ogromnie ważne są badania dotyczące molekularnych mechanizmów patogenności tych drobnoustrojów, a zdobyta wiedza może być podstawą do racjonalnego projektowania nowych i skuteczniejszych chemoterapeutyków.

### **2.2. Struktury adhezyjne uropatogennych szczepów *E. coli***

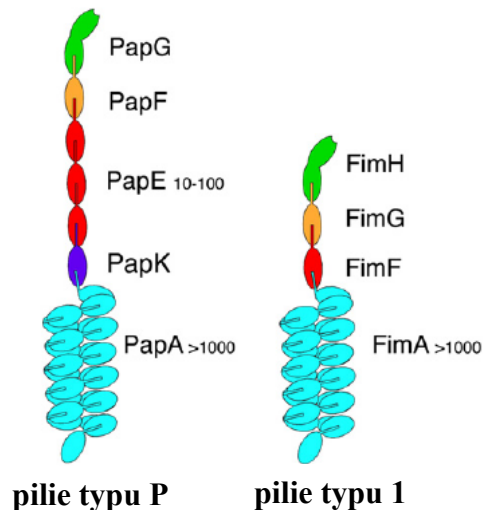
Adhezyny bakteryjne to najczęściej polimeryczne organella zlokalizowane na powierzchni komórki. Są one odpowiedzialne za kluczowy etap w patogenezie danego organizmu jakim jest wiązanie się do swoistego receptora komórek gospodarza. Ta specyficzność determinuje, który organizm i która konkretna tkanka jest zasiedlana przez bakterię [Krogfelt i wsp., 1991]. Struktury adhezyjne pomagają drobnoustrojowi przeciwstawić się siłom mechanicznym występującym w organizmie gospodarza, mającym na celu ich usuwanie z organizmu. Przytwierdzenie się bakterii do komórek gospodarza zapoczątkowuje również serię sygnałów zarówno u bakterii jak i komórek gospodarza, wpływających na rozwój infekcji. Ponadto, adhezja może indukować ekspresję nowych genów bakteryjnych istotnych dla procesu patogenezы.

Do najlepiej poznanych i najpowszechniej występujących adhezyjnych czynników wirulencji produkowanych przez uropatogenne szczepy *E. coli* należą pilie typu 1 i pilie typu P (Rys. 1). Organella te mają długość około 2  $\mu\text{m}$  i charakteryzują się podobną strukturą. Składają się z dwóch elementów strukturalnych: sztywnego helikalnego rdzenia o średnicy zewnętrznej około 7 nm, zakotwiczonego w błonie zewnętrznej bakterii oraz cienkiego, elastycznego fibryllum o średnicy zewnętrznej od 2-3 nm, znajdującego się na szczycie pili.

Struktury adhezyjne uropatogennych szczepów *E. coli* wykazują specyficzność w stosunku do receptorów występujących w różnych tkankach gospodarza. Pilie typu P rozpoznają reszty  $\alpha$ -D-galaktopyranozylo-(1-4)- $\beta$ -D-galaktopyranozydu

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

charakterystyczne dla komórek nabłonkowych górnych dróg układu moczowego [Striker i wsp., 1995], stąd bakterie wytwarzające pilie typu P powodują najczęściej ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek. Pilie typu 1 wiążą się z glikoproteinami zawierającymi mannozę, znajdującymi się między innymi w błonie komórek nabłonka pęcherza moczowego [Connel i wsp., 1996], a szczepy ekspresyjące te adhezyny są odpowiedzialne za wywoływanie infekcji tego narządu.



**Rys. 1.** Schemat budowy pilii typu P i pilii typu 1 uropatogennych szczepów *E. coli* [Rernaut i wsp., 2008].

Następną, co do częstości występowania grupą struktur adhezyjnych są adhezyny rodziny Dr, do których należą między innymi afimbrialne adhezyny Afa1 i Afa3 oraz fimbrie Dr. Nazwa rodziny adhezyn Dr związana jest ze zdolnością tych białek do rozpoznawania receptora DAF (*ang.* Decay-Accelerating Factor), będącego nośnikiem antygeny grup krwi Dr<sup>a</sup> [Carnoy i Moseley, 1997], którego naturalną funkcją jest supresja układu dopełniacza. Receptory DAF obecne są na powierzchni erytrocytów oraz różnych typów komórek nabłonkowych (układu moczowego, żołądka, jelit oraz układu oddechowego). Szczepy *E. coli* Dr<sup>+</sup> posiadają zdolność do wywoływania hemaglutynacji poprzez wiązanie receptora komórkowego DAF na powierzchni erytrocytów. Fimbrie Dr wykazują również zdolność wiązania się do kolagenu typu IV - receptora występującego w błonie podstawnej komórek kanalików nerkowych oraz torebki Bowmana [Westelund i wsp., 1989]. Ta własność powoduje, że szczepy *E. coli* Dr<sup>+</sup> po inwazji do komórek nabłonkowych są bardzo trudne do zwalczenia przez układ odpornościowy gospodarza oraz leki.

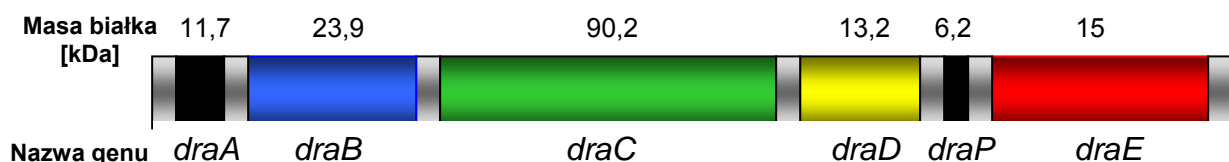
## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Bakterie *E. coli* produkujące struktury adhezyjne rodziny Dr wywołują wiele chorób, wśród których wyróżnić można odmiedniczkowe zapalenie nerek, zapalenie pęcherza moczowego, przewlekłe biegunki u dzieci i nawracające infekcje układu moczowego u młodych kobiet. Kobiety ciężarne są szczególnie narażone na zakażenia układu moczowego, gdyż w czasie ciąży następuje wzrost ekspresji receptora DAF, co chroni płód przed cytotoksycznym działaniem układu dopełniacza i jednocześnie ułatwia komórkom *E. coli* Dr+ kolonizować komórki nabłonkowe układu moczowego [Connolloy i wsp., 1999; Orłowski, 1998].

### 2.3. Biogeneza struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych na przykładzie fimbrii Dr uropatogennych szczepów *E. coli* Dr+

Do syntezy zewnątrzkomórkowych struktur adhezyjnych patogeniczne bakterie Gram-ujemne bardzo często wykorzystują silnie zakonserwowany szlak sekrecji typu białko opiekuńcze/zewnątrzkanałowe białko kanałowe (*ang.* chaperone/usher). Zakonserwowanie dotyczy zarówno organizacji genetycznej operonu kodującego białka zaangażowane w tworzenie struktur adhezyjnych, jak i sekwencji aminokwasowej oraz struktury poszczególnych białek tego szlaku. Szczególnie wysokim stopniem podobieństwa charakteryzują się periplazmatyczne białka opiekuńcze, wykazujące wysoką homologię sekwencyjną oraz strukturalną.

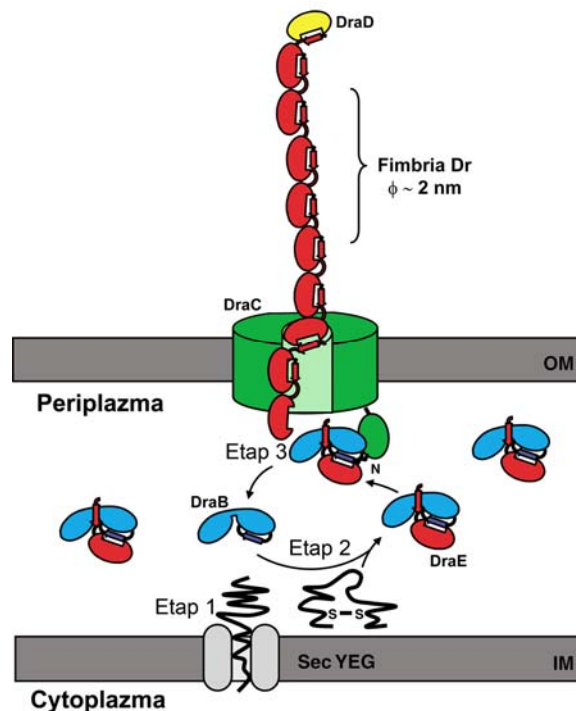
Fimbrie Dr, powstają na drodze mechanizmu biogenezy typu „chaperone-usher”. Po raz pierwszy zostały one zidentyfikowane w klinicznym szczepie *E. coli* O75:K5:H<sup>-</sup>, wywołującym odmiedniczkowe zapalenie nerek [Carnoy i wsp., 1997]. Białka konieczne do biogenezy fimbrii Dr kodowane są przez operon *dra*, składający się z sześciu genów: *draA*, *draB*, *draC*, *draD*, *draP* oraz *draE* [Nowicki i wsp., 2001] (Rys. 2).



**Rys. 2.** Organizacja genów w operonie *dra*, kodujących białka uczestniczące w biogenezie fimbrii Dr.

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Fimbrie Dr są homopolimerami o średnicy około 2 nm, zbudowanymi tylko z jednego rodzaju białka podjednostkowego DraE, pełniącego funkcję adhezyny. Najprawdopodobniej białko DraD lokalizowane jest na szczycie fimbrii Dr i wzmacnia proces inwazji komórki bakteryjnej do wnętrza komórek nabłonka dróg moczowych. Z tego powodu białko to często nazywane jest inwazyją DraD. Wykazano obecność tego białka w dużym stężeniu w otoczce komórki bakteryjnej. Funkcja białka DraD w patogenezie nadal jest niejasna. Białko DraB jest perioplazmatycznym białkiem opiekuńczym (*ang.* chaperone), które jest odpowiedzialne za poprawne fałdowanie adhezyny DraE, do postaci zdolnej do polimeryzacji [Piątek i wsp., 2005]. Białko DraC (*ang.* usher) tworzy kanał w błonie zewnętrznej bakterii, przez który odbywa się proces asocjacji kolejnych podjednostek DraE w strukturę fimbrialną. Geny *draA* i *draP* kodują białka odpowiedzialne za regulację ekspresji genów operonu *dra*. Rysunek 3 przedstawia mechanizm biogenezy fimbrii Dr proponowany na podstawie badań przeprowadzonych m. in. w Katedrze Mikrobiologii PG [Piątek i wsp., 2005].



**Rys. 3.** Schemat mechanizmu biogenezy struktur adhezyjnych typu „chaperone/usher” przedstawiony na przykładzie fimbrii Dr uropatogennych szczepów *E. coli*.

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

Proces biogenezy struktur adhezyjnych z użyciem szlaku sekrecji typu „chaperone/usher” rozpoczyna się od transportu podjednostek białkowych przez błonę wewnętrzną. Podjednostki strukturalne są produkowane w cytoplazmie jako prekursorzy białek periplazmatycznych. Prebiałka posiadają N-terminalną sekwencję sygnałną, która jest odcinana przy wejściu do periplazmy przez znajdującą się w błonie wewnętrznej peptydazę sygnałną Sec. Po przejściu do periplazmy białka podjednostkowe, dzięki posiadaniu na powierzchni licznych hydrofobowych reszt aminokwasowych, ulegają niespecyficznemu wiązaniu z periplazmatyczną częścią błony wewnętrznej. Niestabilność nowo syntetyzowanych białek DraE wynika z ich specyficznej budowy. Wszystkie białka podjednostkowe struktur fimbrialnych powstających na drodze „chaperone-usher” posiadają strukturę immunoglobulino-podobną (Ig-podobną). Oznacza to, iż podjednostka jest zbudowana z sześciu, a nie jak klasyczna struktura immunoglobulinowa z siedmiu  $\beta$ -harmonijek. Efektem takiej budowy jest występowanie w strukturze podjednostki głębokiej bruzdy tworzonej głównie przez hydrofobowe reszty aminokwasowe szóstej  $\beta$ -harmonijki, znajdującej się na C-terminalnym końcu białka. W efekcie tego podjednostki strukturalne nie są w stanie spontanicznie w trakcie procesu fałdowania uzyskać stabilnej struktury Ig (Rys. 3, Etap I).

Periplazmatyczne białko opiekuńcze DraB rozpoznaje eksponowane z błony wewnętrznej fragmenty białka podjednostkowego DraE i następnie uwalnia je do przestrzeni periplazmatycznej w postaci kompleksu DraB/DraE. Podjednostki fimbrialne, które nie zwiążą się z białkiem opiekuńczym tworzą agregaty i są degradowane przez proteazy periplazmatyczne. Obecność białka opiekuńczego DraB warunkuje uzyskanie przez podjednostki strukturalne DraE fizjologicznej struktury. Białko DraB tworząc kompleks z białkiem podjednostkowym DraE stabilizuje je, zapobiegając agregacji i proteolitycznej degradacji [Piątek i wsp., 2005]. Jednocześnie kompleks ten uniemożliwia spontaniczną, nieukierunkowaną polimeryzację podjednostek DraE przed dotarciem do miejsca polimeryzacji. Periplazmatyczne białko opiekuńcze posiada w swej strukturze  $\beta$ -harmonijkę donorową, która stabilizuje strukturę podjednostki DraE, wypełniając jej hydrofobową szczelinę i uzupełniając strukturę Ig-podobną. W rezultacie podjednostka DraE ma możliwość prawidłowego fałdowania i uzyskuje strukturę zdolną do polimeryzacji. Uzupełnianie przez białko opiekuńcze brakującej siódmej  $\beta$ -harmonijki

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

podjednostki strukturalnej nosi nazwę mechanizmu komplementacji nici donorowej (Rys. 3, Etap II).

Kompleks podjednostka strukturalna DraE-białko opiekuńcze DraB jest transportowany do zlokalizowanego w błonie zewnętrznej białka kanałotwórczego DraC, poprzez który odbywa się proces liniowej asocjacji podjednostek DraE w funkcjonalną fimbrię. Ze względu na funkcję białka DraC przyjęła się dla niego angielska nazwa – „usher”. Tam nić donorowa białka opiekuńczego jest wymieniana na  $\beta$ -harmonijkę donorową nowej podjednostki w procesie zwanym mechanizmem wymiany nici donorowej, czemu towarzyszy dysocjacja białka opiekuńczego [Sauer i wsp., 1999]. W efekcie struktura Ig podjednostki fimbrialnej zostaje uzupełniona przez N-terminalną sekwencję pochodzącą z innej podjednostki, pełniąc dokładnie tą samą funkcję, co donorowa  $\beta$ -harmonijka białka opiekuńczego. Następuje polimeryzacja podjednostek białkowych w funkcjonalny zewnątrzkomórkowy polimer i ich sekrecja na zewnątrz komórki bakteryjnej. Proces polimeryzacji podjednostek adhezyny na drodze „chaperone-usher” odbywa się w układzie „głowa do ogona”. Taki typ oddziaływań polega na wiązaniu się N-końcowej sekwencji (nici donorowej) jednej podjednostki (głowa) do C-terminalnej szczeliny akceptorowej drugiej podjednostki (ogon). Tworzenie się fimbrii nie wymaga nakładu energii z zewnątrz. Siłą napędową polimeryzacji jest występowanie w kompleksie białko opiekuńcze-podjednostka pewnych napięć konformacyjnych, gdzie podjednostka adhezyny znajduje się w stanie wysokoenergetycznym. W wyniku reakcji wymiany nici następuje stabilizacja białka DraE, a uwolniona energia zostaje wykorzystana w procesie wydłużania się fimbrii (Rys. 3, Etap III).

Białko DraD, podobnie jak białko DraE, posiada strukturę Ig-podobną z charakterystyczną szczeliną akceptorową. Jednak w przeciwieństwie do adhezyny DraE, nie posiada sekwencji odpowiadającej N-terminalnej nici donorowej [Jędrzejczak i wsp., 2006]. W sekrecji białka DraD na powierzchnię komórek uropatogennych szczepów *E. coli* nie bierze udziału białko DraC. Inwazyjna DraD ulega sekrecji przez błonę zewnętrzną za pomocą szlaku sekrecji typu II z udziałem białka GspD [Zalewska-Piątek i wsp., 2008]. Dokowanie DraD na szczycie fimbrii najprawdopodobniej następuje dopiero na powierzchni komórki przy odpowiednio dużym jego stężeniu w otocze.



## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

Zaobserwowano, iż istnieje zależność między morfologią struktur adhezyjnych, a budową białek opiekuńczych uczestniczących w ich powstawaniu. Całą rodzinę białek opiekuńczych można podzielić na dwie podrodziny. Podział ten opiera się na różnicy w długości pętli aminokwasowej łączącej  $\beta$ -harmonijki F1 i G1 w domenie N-terminalnej. Prawdopodobnie duże wahania w długości pętli F1-G1 w różnych białkach opiekuńczych związane są z ich specyficznością do podjednostek piliowych, budujących różne układy adhezyjne. Na podstawie tej długości, periplazmatyczne białka opiekuńcze można podzielić na dwie podrodziny: podrodzinę FGS (*ang.* F1-G1 short) obejmującą białka posiadające pętlę o długości od 10 do 20 reszt aminokwasowych i podrodzinę FGL (*ang.* F1-G1 long) grupującą białka posiadające w swej strukturze pętlę o długości od 21 do 29 reszt aminokwasowych. W biogenezie heteropolimerycznych struktur adhezyjnych o morfologii pili (np.: pile typu P i 1) biorą udział białka opiekuńcze typu FGS (np.: PapD, FimC), natomiast w biogenezie struktur homopolimerycznych o morfologii cienkich fimbrii (np.: fimbrii Dr) biorą udział białka typu FGL (np.: DraB, Caf1M) [Hung i wsp., 1996; Zavialov i wsp., 2003].

### **2.4. Białka kanałotwórcze błony zewnętrznej uropatogennych szczepów *E. coli***

Białka błonowe mają ogromne znaczenie biologiczne i spełniają bardzo ważne funkcje fizjologiczne. Z tego powodu wzbudzają one duże zainteresowanie jako cele molekularne dla szerokiego arsenału chemoterapeutyków. Prowadzone są szeroko zakrojone badania podstawowe białek błonowych nie tylko dla celów poznawczych, ale także aplikacyjnych, np. dla racjonalnego projektowania potencjalnych inhibitorów anty-bakteryjnych.

Wszystkie znane bakteryjne białka błony zewnętrznej, posiadają strukturę tzw.  $\beta$ -beczki, złożoną z parzystej liczby anty-równoległych, transmembranowych  $\beta$ -harmonijek, nachylonych do błony pod kątem  $45^\circ$  (Rys. 4). Budowa ta odróżnia je od bakteryjnych białek błony wewnętrznej zbudowanych głównie z transmembranowych  $\alpha$ -helis. C- i N-terminalne fragmenty białek zewnątrz błonowych znajdują się w periplazmie. Połączenia między  $\beta$ -harmonijkami w periplazmie są zdecydowanie krótsze od pętli łączących nici skierowane na zewnątrz  $\beta$ -beczki. Zewnętrzną powierzchnię  $\beta$ -beczki, stykającą się z

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

niepolarnym wnętrzem membrany, tworzą alifatyczne łańcuchy boczne oraz aromatyczne reszty aminokwasowe, immobilizujące białka tego typu w strukturze błony komórkowej.

Białka kanałowe błony zewnętrznej reprezentują jeden z najważniejszych, lecz najmniej poznanych elementów „maszyny” szlaku sekrecji typu „chaperone/usher”. Białka te należą do rodziny białek FUP (*ang.* Fimbrial Usher Proteins). Jednymi z lepiej poznanych białek kanałowych tego szlaku są białka FimD i PapC, determinujące powierzchniową ekspresję odpowiednio heteropolimerycznych pili typu 1 i typu P. Białko DraC jest homologiem wymienionych białek, a ponieważ na jego temat wiadomo jak dotąd niewiele, aktualny stan wiedzy na temat białka „usher” omówiony zostanie na przykładzie białek FimD i PapC.



**Rys. 4.** Schemat przedstawiający typową strukturę  $\beta$ -beczki błonowej z uwidocznieniem długich eksponowanych powierzchniowo pętli (szare).  $\beta$ -harmonijki zaznaczono na niebiesko, natomiast na żółto zaznaczono alifatyczną wstęgę i dwie obręcze z aromatycznych łańcuchów bocznych, stykających się z wnętrzem membrany [Schulz, 2000].

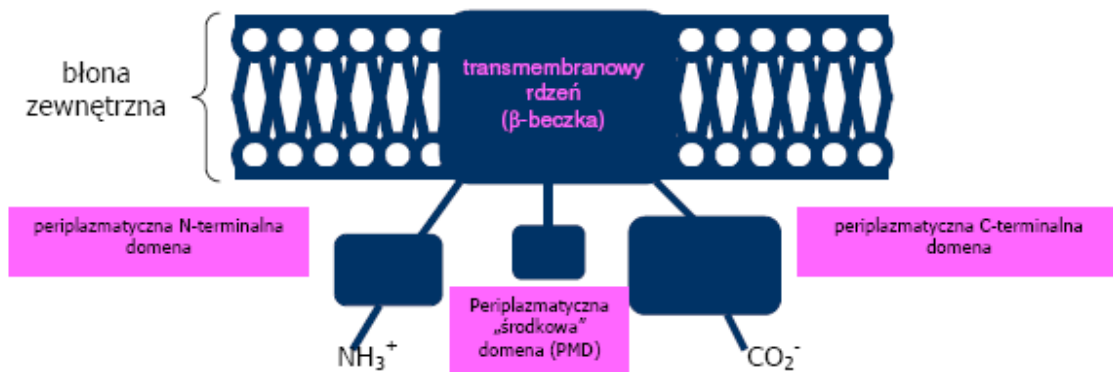
Kanałotwórcze białka błony zewnętrznej uropatogennych szczepów *E. coli*, poprzez które odbywa się proces asocjacji podjednostek adhezyjnych, są zbudowane z ponad 800 (FimD-831, PapC-809) reszt aminokwasowych, a ich masa cząsteczkowa przekracza 80 kDa. Badania drugorzędowej struktury białka PapC z użyciem dichroizmu kołowego potwierdziły, że białko to jest w większości złożone ze struktur  $\beta$  (40%). Analiza strukturalna wykazała obecność krótkich pętli eksponowanych powierzchniowo i

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

dużych pętli periplazmatycznych [Thanassi i wsp., 2002]. Jest to wyjątek, jeżeli chodzi o zewnątrz błonowe białka kanałowe, które z reguły posiadają znaczne objętościowo zewnątrzkomórkowe pętle. Cechą charakterystyczną wszystkich białek z rodziny FUP jest obecność czterech zakonserwowanych reszt cysteiny: jedna para w N-terminalnym i jedna w C-terminalnym periplazmatycznym fragmencie białka. Reszty te tworzą 2 mostki disiarczkowe, które stabilizują terminalne domeny białka.

Mikrofotografie uzyskane przy pomocy mikroskopii elektronowej wykazały, że białko „usher” występuje w błonie lipidowej w postaci dimeru [Li i wsp., 2004, Remaut i wsp., 2008]. Prawdopodobnie za sekrecję pilii jest odpowiedzialny kanał o średnicy 2 nm, znajdujący się w każdym z monomerów białka „usher”. Zakłada się, że dimeryczne białko pozwala na jednoczesne wiązanie dwóch kompleksów białko opiekuńcze–podjednostka, powodując ukierunkowanie kompleksów do łatwiejszej wymiany nici pomiędzy podjednostkami, jednak sekrecja struktur adhezyjnych na zewnątrz komórki bakteryjnej odbywa się tylko poprzez jeden z kanałów, podczas gdy drugi pozostaje zamknięty [Remaut i wsp., 2008].

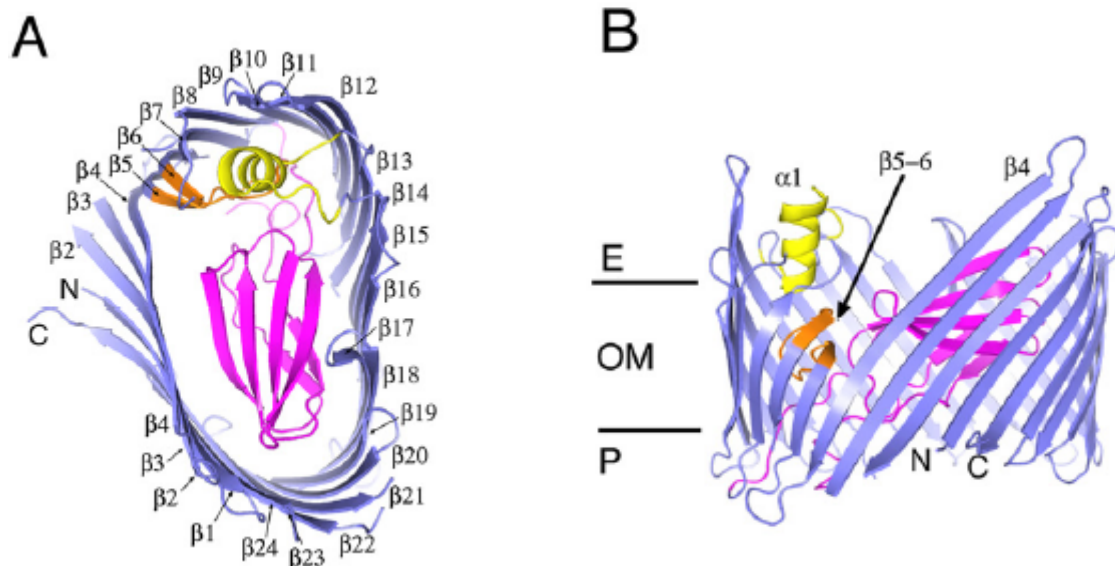
W białku „usher” wyróżnić można cztery domeny: dwie domeny periplazmatyczne (N- i C-terminalna), centralną transmembranową domenę przybierającą postać  $\beta$ -beczki, oraz domenę środkową [Capitani i wsp., 2006, Thanassi i wsp., 2002, Nishiyama i wsp., 2003, Yu i wsp., 2009] (Rys. 5).



**Rys. 5.** Poglądowy schemat ilustrujący trzeciorzędową strukturę zewnątrz błonowych białek kanałotwórczych typu FUP.

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Domena N-terminalna (złożona z pierwszych 125 reszt aminokwasowych) jest odpowiedzialna za rozpoznanie i wiązanie kompleksów białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna [Nishiyama i wsp., 2005]. Znana jest struktura krystaliczna tej domeny w kompleksie z adhezyzną FimF i białkiem opiekuńczym FimC. Struktura domeny C-terminalnej (około 150 reszt aminokwasowych) jest wciąż nierozwiązana. Ostatnie badania doprowadziły do uzyskania struktury krystalicznej transmembranowej domeny białka PapC (reszty aminokwasowe od 130 do 640) [Remaut i wsp., 2008]. Domena ta ma budowę  $\beta$ -beczki złożonej z 24  $\beta$ -harmonijek i tworzy w błonie zewnętrznej kanał, zamykany przez małą domenę środkową (reszty aminokwasowe 257 do 332) (Rys. 6). Domena środkowa (zbudowana z 6  $\beta$ -harmonijek) osłania kanał translokacyjny białka „usher”, zapobiegając przedostawaniu się białek periplazmatycznych przez nieaktywny kanał. Domena ta, zakotwiczona jest w miejscu poprzez  $\beta$ -spinkę (5 i 6  $\beta$ -harmonijka), która również znajduje się w świetle kanału. Część  $\beta$ -spinki jest związana poprzez  $\alpha$ -helisę (helisa  $\alpha 1$ , reszty aminokwasowe 448-465). Szereg oddziaływań hydrofobowych z wewnętrzną powierzchnią  $\beta$ -beczki oraz helisą  $\alpha 1$  utrzymuje  $\beta$ -spinkę w świetle kanału. Natomiast sieć oddziaływań elektrostatycznych, tworzonych przez  $\beta$ -spinkę, pomaga w ułożeniu domeny środkowej wewnątrz kanału translokacyjnego.



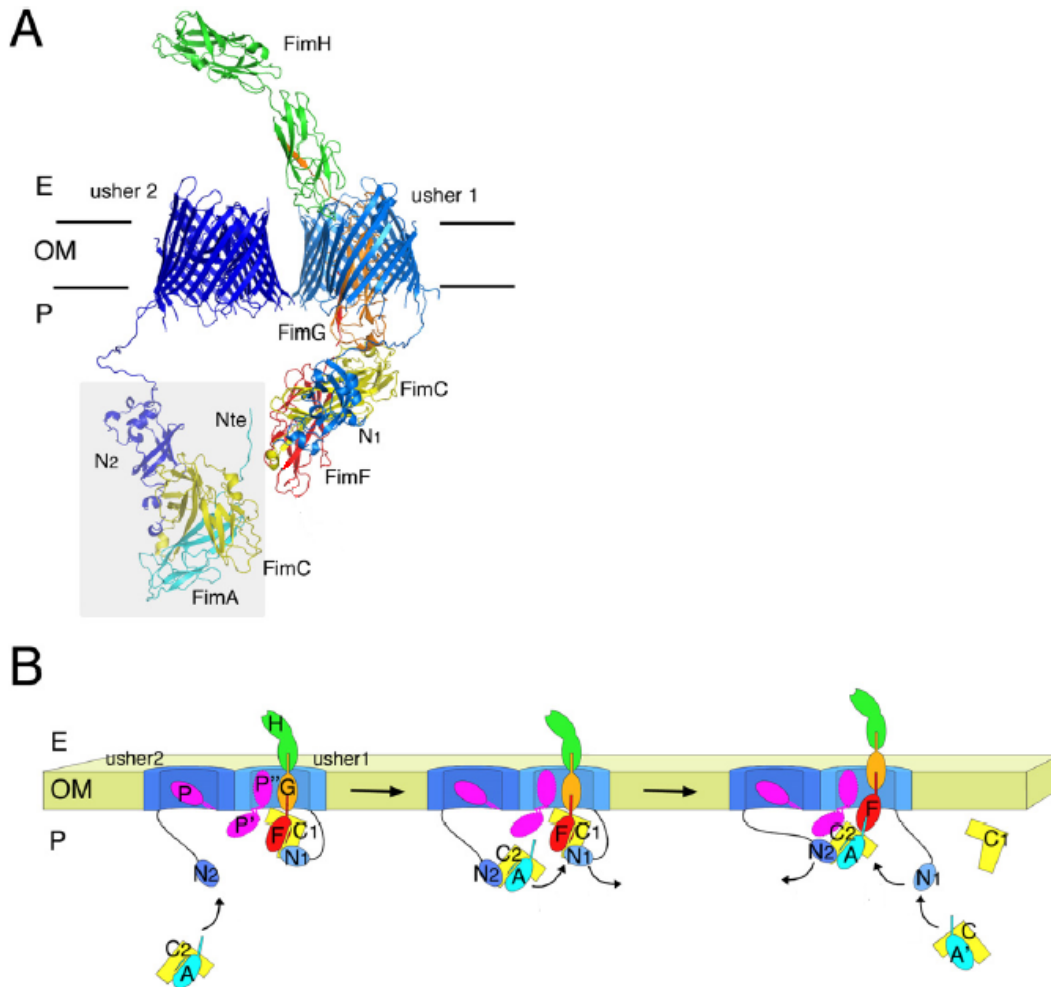
**Rys. 6.** Model struktury krystalicznej domeny transmembranowej białka PapC widziany z zewnątrz (A) i z boku (B). Na niebiesko zaznaczono  $\beta$ -beczkę, na fioletowo domenę środkową, na pomarańczowo  $\beta$ -spinkę, natomiast na żółto  $\alpha$ -helisę [Remaut i wsp., 2008].

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

Aktualny stan wiedzy pozwala zaproponować najbardziej prawdopodobny model formowania się struktur adhezyjnych. Jest on oparty na dwóch białkach kanałowych błony zewnętrznej, współpracujących podczas polimeryzacji pili poprzez ciągłe wiązanie nowych kompleksów białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna za pomocą domeny N-terminalnej białka „usher”. Hipotetyczny model formowania się pili ilustruje rysunek 7.

Kiedy białko „usher” jest w stanie nieaktywnym (nie jest połączone z kompleksem), kanał translokacyjny jest zamknięty przez domenę środkową. Przyłączenie kompleksu białko opiekuńcze-podjednostka aktywuje białko „usher”, co wiąże się z odblokowaniem światła kanału. Domena środkowa przesuwana się do periplazmy lub następuje rotacja domeny wewnątrz kanału. W obu przypadkach powstaje luka wewnątrz kanału translokacyjnego o wymiarach  $37\text{\AA} \times 25\text{\AA}$  lub  $27\text{\AA} \times 25\text{\AA}$ . Kiedy do N-terminalnych domen obu białek „usher” przyłączone są kompleksy białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna, fragment łączący N-terminalną i transmembranową domenę białka „usher2” (region zawiasowy) pozwala na reorientację kompleksu w sposób umożliwiający umiejscowienie nici donorowej (Nte) nowo związanej podjednostki FimA w pobliżu miejsca inicjacji, tzw. kieszeni wiążącej, wcześniej związanej kompleksu FimC-FimF. Następuje wymiana nici donorowej i dysocjacja białka opiekuńczego FimC1. Po jego uwolnieniu, wolna podjednostka wchodzi do kanału translokacyjnego, a domena N-terminalna białka „usher1” jest gotowa do związania nowego kompleksu FimC-FimA' i przeniesienia go do kompleksu FimC-FimA, związanego z domeną N-terminalną białka „usher2”. Wymiana nici donorowej powoduje uwolnienie domeny  $N_2$  i rozpoczyna się kolejny cykl wydłużania się pili.



**Rys. 7.** Hipotetyczny model formowania się pili. Na granatowo i niebiesko zaznaczono  $\beta$ -beczki białek „usher” i ich domeny N-terminalne ( $N_2$  i  $N_1$ ), na żółto białko opiekuńcze FimC, na błękitno podjednostkę strukturalną FimA, na pomarańczowo FimG, na czerwono FimF, a na zielono adhezynę FimH. Na rysunku 7B kolorem różowym oznaczono domenę środkową, gdzie P’ oznacza sytuację, gdy domena przesuwa się do periplazmy, a P” gdy przemieszcza się w świetle kanału [Remaut i wsp., 2008].

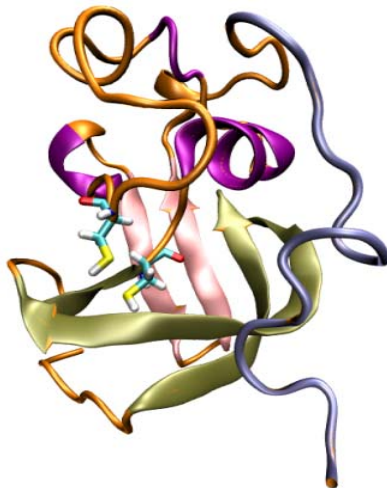
Jak już wspomniano wcześniej, mało jest wiadomo na temat roli C-terminalnej domeny białka „usher”. Wcześniej sugerowano, że domena ta jest zaangażowana w aktywację białka kanałotwórczego [So i Thanassi, 2006]. Jednak dziś wiadomo, że zmiany konformacyjne prowadzące do aktywacji białka „usher” zależą od obecności konkretnej domeny adhezyny FimH [Munera i wsp., 2007, Munera i wsp., 2008]. Przypuszcza się, że domena C-terminalna białka „usher” w stanie nieaktywnym jest zlokalizowana w pobliżu domeny środkowej. Kiedy kompleks białko opiekuńcze-

podjednostka strukturalna przyłącza się do domeny N-terminalnej następują specyficzne oddziaływania między domeną C-terminalną a podjednostką, powodujące zmiany konformacyjne w domenie środkowej powodujące otwarcie kanału.

### **2.5. Budowa i rola N-terminalnej domeny zewnątrzblonowych białek kanałotwórczych FUP uczestniczących w procesie biogenezy struktur adhezyjnych**

Domena N-terminalna białka „usher” stanowi swoiste miejsce rozpoznania dla kompleksu białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna. Ekspresja FimD<sub>N</sub> z sekwencją sygnałną, a następnie izolacja tego fragmentu białka z periplazmy *E. coli*, potwierdziła, że domena ta jest wysoce rozpuszczalnym monomerem [Nishiyama i wsp., 2003].

Więcej informacji na temat funkcjonowania N-terminalnej domeny białka FimD w szlaku biogenezy pili typu 1 dostarczyły badania jej struktury [Nishiyama i wsp., 2005] (Rys. 8). Struktura NMR potwierdziła, iż jest to samo składająca się domena periplazmatyczna, poprzedzająca domenę transmembranową. Na podstawie otrzymanej struktury okazało się, że w N-terminalnej domenie białka FimD, składającej się z pierwszych 125 reszt aminokwasowych, można wyróżnić trzy specyficzne fragmenty. Pierwszy z nich to elastyczny, ruchliwy i nieuporządkowany ogon, obejmujący pierwsze 24 reszty aminokwasowe. Reszty aminokwasowe 25-125 tworzą ustrukturyzowany rdzeń zbudowany z dwóch anty-równoległych  $\beta$ -kartek i wykazujący nieznany dotąd typ struktury.  $\beta$ -kartki są połączone przez peptyd, w którego strukturze można wyróżnić dwie  $\alpha$ -helisy ( $\alpha_1$  oraz  $\alpha_2$ ) oraz pojedynczy skręt, występujący w postaci helisy- $3_{10}$ . Mostek disiarczkowy, występujący pomiędzy cysteiną 63 oraz 90, stabilizuje strukturę FimD<sub>N</sub> [Nishiyama i wsp., 2005]. Nie jest on niezbędny do poprawnego zwinięcia się białka FimD, ale jest konieczny do biogenezy pili [Ng i wsp., 2004]. Ostatni krótki fragment, zwany regionem zawiasowym, łączy rdzeń N-terminalnej domeny z transmembranową domeną (od 126 do 139 reszty aminokwasowej) i przyjmuje specyficzną, uporządkowaną konformację.

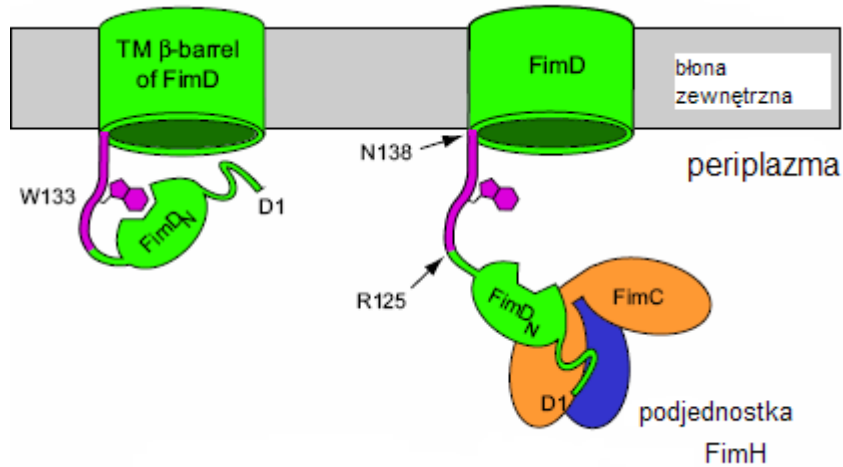


**Rys. 8.** Model struktury NMR N-terminalnej domeny białka FimD. Oznaczenia:  $\alpha$ -helisy (kolor purpurowy),  $\beta$ -kartki (kolor różowy i oliwkowy), region zawiasowy 126-139 (kolor niebieski), cysteiny 63 i 90 tworzące mostek disiarczkowy zaznaczono modelem patyczkowym; kod PDB 1ZDV [Nishiyama i wsp., 2005].

Badania NMR kompleksu białko opiekuńcze FimC-podjednostka FimH-FimD<sub>N</sub> wykazały, że region zawiasowy przechodzi duże zmiany konformacyjne podczas wiązania kompleksu FimC-FimH. Kiedy białko kanałotwórcze jest w stanie niezwiązanym, domena N-terminalna przyjmuje konformację „zamkniętą”, gdzie region zawiasowy wytwarza specyficzne oddziaływania z rdzeniem domeny N-terminalnej. Szczególnie charakterystyczne jest ułożenie pierścienia aromatycznego Trp133 w hydrofobowej kieszeni wiążącej zlokalizowanej na powierzchni rdzenia domeny N-terminalnej. W konformacji „otwartej” ma miejsce uwolnienie reszty Trp133 z kieszeni rdzenia, co powoduje rozluźnienie interakcji regionu zawiasowego względem rdzenia N-terminalnej domeny, co czyni domenę N-terminalną zdolną do wiązania kompleksu białka opiekuńczego i podjednostki strukturalnej (Rys. 9) [Capitani i wsp., 2006]. Hipoteza wysunięta na podstawie tych badań [Nishiyama i wsp., 2005] zakładała, że kanał translokacyjny jest blokowany przez domenę N-terminalną. Jednak późniejsze doświadczenia udowodniły, że rolę tę pełni domena środkowa, natomiast domena N-terminalna, gdy nie jest związana z kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka, znajduje się w perioplazmie w stanie nieuporządkowanym [Remaut i wsp., 2008].



## CZĘŚĆ TEORETYCZNA



**Rys. 9.** Model obrazujący konformację „zamkniętą” i „otwartą” domeny N-terminalnej białka FimD [Capitani i wsp., 2006].

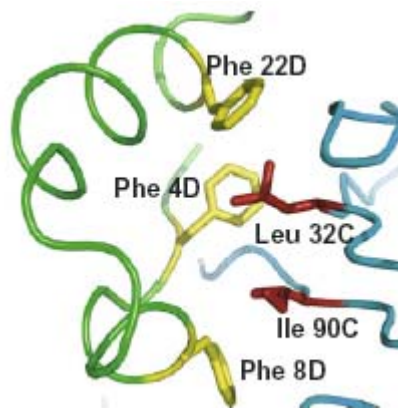
Otrzymano również strukturę krystaliczną kompleksu składającego się N-terminalnej domeny białka kanałotwórczego FimD<sub>N</sub> (reszty aminokwasowe 1-125), białka opiekuńczego FimC oraz C-terminalnego fragmentu podjednostki adhezyjnej FimH (reszty aminokwasowe 158-279) (Rys. 10). Analiza struktury tego kompleksu dostarczyła informacji dotyczących interakcji poszczególnych jego elementów oraz mechanizmu rozpoznania kompleksu FimC-FimH przez N-terminalną domenę białka kanałotwórczego FimD.



**Rys. 10.** Model struktury krystalicznej kompleksu FimD<sub>N</sub> (rdzeń domeny oznaczono kolorem pomarańczowym, N-terminalny ogon kolorem zielonym), białka opiekuńczego FimC (kolor niebieski) oraz podjednostki adhezyjnej FimH (kolor różowy).

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Nieustrukturyzowany w stanie wolnym N-terminalny ogon domeny FimD<sub>N</sub> uzyskuje uporządkowaną konformację po przyłączeniu się kompleksu FimC-FimH i oddziałuje specyficznym zarówno z białkiem opiekuńczym FimC, jak i z podjednostką adhezyjną FimH. Oddziaływania te stanowią 60% wszystkich interakcji N-terminalnej domeny białka kanałotwórczego FimD (1-125) z kompleksem białko opiekuńcze FimC – podjednostka FimH. Szczególną rolę odgrywają hydrofobowe oddziaływania aromatycznych reszt aminokwasowych Phe4, Phe8 oraz Phe22 (Rys. 11). Phe8 wnika głęboko w hydrofobowy rdzeń białka opiekuńczego, oddziałując odpowiednio z Ile90 oraz Glu104 tego białka oraz z Glu269 i Ile271 podjednostki FimH. Mutacje tych trzech reszt aromatycznych białka FimD zaburzały biogenezę pili *in vivo*. Reszty aminokwasowe ogona FimD<sub>N</sub> 1-24 są jedynymi resztami domeny N-terminalnej, które oddziałują z podjednostką FimH w potrójnym kompleksie FimC-FimH-FimD<sub>N</sub>, gdyż rdzeń domeny FimD<sub>N</sub>, poprzez oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe oraz mostki solne, oddziałuje tylko z białkiem opiekuńczym FimC.



**Rys. 11.** Model przedstawiający oddziaływanie pomiędzy trzema resztami aminokwasowymi Phe4, Phe8 i Phe22 (kolor żółty) białka FimD (kolor zielony), a resztami Leu32 i Ile90 (kolor czerwony) białka FimC (kolor niebieski).

### 2.6. Pilicydy jako potencjalne chemoterapeutyki blokujące oddziaływanie kompleksu białko opiekuńcze-podjednostka adhezyjna z białkiem „usher”

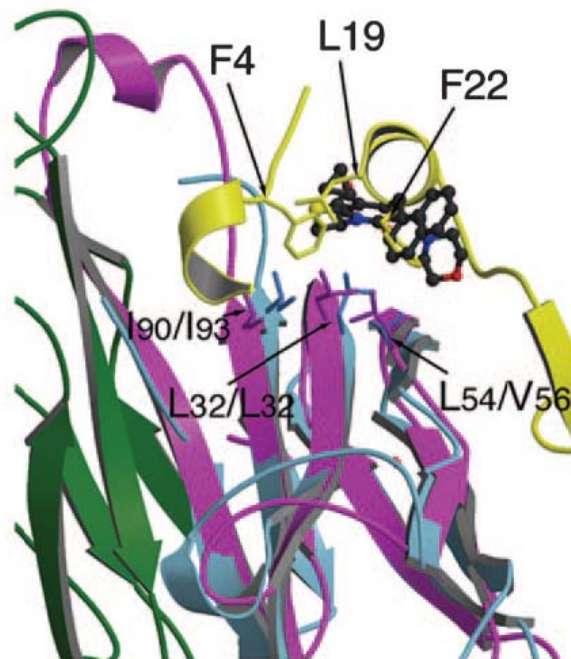
Pilicydy definiuje się jako grupę związków będących pochodnymi tyrozyny lub 2-pirydonu, które poprzez interakcje z białkiem opiekuńczym blokują proces biogenezy struktur adhezyjnych uropatogennych szczepów *E. coli*. Badania NMR wskazywały na różne miejsca wiązania pilicydów w obrębie białka opiekuńczego: rejon szczeliny

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

---

między domenami (zgodnie z założeniem modelu), pętla F1-G1 oraz powierzchnia domeny N-terminalnej nieskierowana do szczeliny [Hedenstrom i wsp., 2005]. Dla jednej z pochodnych 2-pirydonu o wysokiej skuteczności pilicydowej, która cechowała się dobrą rozpuszczalnością w układach wodnych uzyskano strukturę krystaliczną w postaci kompleksu z „chaperonem” PapD [Pinkner i wsp., 2006] (Rys. 12). Dane krystaliczne wskazują, że cząsteczka pilicydu wiąże się z rejonem N-terminalnej domeny „chaperonu” PapD zlokalizowanym „z tyłu” pętli F1-G1. Analiza dostępnych danych strukturalnych (kompleks FimC-FimH158-279-FimD1–125) wskazuje, iż ten obszar białek opiekuńczych jest zaangażowany w bezpośrednie oddziaływanie z białkiem kanałotwórczym „usher”. Dane te wskazują, iż w przypadku badanego związku aktywność pilicydowa wiąże się z blokowaniem interakcji pomiędzy białkiem „usher”, a kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka. Doświadczenia z wykorzystaniem rezonansu plazmonowego wykazały, iż wiązanie się kompleksu FimC-FimH i N-terminalnej domeny białka „usher” w obecności pilicydu zostało zahamowane. Opisany mechanizm działania pilicydów został dodatkowo potwierdzony przy pomocy techniki mutagenyzy ukierunkowanej białka PapD w rejonie reszt zidentyfikowanych jako oddziałujące z badaną pochodną 2-pirydonu. Uropatogenne szczepy *E. coli* (pap+) eksprymujące mutanty białka PapD charakteryzowały się znaczącą redukcją ilości pili na powierzchni komórki bakteryjnej, a mutacje w omawianym rejonie silnie redukowały powinowactwo białka PapD do białka „usher”.

Ze względu na to, iż reszty aminokwasowe białek opiekuńczych, zaangażowane w interakcje z białkiem „usher” i obserwowane oddziaływania z cząsteczką związanego pilicydu, są zakonserwowane w całej rodzinie białek opiekuńczych, pilicydy mogą stanowić nową grupę związków skierowaną przeciwko bakteryjnym infekcjom dróg moczowych, o bardzo szerokim spektrum działania.



**Rys. 12.** Struktura kompleksu domeny N-terminalnej białka „usher” FimD (reszty aminokwasowe 1-125 oznaczone kolorem żółtym) z białkiem opiekuńczym FimC (oznaczone kolorem fioletowym) i podjednostką FimH<sub>158-279</sub> (oznaczone kolorem zielonym) oraz kompleksu białka opiekuńczego PapD (oznaczone kolorem jasnoniebieskim) z cząsteczką pilicydu (oznaczone na czarno) [Pinkner i wsp., 2006].

### 3. CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie najmniej poznanego białka DraC kodowanego przez operon *dra* uropatogennych szczepów *E. coli* Dr+, odpowiedzialnego za zewnątrzkomórkową polimeryzację fimbrii Dr, warunkujących chorobotwórczość tych szczepów.

Badania dotyczyć miały głównie określeniu krytycznych miejsc w sekwencji aminokwasowej tego białka, mających wpływ na jego funkcję, a więc wyznaczeniu kluczowych reszt aminokwasowych w sekwencji białka DraC odpowiedzialnych za oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze DraB-podjednostka strukturalna DraE. Określenie takich miejsc może prowadzić do znalezienia związków blokujących wiązanie się kompleksu białko opiekuńcze DraB-białko podjednostkowe DraE do białka kanałotwórczego DraC. Związki takie potencjalnie mogłyby być skutecznymi chemoterapeutykami hamującymi biogenezę fimbrii Dr.

Realizacja celu pracy wymagała następujących zadań badawczych:

- stworzenie uniwersalnego i prostego modelu badawczego do zewnątrzkomórkowej ekspresji struktur adhezyjnych rodziny Dr dla badań *in vivo*,
- skonstruowanie mutantów w genie *draC* przy zastosowaniu mutagenyzy ukierunkowanej,
- badanie zdolności otrzymanych mutantów do tworzenia fimbrii w układzie *in vivo* przy zastosowaniu różnych metod;
- otrzymanie preparatów białkowych DraC, N-terminalnej domeny DraC oraz kompleksów białek DraB/DraE do badań *in vitro*;
- badanie oddziaływań funkcjonalnych i hamujących polimeryzację fimbrii mutantów białek DraC z kompleksem białko opiekuńcze DraB-adhezyna DraE metodą mikrokalorymetrii izotermalnej.

## MATERIAŁY

### 4.1. Szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* Top 10F' – F' *lac* I<sup>q</sup> *Tn10* (Tet<sup>R</sup>), *mcrAΔ* (*mrr*-*hsd* RMS –*mcr* BC)  $\phi$  80' *lacZΔ15*,  $\Delta$ *lacX74* *deo* R *recA1* *ara* D139  $\Delta$ (*ava* –*leu*) F697 *gal*/U *gal*/K *rpsL* (*str*R) *end* A1 *nup* G (Invitrogen)

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

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

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

- *Escherichia coli* XL1-Blue *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F'*proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene)

### 4.2. DNA

- pCC90 - plazmid rekombinantowy otrzymany przez wklonowanie do niskokopijnego plazmidu pACYC177 (niosący replikon p15A, umożliwiający stabilnie współistnieć plazmidowi pCC90 w jednej komórce bakteryjnej razem z plazmidami z grupy ColE1) insertu DNA zawierającego sekwencję nukleotydową operonu *dra* bez regionu promotorowego i genów regulatorowych *draA* i *draF*. Inset DNA bez regionu promotorowego i genów regulatorowych *draA* i *draF* operonu *dra* otrzymano poprzez wstępne trawienie DNA plazmidu pBJN406 (zawierającego całą sekwencję operonu *dra*) restryktazą *EcoRI* (po wprowadzeniu dodatkowego miejsca rozpoznania dla restryktazy *EcoRI* 45 pz powyżej genu *draB* w plazmidzie pBJN406). W ten sposób usunięto region promotorowy operonu *dra* podlegający kontroli przez mechanizm zmienności fazowej, mający wpływ na poziom ekspresji białek fimbrialnych. Następnie pozostały fragment DNA (flankowany przez miejsca rozpoznania dla restryktaz *EcoRI* i *HindIII*) z sekwencją

## MATERIAŁY

---

operonu *dra* bez regionu regulatorowego wklonowano do wektora pACYC177 (pozwalającego na transkrypcję operonu *dra* z promotora genu oporności na kanamycynę) [Carnoy i Moseley, 1997]. Plazmid otrzymany od profesora Bogdana Nowickiego, University of Texas (Galveston, USA).

- pET30b+ – plazmidowy wektor ekspresyjny o wielkości 5422 pz, zawierający silny promotor  $\phi 10T7lac$ , terminator transkrypcji faga T7 oraz *origin* replikacji pochodzące z wektora pBR322 (Novagen).
- pUC19 – wektor wysokokopijny *E. coli* o wielkości 2686 pz, wykorzystywany do wstępnego klonowania DNA w komórkach *E. coli* (Invitrogen).
- pACYC177pBAD – plazmidowy wektor niskokopijny *E. coli* o wielkości 4451 pz, pochodny plazmidu pACYC177 [Selzer i wsp., 1983]. Został skonstruowany w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej. Posiada *ori* replikacji p15A umożliwiające jego współistnienie w komórkach zawierających wektory plazmidowe z *ori* ColE1. Wektor ten powstał w wyniku klonowania insertu DNA, zawierającego kasetę ekspresyjną oraz gen represora AraC, pochodzącego z plazmidu pBAD/Myc-His (Invitrogen) w miejsca rozpoznania dla restryktaz *Aat*II oraz *Sma*I. W efekcie klonowania z plazmidu pACYC177 został usunięty gen warunkujący oporność na kanamycynę. Skonstruowany wektor posiada tylko gen oporności na ampicylinę. pACYCpBAD jest wektorem ekspresyjnym zawierającym promotor arabinozowy *araBAD* (indukcja arabinozą). Plazmid ten został skonstruowany celem tworzenia rekombinantowych szczepów *E. coli* niosących dwa plazmidy ekspresyjne, pACYCpBAD oraz pET, zawierające różne promotory.
- pET30b-sygDraB-C-His-DraE – pochodna plazmidu ekspresyjnego pET30b+ z wklonowanymi genami kodującymi natywne (z Sec-zależną sekwencją sygnałną) białko opiekuńcze DraB oraz adhezynę DraE, pozwalająca na produkcję obu białek do przestrzeni periplazmatycznej [Piątek i wsp., 2005]. W plazmidzie tym geny kodujące białka DraB i DraE znajdują się pod kontrolą wspólnego promotora faga T7. Każdy gen poprzedzony jest własną sekwencją wiązania rybosomów (RBS). W układach prokariotycznych translacja z miejsca RBS proksymalnego do sekwencji promotora jest z reguły silniejsza, niż z pozostałych dystalnych miejsc RBS. W związku z tym, aby otrzymać nadmiar białka DraB niezbędnego do przyjęcia poprawnej struktury przez

## MATERIAŁY

---

białko DraE, w plazmidzie pET30b-sygDraBE gen kodujący białko DraB jest proksymalny w stosunku do promotora, natomiast gen kodujący adhezynę DraE jest dystalny. Powstające w wyniku ekspresji białko DraB posiada na C-końcu fuzję sześciu kolejnych reszt histydyny.

- pET30-sygDraB-C-His-DraE $\Delta$ 3 – plazmid pochodny plazmidu pET30b-sygDraB-C-His-DraE [Piątek i wsp., 2005]. W genie kodującym białko DraE usunięta została sekwencja kodująca trzy N-terminalne aminokwasy nici donorowej. W efekcie powstające białko DraE nie jest zdolne do tworzenia struktur oligomerycznych. Zdolność tworzenia specyficznych kompleksów DraB/DraE w wyniku delekcji nie została zakłócona.
- pDraE-HSV3 – plazmid rekombinantowy, w którym wprowadzono sekwencję nukleotydową kodującą determinantę antygenową pochodzącą z glikoproteiny D wirusa *Herpes simplex* typu 1, zamiast sekwencji kodującej domenę 2 białka DraE [Zalewska i wsp., 2003].
- pET30-sygDraEdsc-N-His – plazmid rekombinantowy, pochodna wektora pET30b(+) (Novagen), z wklonowanym genem kodującym białko DraE-dsc-N-His wraz z sekwencją sygnałną (kolekcja plazmidów Katedry Mikrobiologii PG). N-końcowy fragment odpowiadający  $\beta$ -harmonijce donorowej G został usunięty w trakcie klonowania. Na C-końcu wprowadzona została 14-aminokwasowa sekwencja odpowiadająca N-końcowej  $\beta$ -harmonijce donorowej G białka DraE (stąd oznaczenie dsc - ang. *donor strand complementation*), poprzedzona 4-aminokwasowym łącznikiem DNKQ [Anderson i wsp., 2004]. Na N-końcu białka, bezpośrednio za sekwencją sygnałną, dołączona została domena sześciu reszt histydyn, ułatwiająca oczyszczanie białka (oznaczenie –N-His).
- pET30-DraDdsc-N-His – plazmid rekombinantowy, pochodna wektora pET30b(+) (Novagen), z wklonowanym genem kodującym rekombinantowe białko DraD-dsc-N-His wraz z sekwencją sygnałną. W białku tym na C-końcu wprowadzona została 14-aminokwasowa sekwencja odpowiadająca N-końcowemu fragmentowi białka DraE -  $\beta$ -harmonijce donorowej G białka DraE (dsc). Fuzja ta jest poprzedzona 4-aminokwasowym łącznikiem DNKQ [Anderson i wsp., 2004]. Na N-końcu białka, bezpośrednio za sekwencją sygnałną, dołączona została domena sześciu reszt histydyn, ułatwiająca oczyszczanie białka (oznaczenie –N-His).



## 4.3. Podłoża

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

## 4.4. Antybiotyki

- Kanamycyna – roztwór wyjściowy: 20 mg/ml H<sub>2</sub>O
- Tetracyklina – roztwór wyjściowy: 12,5 mg/ml etanolu
- Ampicylina – roztwór wyjściowy: 50 mg/ml H<sub>2</sub>O

## 4.5. Odczynniki podstawowe

- Agar do podłoży mikrobiologicznych (BTL, Polska)
- Agaroz (BRL)
- Akrylamid (Sigma, USA)
- Albumina krwi wołowej - BSA (Sigma, USA)
- Barwnik Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka, USA)
- Błękit bromofenolowy (POCh S. A., Polska)
- Bromek etydy (Sigma, USA)
- Chlorek sodu (NaCl), Chlorek wapnia (CaCl<sub>2</sub>) (POCh S. A., Polska)
- Chlorowodorek guanidyny (Sigma, USA)
- Coomasie Brilliant Blue R-250 i Coomasie Brilliant Blue G-250 (Sigma, USA)
- DTT – ditiotretitol (Fluka, USA)
- EDTA (sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego) (Sigma, USA)
- Ekstrakt drożdżowy (BTL, Polska)
- Etanol, roztwór 96% (Przedsiębiorstwo Chemiczne – Odczynniki Sp. z o.o., Polska)
- Glicyna (POCh S. A., Polska)
- HEPES (Sigma, USA)
- IPTG (izopropylotiogalaktozyd), 1 M roztwór – 238 mg/ml H<sub>2</sub>O (Sigma, USA)
- L-arabinoza (Sigma, USA)
- Nadsiarczan amonu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Serva)
- N,N'-metyleno-bisakrylamid (Sigma, USA)
- SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu) (Sigma, USA)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina) (Sigma, USA)
- Tris-HCl (hydroksymetylo-aminoetan) (Sigma, USA)
- X-Gal w N,N'-dimetyloformamidzie – 20 mg/ml (Sigma, USA)

## 4.6. Roztwory do elektroforezy agarozowej

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

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

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

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

błękit bromofenolowy	0,025
sacharoza	8
EDTA	1,48

## 4.7. Roztwory do elektroforezy poliakrylamidowej

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

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

- Żel rozdzielający 15% (objętość końcowa żelu – 5 ml):

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

- Roztwór do nanoszenia próbek na żel:
  - 1% SDS – powoduje powierzchniową denaturację białek; nadaje im wypadkowy ładunek ujemny

## MATERIAŁY

---

- 1 M  $\beta$ -merkaptoetanol – redukuje mostki disiarczkowe w białkach
- 0,25% błękit bromofenolowy – nadaje zabarwienie próbkom, umożliwiając obserwację migracji białek w żelu
- 10% glicerol – stanowi obciążenie próbek, ułatwiając ich nanoszenie do studzienek żelu
- 1 M Tris-HCl (pH 6,8) – czynnik buforujący

- Roztwór barwiący do żeli po przeprowadzonej elektroforezie SDS-poliakryloamidowej:

Coomasie Brilliant Blue R-250	0,25 g
metanol	50 ml
lodowaty kwas octowy	10 ml
woda	40 ml

- Roztwór odbarwiający do żeli poliakryloamidowych:

metanol	300 ml
lodowaty kwas octowy	100 ml
woda	600 ml

- Bufor do elektroforezy poliakryloamidowej - Tris-Glicyna 1x stężony, pH 8,3

Roztwór podstawowy 5 razy stężony, skład na 1 litr roztworu:

Tris-HCl	15,1 g
glicyna	94 g
10% SDS	50 ml
Dopełnić wodą do 1000 ml	

### 4.8. Enzymy i bufony reakcyjne

- Ligaza polinukleotydowa faga T4 (Epicentre, USA)
- Bufor do reakcji ligacji (Epicentre, USA)
- Roztwór ATP (Epicentre, USA)
- Restryktazy: *HindIII*, *SmaI*, *NcoI*, *EcoRI*, *PstI*, *HincII*, *EcoRV*, *NdeI* (BioLabs, New England)
- Odpowiednie bufony do reakcji trawienia danego enzymu (BioLabs, New England)

### 4.9. Bufory i odczynniki do reakcji PCR

- Bufor do reakcji PCR dla polimerazy DNA *Pwo* (DNA Gdańsk II) (1x stężony):

Tris-HCl (pH 8,8)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM

## MATERIAŁY

---

- KCl 50 mM  
Triton X-100 0,1%
- Trifosforany deoksynukleozydów (dNTP's) (DNA Gdańsk II): dATP, dGTP, dCTP, dTTP – każdy z nich o stężeniu 2,5 mM
  - Matryca do reakcji PCR – DNA plazmidu pCC90 (0,25 µg/µl)
  - Polimeraza DNA *Pwo* (DNA Gdańsk II) – rekombinowana polimeraza DNA, której naturalnym źródłem są archeony *Pyrococcus woesei*, wykazująca aktywność polimeryzacyjną 5'→3' i aktywność egzonukleazy 3'→5'. Charakteryzuje się 12-krotnie zwiększoną wiernością syntezy DNA w porównaniu z polimerazą DNA *Taq*.
  - Startery (10 µM) (DNA Gdańsk II):
    - do amplifikacji genu *draC* na matrycy DNA plazmidu pCC90:

### starter DraC-NcoI:

5' **CCATGG**GGCGTGATACTTCTTCAGGGCGGATGAG 3'  
*NcoI*

### starter DraC-HindIII-His:

5' ATAA**AAGCTT****TCAGT**GATGGT**GATGGT**GATGCGCCATACACACCGTACGGGTCAGAAATATCCCCGC 3'  
*HindIII* STOP 6xHis

- do amplifikacji fragmentu genu *draC* na matrycy DNA plazmidu pCC90:

### starter N-DraC-up

5' ATAA**CCATGG**GGCGTGATACTTCTTCAGGGCGG 3'  
*NcoI*

### starter N-DraC125-down

5' ATAA**AAGCTT****TCAGT**GATGGT**GATGGT**GATGCGCCCTCAGCTGCGGACGCCAGTGCC 3'  
*HindIII* STOP 6xHis

- do mutagenезы ukierunkowanej na matrycy DNA plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His, w celu wprowadzenia mutacji punktowych w obrębie genu *draC*:

### mutacja Phe4

Phe4-up 5' GCGCACCTACTCCGCTGATGCGGCCATG 3'  
Phe4-down 5' CATGGCCGCATCAGCGGAGTAGGTGCGC 3'

# MATERIAŁY

---

## mutacja Asp5

Asp5-up 5' CACCTACTCCTTTGCTGCGGCCATGCTG 3'  
Asp5-down 5' CAGCATGGCCGCAGCAAAGGAGTAGGTG 3'

## mutacja Met8

Met8-up 5' CCTTTGATGCGGCCGCGCTGAAAGGTGGC 3'  
Met8-down 5' GCCACCTTTCAGCGCGGCCGCATCAAAGG 3'

## mutacja Leu9

Leu9-up 5' TTGATGCGGCCATGGCGAAAGGTGGCGGG 3'  
Leu9-down 5' CCCGCCACCTTTCGCCATGGCCGCATCAA 3'

## mutacja Leu18

Leu18-up 5' GAAGGGGGTGGACGCGACCCTGTTTGAGG 3'  
Leu18-down 5' CCTCAAACAGGGTCGCGTCCACCCCTTC 3'

## mutacja Leu20

Leu20-up 5' GGGTGGACCTGACCGCGTTTGAGGAAGGTG 3'  
Leu20-down 5' CACCTTCCTCAAACGCGGTCAGGTCCACCC 3'

## mutacja Phe21

Phe21-up 5' GGACCTGACCCTGGCTGAGGAAGGTGGG 3'  
Phe21-down 5' CCCACCTTCCTCAGCCAGGGTCAGGTCC 3'

## mutacja Pro28

Pro28-up 5' AGGTGGGCAGTTAGCCGGCATTATCCGG 3'  
Pro28-down 5' CCGGATAAATGCCGGCTAACTGCCACCT 3'

## mutacja Asp17

Asp17-up 5' GGAAGGGGGTGGCCCTGACCCTGTTTG 3'  
Asp17-down 5' CAAACAGGGTCAGGGCCACCCCTTCC 3'

## mutacja Leu27

Leu27-up 5' GGAAGGTGGGCAGGCACCCGGCATTATCC 3'  
Leu27-down 5' GGATAAATGCCGGGTGCCTGCCACCTTCC 3'

## mutacja Tyr31

Tyr31-up 5' GCAGTTACCCGGCATTGCTCCGGTTGACATTATCC 3'  
Tyr31-down 5' GGATAATGTCAACCGGAGCAATGCCGGGTA ACTGC 3'

## mutacja Asp34

Asp34-up 5' GGCATTTATCCGGTTGCCATTATCCTGAATGGTTC 3'  
Asp34-down 5' GAACCATT CAGGATAATGGCAACCGGATAAATGCC 3'

## mutacja Cys64

Cys64-up 5' GCCTTATCTGAAGACCGCTCTGACCCGTGAGATG 3'  
Cys64-down 5' CATCTCACGGGTCAGAGCGGTCTTCAGATAAGGC 3'

## mutacja Leu65

Leu65-up 5' CCTTATCTGAAGACCTGTGCGACCCGTGAGATGC 3'  
Leu65-down 5' GCATCTCACGGGTCGCACAGGTCTTCAGATAAGG 3'

## mutacja Thr66

Thr66-up 5' GAAGACCTGTCTGGCCCGTGAGATGCTG 3'  
Thr66-down 5' CAGCATCTCACGGGCCAGACAGGTCTTC 3'

## mutacja Cys100

Cys100-up 5' GCGGAGGAGGCCGCTGCTGACCTGACG 3'  
Cys100-down 5' CGTCAGGTCAGCAGCGGCCTCCTCCGC 3'

## mutacja Trp142

Trp142-up 5' CGCCGGAGGCGTTAGCGGATGATGGCATTTC 3'  
Trp142-down 5' GAATGCCATCATCCGCTAACGCCTCCGGCG 3'

### 4.10. Odczynniki do mutagenyzy miejscowo-specyficznej

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

- Polimeraza DNA *PfuTurbo* (2,5 U/μl)
- Bufor do reakcji PCR (10 x stężony)
- Mieszanina trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP)
- Enzym restrykcyjny *DpnI* (10 U/μl)

### 4.11. Bufory i odczynniki do techniki Western blotting

1) Przeciwciała pierwotne:

- poliklonalne królicze przeciwciała anti-Dr, specyficzne dla białka adhezyny DraE (otrzymane przez zespół prof. B. Nowickiego z The University of Texas Medical Branch at Galveston)

## MATERIAŁY

---

- monoklonalne mysie przeciwciała anty-His•Tag (Novagen, USA) znakowane peroksydazą chrzanową typu IV, stosowane do detekcji białek zawierających domenę fuzyjną His•Tag

### 2) Przeciwciała wtórne:

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

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

### 4) Odczynniki:

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

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

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

Tris-HCl 20 mM	2,42 g
NaCl 500 mM	29,0 g
0,05% Tween 20	500 $\mu$ l
Dopełnić wodą do 1000 ml	

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

Tris-HCl	2,42 g
NaCl	29,0 g
0,05% Tween 20	500 $\mu$ l
1% odtłuszczone mleko w proszku	10,0 g
Dopełnić wodą do 1000 ml	

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

Tris-HCl	2,42 g
NaCl	29,0 g
0,05% Tween 20	500 $\mu$ l
3% odtłuszczone mleko w proszku	30,0 g
Dopełnić wodą do 1000 ml	

## MATERIAŁY

---

- 5) Markery białkowe do Western blotting: Fermentas  
250, 130, 100, 70 (czerwony prążek), 55, 35, 27 (czerwony prążek), 15 i 10 kDa;  
160, 110, 90, 70 (czerwony prążek), 55, 45, 35, 25, 15 i 10 kDa.
- 6) Błona nitrocelulozowa (45 micron, Sigma)
- 7) Bibuła Whatman (Sigma)
- 8) Odczynnik do detekcji DAB – 3,3'diaminobenzzydina, 3,3',4,4'-tetra-aminobifenyl otrzymany w postaci tetrachlorowodoru ( $C_{12}H_{14}N_4 \cdot 4HCl$ ) (Sigma)  
Stosowano roztwór tetrachlorowodoru DAB przez rozpuszczenie 6 mg tej substancji w 9 ml 0,05 M buforu Tris-HCl (pH 7,6)
- 9) 30% roztwór  $H_2O_2$ . Dodawano 0,1 ml  $H_2O_2$  na 9 ml roztworu odczynnika do detekcji DAB w 0,05 M buforze Tris-HCl (pH 7,6)

### 4.12. Odczynniki do izolacji frakcji fimbrialnych

- Bufor PBS (pH 7,5)

80 mM $Na_2HPO_4$	28,67 g
20 mM $NaH_2PO_4$	2,76 g
100 mM HCl	5,85 g
dopełnić wodą do 1000 ml	
- 40 %  $(NH_4)_2SO_4$  w buforze PBS
- Błona dializacyjna (MWCO>100,000) Sigma

### 4.13. Bufory i odczynniki do mikroskopii immunofluorescencyjnej

- Bufor PBS (pH 7,5): 80 mM  $Na_2HPO_4$ , 20 mM  $NaH_2PO_4$ , 100 mM NaCl
- Bufor PBSglyc – buforowany roztwór soli fizjologicznej (80 mM  $Na_2HPO_4$ , 20 mM  $NaH_2PO_4$ , 100 mM NaCl, pH 7,5) i 10% glicerolu
- Przeciwciała pierwotne:
  - poliklonalne królicze przeciwciała anti-Dr, specyficzne dla białka adhezyny DraE (Pham, 1997)
- Przeciwciała wtórne:



## MATERIAŁY

---

- kozie przeciwciała specyficzne dla przeciwciał króliczych (*ang.* Anti-Rabbit IgG from goat, Whole Molecule; Sigma) znakowane izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Surowicę zawierającą te przeciwciała otrzymano przez immunizację kóz oczyszczonymi immunoglobulinami IgG pochodzenia króliczego. Następnie w celu uzyskania specyficznych przeciwciał otrzymaną surowicę odpornościową poddano immunospecyficznemu oczyszczaniu, w celu usunięcia wszystkich immunoglobulin, które nie wiążą specyficznie króliczych przeciwciał IgG. W następnym etapie oczyszczone przeciwciała zostały skoniugowane z FITC i poddane dializie do buforu PBS.
- Olejek immersyjny (Olympus)
- Szkiełka mikroskopowe (76 x 26 mm) i szkiełka nakrywkowe (15 x 15 mm) (Medlab)

### **4.14. Materiały do wykonania testu hemaglutynacji**

- Bufor PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej (pH 7,5): 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl
- Szkiełko mikroskopowe z zagłębieniami

### **4.15. Bufory i odczynniki do izolacji białka kanałotwórczego DraC ze szczepu *E. coli* TOP10F' pACYCpBAD-sygDraC-C-His**

- Bufor A: 20 mM Tris-HCl (pH 8)
- Bufor B: 20 mM HEPES (pH 7,5), 0,3 M NaCl
- 200 mM PMSF w 96% etanolu (Sigma)
- 10% Sarkosyl (sól sodowa kwas N-laurylosarkosynowego)(Sigma)
- DDM (n-dodecylo-β-D-maltozyd) (Sigma)

### **4.16. Roztwory do izolacji białek z frakcji periplazmatycznej**

- Bufor sacharozowy: 20% sacharoza; 5 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl; pH 8,0
- Schłodzony do 4°C roztwór chlorku magnezu – 10 mM (Sigma)

### **4.17. Bufory do oczyszczania białek metodą chromatografii metalopowinowactwa**

- Roztwory do regeneracji złoża:  
100 mM EDTA

## MATERIAŁY

---

roztwór nasycony NiCl<sub>2</sub>

2% roztwór SDS

- Roztwór do przechowywania złoża w temperaturze 4°C:  
20% alkohol etylowy
- Bufory płuczące (pH 7,9):  
bufor płuczający 1: 5 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy  
bufor płuczający 2: 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy  
bufor płuczający 3: 60 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy
- Bufor płuczający (kompleksy DraB-DraE):  
5 mM imidazol, 20 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 150 mM NaCl
- Bufor elucyjny (pH 7,9)  
1 M imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy (N-DraC-C-His, kompleksy DraB-DraE, DraEdsc-N-His, DraDdsc-N-His, DraB-C-His)  
1 M imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM bufor fosforanowy, 0,1% Elugent (DraC-C-His)

### 4.18. Bufory dializacyjne

- 20 mM bufor fosforanowy (pH 7,5) (N-DraC-C-His)
- 20 mM bufor fosforanowy (pH 7,5), 0,1% Elugent, 75mM NaCl (DraC-C-His, DraEdsc-N-His, DraDdsc-N-His, DraB-C-His)
- Ultraczysta woda (Millipore)

### 4.19. Materiały do badań na liniach komórkowych

- MEM – pożywka (*ang.* minimal essential medium (Gibco)
- 10% płodowa surowica bydlęca inaktywowana termicznie (Gibco)
- 50 x stężony roztwór penicyliny i streptomycyny (Sigma)
- linia komórek HeLa – wyprowadzona z guzów nowotworowych raka szyjki macicy (Helen Larsen)
- barwnik Giemsa (Sigma)
- 70% metanol

### 4.20. Bufory i odczynniki do testu ELISA

- Bufor opłaszczający (pH 9,6): 50 mM bufor węglanowy
- Bufor płuczający (pH 7,4): 50 mM Tris; 0,88% NaCl; 0,1% Tween 20

## MATERIAŁY

---

- Bufor blokujący (pH 7,2): 0,5 M NaCl; 3 mM KCl; 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1% TritonX-100; 1% BSA; 0,001% czerwień fenolowa
- Bufor substratowy i substrat reakcji barwnej: woda utleniona mocznikowa (Sigma) i O-fenyloamina (Sigma)  
Przygotowanie: na 20 ml wody - 1 tabletkę buforu + 1 tabletkę substratu
- Roztwór stopujący reakcję barwną: 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- Mikropłytki do testu ELISA (NUNC – Immuno<sup>TM</sup>Plates, Surface – MaxiSorp)

### 4.21. Przygotowanie kulek fluorescencyjnych

- Bufor boranowy 0,1 M, pH 8.5
- Bufor do zawieszania: PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej (pH 7,5): 80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl z dodatkiem 10 mg/ml BSA (Sigma) i 5% glicerol
- Kulki znakowane fluorescencyjnie, średnica 1  $\mu\text{m}$  (Polysciences Inc.)

### 4.22. Aparatura

- aparat do elektroforezy agarozowej Delfin (DNA Gdańsk II)
- aparat do elektroforezy poliakrylamidowej Bluestar (DNA Gdańsk II)
- aparatura do techniki Western Blotting (Fermentas)
- autoklaw (Systec)
- ciepłarka laboratoryjna TB2 (Pozameł, Polska)
- czytnik płytek ELISA: VICTOR 3V (Perkin Elmer)
- dezintegrator ultradźwiękowy Soniprep 150 MSE (SANYO, USA)
- inkubator  $\text{CO}_2$  (HERA cell 150, Heraeus)
- inkubator powietrzny z wytrząsaniem (DNA-Gdańsk II s. c., Polska; New Brunswick Science, USA)
- komora laminarna (HERA safe KS12, Heraeus)
- medyczna Łaźnia Wodna 3044 (Kottermann, Niemcy)
- mikrokalorymetr izotermalny Nano ITC Series III
- mikroskop immunofluorescencyjny (Olympus BX60)
- mikrowirówka Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Niemcy)/Sigma 1-15 (Sigma, Niemcy)

## MATERIAŁY

---

- pH-metr CP-315M (Elmetron, Polska)
- spektrofluorometr Perkin Elmer LS-5B (Perkin Elmer, USA)
- spektrofotometr Spectro 23 (LaboMed, Inc, USA)
- sterylizator SP-65G (WAMED, Polska)
- system do dokumentacji i densytometrycznej analizy żeli VersaDoc (BioRad, USA)
- termoblok Red-Hot 35 (DNA-Gdańsk, Polska)
- termocykler Mastercycler T1/Gradient (Biometra, Niemcy)
- termocykler (Perkin Elmer 2400)
- transluminator Foto/UV 21 (Fotodyne; Spectroline, USA)
- waga laboratoryjna (AXIS)
- wirówka Sorvall RC-5B (Du Pont, USA), 6K15 (Sigma, Niemcy), Multifuge 1S-R (Hareus, Niemcy)
- wortex WL-1 (DHN, Polska)
- zasilacz stabilizowany prądu stałego Thunder/Thunder II (DNA-Gdańsk II, Polska)
- zestaw do HPLC: (1) Analog interface D-7000, (2) Pompa L-7100, (3) Detektor DAD L-7455 (Merck-Hitachi, Niemcy)

# METODY

## 5. METODY

### 5.1. Reakcje PCR

#### Amplifikacja genu *draC* na matrycy DNA plazmidu pCC90

- skład mieszaniny reakcyjnej:

Składniki	Objętość [ $\mu$ l]
Matryca DNA plazmidu pCC90	1,0
Redestylowana woda jałowa	32,5
Bufor dla polimerazy DNA <i>Pwo</i> (10x stęż.)	5,0
dNTP (10 mM)	5,0
Starter: DraC-HindIII-His (10 $\mu$ M)	2,0
Starter: DraC-NcoI (10 $\mu$ M)	2,0
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	2,0
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	0,5

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej 50  $\mu$ l.

- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
93	120	35
93	30	
62	30	
72	120	
72	600	

#### Amplifikacja fragmentu genu *draC* kodującego N-terminalną domenę białka DraC na matrycy DNA plazmidu pCC90

- skład mieszaniny reakcyjnej:

Składniki	Objętość [ $\mu$ l]
Matryca DNA plazmidu pCC90	2,0
Redestylowana woda jałowa	29,6
Bufor dla polimerazy DNA <i>Pwo</i>	5,0
dNTP (10 mM)	5,0
Starter: N-DraC-up (10 $\mu$ M)	2,0
Starter: N-DraC-down (10 $\mu$ M)	2,0
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	4,0
Polimeraza DNA <i>Pwo</i>	0,4

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej 50  $\mu$ l.

## METODY

- profil temperaturowo-czasowy:

Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
93	120	
93	30	25
62	30	
72	45	
72	600	

### 5.2. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcję trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi prowadzono w temperaturze 37°C lub 25°C (*SmaI*), w buforze do trawienia odpowiednim dla danego enzymu restrykcyjnego (Materiały 4.8), przez 1 do 2 h. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła od 40 do 50  $\mu$ l. Wyniki reakcji trawienia obserwowano po rozdiale elektroforetycznym w 1% żelu agarozowym.

### 5.3. Reakcje ligacji DNA

Reakcję ligacji prowadzono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej: DNA wektora i insertu (w niektórych przypadkach rozcieńczonego wodą), buforu dla ligazy DNA, roztworu ATP oraz ligazy DNA faga T4. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 2 do 3 h w temperaturze pokojowej.

#### **Skład mieszanin ligacyjnych**

- 1) Reakcja ligacji wektora pUC19 trawionego enzymami restrykcyjnymi *HindIII* i *SmaI* z DNA insertu otrzymanego przez amplifikację genu *draC* z wykorzystaniem starterów DraC-*HindIII*-His i DraC-*NcoI*, trawionego restryktazą *HindIII*. Skład mieszaniny ligacyjnej:

Składnik	Objętość [ $\mu$ l]
DNA insertu	20,0
DNA wektora	3,0
ATP	2,0
Ligaza DNA T4	2,0
Bufor do ligacji (10x stęż.)	4,1
Redestylowana woda jałowa	10,0

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 41,1  $\mu$ l.

## METODY

- 2) Reakcja ligacji DNA wektora pACYCpBAD trawionego enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *SmaI* z DNA insertu zawierającego gen *draC*, otrzymanego poprzez trawienie wektora pUC19-DraC-C-His enzymami restrykcyjnymi *NcoI* i *HindIII*. Skład mieszaniny ligacyjnej:

Składnik	Objętość [μl]
DNA insertu	30,0
DNA wektora	5,0
ATP	2,0
Ligaza DNA T4	2,0
Bufor do ligacji (10x stęż.)	5,4
Redestylowana woda jałowa	10,0

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 54,4 μl.

- 3) Reakcja ligacji DNA wektora pUC19 trawionego enzymami restrykcyjnymi *SmaI* i *HindIII* z DNA insertu uzyskanym w wyniku amplifikacji fragmentu genu *draC* z wykorzystaniem starterów N-DraC-up oraz N-DraC-down, trawionego enzymem restrykcyjnym *HindIII*. Skład mieszaniny ligacyjnej:

Składnik	Objętość [μl]
DNA insertu	20,0
DNA wektora	2,0
ATP	2,5
Ligaza DNA T4	2,5
Bufor do ligacji (10x stęż.)	5,0
Redestylowana woda jałowa	20,0

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 50 μl.

- 4) Reakcja ligacji DNA wektora pACYCpBAD trawionego enzymami restrykcyjnymi *NcoI* i *HindIII* z DNA insertu uzyskanym w wyniku trawienia plazmidu rekombinantowego pUC-sygN-DraC-C-His tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. Skład mieszaniny ligacyjnej:

## METODY

Składnik	Objętość [ $\mu$ l]
DNA insertu	16,0
DNA wektora	4,0
ATP	2,5
Ligaza DNA T4	2,5
Bufor do ligacji (10x stęż.)	5,0
Redestylowana woda jałowa	20,0

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 50  $\mu$ l.

- 5) Reakcja ligacji DNA wektora pET30-sygDraBE trawionego enzymami restrykcyjnymi *SacI* i *HindIII* z DNA insertu uzyskanym w wyniku trawienia plazmidu rekombinantowego pDRaE-HSV3 tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. Skład mieszaniny ligacyjnej:

Składnik	Objętość [ $\mu$ l]
DNA insertu	18,0
DNA wektora	2,0
ATP	2,5
Ligaza DNA T4	2,5
Bufor do ligacji (10x stęż.)	5,0
Redestylowana woda jałowa	20,0

Całkowita objętość mieszaniny ligacyjnej: 50  $\mu$ l.

### 5.4. Izolacja plazmidowego DNA

Izolacje plazmidowego DNA wykonano za pomocą zestawu do izolacji ultraczystego plazmidowego DNA Miniprep plus (A&A Biotechnology).

### 5.5. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego

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

### 5.6. Elektroforeza agarozowa

Elektroforezę agarozową prowadzono najczęściej w 1% żelu agarozowym w aparacie do elektroforezy horyzontalnej w buforze TBE (Materiały 4.6) według standardowej procedury [Sambrook i wsp., 1989]. Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu prądu 80 mA, przez 30-60 min. Detekcję prowadzono przy świetle UV, o długości fali 312 nm, emitowanym przez transiluminator.



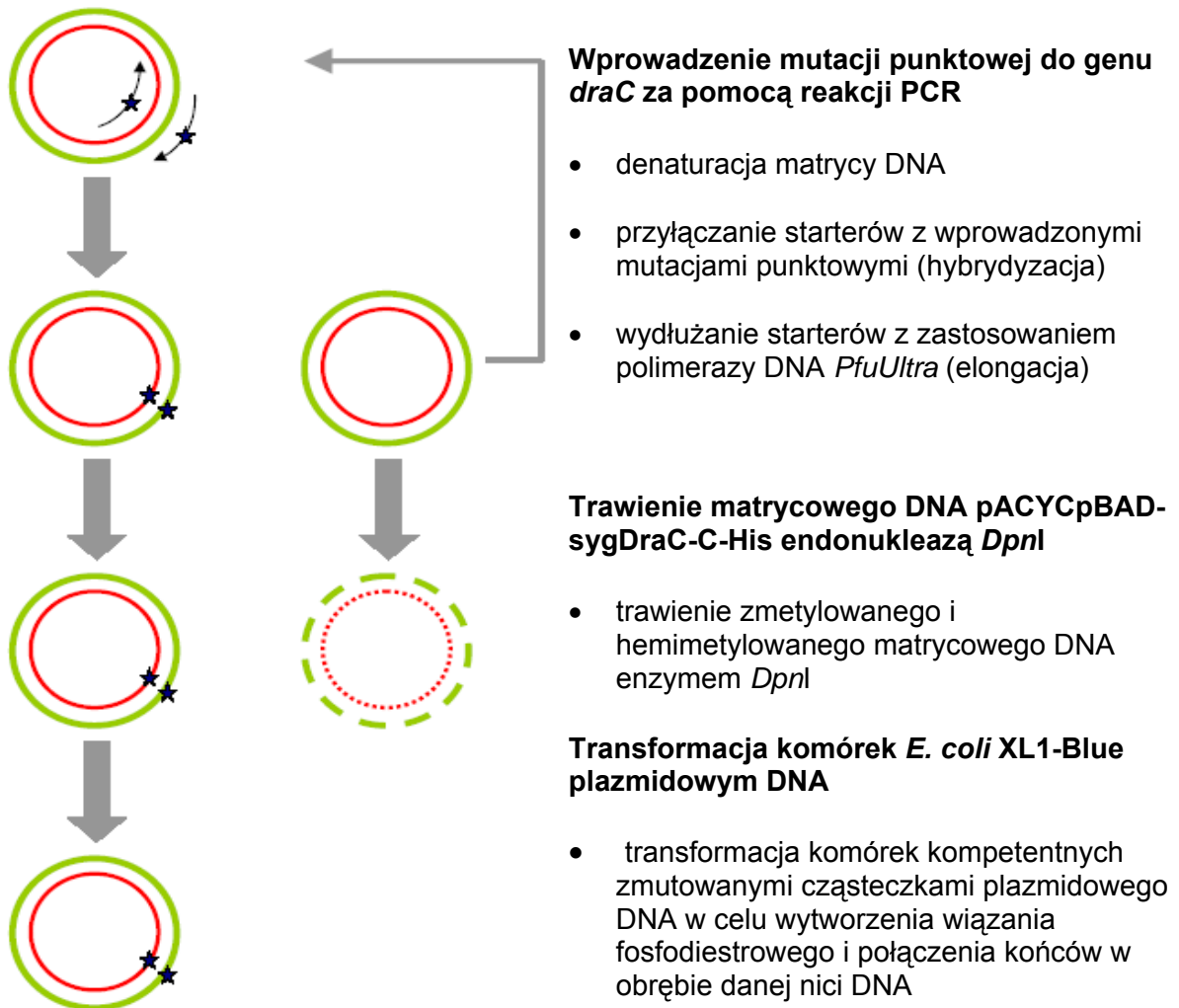
### 5.7. Transformacja komórek *E. coli* plazmidowym DNA

Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* określonego szczepu i transformację komórek kompetentnych DNA plazmidowym wykonywano według standardowej procedury [Sambrook i wsp., 1989].

### 5.8. Mutageneza ukierunkowana

Procedura mutagenezy ukierunkowanej składała się z trzech zasadniczych etapów: amplifikacji, usunięcia macierzystego DNA z próbki zawierającej produkt PCR oraz transformacji komórek kompetentnych szczepu *E. coli* XL1- Blue DNA otrzymanych plazmidów rekombinantowych z wprowadzonymi mutacjami punktowymi (Rys. 13). Amplifikację DNA wykonano za pomocą standardowej reakcji PCR, z użyciem odpowiednio zaprojektowanych, komplementarnych starterów oligonukleotydowych (Materiały 4.9), przy dobranym uprzednio profilu temperaturowo-czasowym. Umożliwiło to otrzymanie właściwych produktów PCR w postaci plazmidowego DNA o wielkości 7009 pz. W wyniku amplifikacji określone trójki nukleotydów genu *draC*, zostały zamienione na nukleotydy determinujące obojętny aminokwas alaninę. Po amplifikacji DNA matrycowe usuwano przez trawienie enzymem restrykcyjnym *DpnI*. Endonukleaza ta, rozpoznająca zmetylowaną sekwencję DNA, jest stosowana w celu wyodrębnienia nowo zsyntetyzowanego DNA, z wprowadzonymi mutacjami punktowymi po reakcji PCR. Tylko matrycowe DNA, które jest zmetylowane, podlega trawieniu, a niezmetylowane produkty PCR są odporne na trawienie *DpnI* i mogą być wprowadzone w kolejnym etapie do komórek *E. coli* XL1 Blue drogą transformacji.

## METODY



**Rys. 13.** Schemat procedury mutagenazy ukierunkowanej w celu otrzymania plazmidów rekombinantowych pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut.

- Amplifikacja na matrycy DNA plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His lub pACYCpBAD-sygN-DraC-C-His.
- startery (Materiały 4.9) wykorzystane do wprowadzenia mutacji punktowych w obrębie genu *draC*
- polimeraza DNA *PfuTurbo* (Stratagene)
- Skład mieszaniny reakcyjnej:

## METODY

Składniki	Objętość [μl]
Matryca DNA plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His lub pACYCpBAD-sygN-DraC-C-His	2,0
Redestylowana woda jałowa	36,0
Bufor dla polimerazy DNA <i>PfuTurbo</i> (10xstężony)	5,0
dNTP	1,0
Starter-up	1,0
Starter-down	1,0
Quicksolution	3,0
Polimeraza DNA <i>PfuTurbo</i>	1,0

Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej – 50 μl.

- profil temperaturowo-czasowy:

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

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

### 5.9. Ekspresja genów kodujących białka rekombinantowe w komórkach *E. coli*

Ogólne zasady przeprowadzania ekspresji:

- 1) zaszczepienie hodowli nocnej w pożywce LB, zawierającej odpowiedni antybiotyk, inkubacja przez noc w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C.
- 2) odmłodzenie hodowli nocnej w pożywce LB z tym samym antybiotykiem, dalsze prowadzenie hodowli w wytrząsarce powietrznej w tej samej temperaturze (prędkość 300 rpm)
- 3) indukcja ekspresji odpowiednim induktorem po uzyskaniu przez hodowlę odpowiedniego OD<sub>600</sub> (zazwyczaj około 0,5-0,6)

### 5.10. Mikroskopia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych rekombinantowych szczepów *E. coli* ekspresyjujących fimbrie Dr

Do badań immunofluorescencyjnych wykorzystano hodowle bakteryjne szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-DraB-C-His-DraE.

## METODY

---

Ekspresję prowadzono według procedury opisanej w punkcie 5.9. Uzyskany osad bakteryjny przepłukiwano trzykrotnie 1 ml buforu PBS i rozcieńczano w buforze PBS. Przygotowaną frakcję stanowiącą zawiesinę bakterii powyższego szczepu *E. coli* (100  $\mu$ l;  $10^5$  –  $10^6$  komórek/ml) w buforze PBS inkubowano z przeciwciałami pierwotnymi i wtórnymi.

### Wykonanie:

- 1) 100  $\mu$ l frakcji stanowiącej zawiesinę bakteryjną szczepu *E. coli* w buforze PBS inkubowano z 50  $\mu$ l króliczych poliklonalnych przeciwciał anti-Dr (rozcieńczonych w stosunku 1:500) specyficznych odpowiednio dla białka adhezyny DraE (Materiały 4.13), w temperaturze 37°C, przez 60 min
- 2) po inkubacji zawiesiny bakteryjnej z przeciwciałami usuwano nadmiar nie związanych przeciwciał za pomocą buforu PBSglyc (trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBSglyc) (Materiały 4.13)
- 3) 100  $\mu$ l frakcji stanowiącej zawiesinę bakteryjną (w buforze PBS) szczepu *E. coli* związanych z przeciwciałami anti-Dr, specyficznymi dla adhezyny DraE, inkubowano z 50  $\mu$ l kozich przeciwciał specyficznych dla przeciwciał króliczych (rozcieńczonych w stosunku 1:50) (*ang.* Anti-Rabbit IgG from goat, Whole Molecule; Sigma) znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (*ang.* Fluorescein Isothiocyanate, Isomer I, FITC), w temperaturze 37°C, przez 60 min (Materiały 4.13)
- 4) po inkubacji zawiesiny bakteryjnej z odpowiednimi przeciwciałami usuwano nadmiar niezwiązanych przeciwciał za pomocą buforu PBSglyc (trzykrotne płukanie 1 ml buforu PBSglyc) (Materiały 4.13)
- 5) 10  $\mu$ l zawiesiny bakteryjnej наносono na szkiełka mikroskopowe i obserwowano pod mikroskopem immunofluorescencyjnym (Olympus BX-60)

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

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym prowadzono według metody Leammli w 5% żelu zagęszczającym i 15% (lub 8%) żelu rozdzielającym, w buforze 1xTris-Glicyna [Leammli, 1970]. Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu prądu wynoszącym 90V. Przygotowanie próbek do analizy polegało na zmieszaniu 10÷15  $\mu$ l próbki i 5  $\mu$ l buforu denaturującego i inkubacji w temperaturze 98°C, przez 10 min. Po inkubacji

próbki wirowano i наносzono na żel. Te same czynności wykonano dla próbki białkowego markera wielkości. Po elektroforezie żele barwiono w roztworze barwiącym przez 30 min. Odbarwianie żelu prowadzono przez 1- 12 h w roztworze odbarwiającym (Materiały 4.7).

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

Metoda Western blotting polega na przeniesieniu białek rozdzielonych w żelu poliakryloamidowym na membranę, a następnie immunodetekcji (wykrywanie określonego antygenu białkowego za pomocą swoistych przeciwciał mono- lub poliklonalnych i wybranej techniki pozwalającej uwidocznić powstały kompleks antygen-przeciwciała). Specyfikę techniki Western blotting lepiej określa synonimiczna nazwa immunoblotting wskazująca, że metoda ta polega na otrzymaniu na membranie repliki białek rozdzielonych w żelu oraz ich analizie z użyciem przeciwciał.

Powstały kompleks antygen-przeciwciała zostaje uwidoczniiony na membranie za pomocą określonego znacznika, którym mogą być izotopy promieniotwórcze ( $I^{125}$ ,  $S^{35}$ ,  $H^3$ ), złoto koloidalne, enzymy – identyfikowane przez barwny produkt lub chemiluminescencyjnie.

W technice Western blotting w celu detekcji kompleksu antygen-przeciwciała konieczne jest zastosowanie substratów, które w obecności enzymu przekształcają się w barwne produkty nierozpuszczalne w wodzie, wytrącające się na membranie w miejscu powstałego kompleksu.

W celu wykrycia obecności białka adhezyny DraE oraz białka DraC-C-His, zastosowano metodę enzymatyczną z wykorzystaniem przeciwciał pierwotnych anti-Dr, przeciwciał wtórnych znakowanych peroksydazą chrzanową oraz przeciwciał monoklonalnych, specyficznie rozpoznających domenę oligohistydynową, również wyznakowanych peroksydazą chrzanową. Peroksydaza chrzanowa – białko zawierające żelazoporfirynę – pozwala uwidocznić antygen katalizując reakcję przeniesienia elektronów z chromogenu (substrat dający barwny produkt) na  $H_2O_2$ . Najczęściej używanym chromogenem, zastosowanym również w przeprowadzonym doświadczeniu, jest 3,3'-diaminobenzzydina (DAB). Powstający produkt jest barwy brunatnej, a w przypadku zastosowania jonów kobaltu, niklu i srebra, które w obecności DAB zwiększają intensywność zabarwienia, produkt posiada zabarwienie

## METODY

---

czarnoniebieskie. Czułość metody wynosi ok. 50-100 pg białka [Harlow i Lane, 1988; Kłyszajko-Stefanowicz, 1999].

Procedura immunodetekcji białek metodą Western blotting obejmuje następujące etapy:

- Transfer białek na błonę nitrocelulozową

Transfer białek rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym z SDS na filtr nitrocelulozowy (pory o średnicy 0,45  $\mu\text{m}$ ) wykonywano metodą elektrotransferu. Białka podczas przenoszenia przyłączają się do nitrocelulozy głównie w wyniku oddziaływań hydrofobowych. Zdolność wiązania białka przez nitrocelulozę wynosi około 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Jednocześnie na skutek odłączania się od białek SDS pod wpływem metanolu następuje ich częściowa renaturacja i pojawienie się epitopów konformacyjnych.

Błonę nitrocelulozową (o wymiarach odpowiadających wielkości żelu) i żel poliakrylamidowy nasączone w buforze do transferu (Materiały 4.11) umieszczano na trzech bibułach Whatman nasączonych w buforze do transferu na płycie anodowej (nitroceluloza od strony anody – płyta tytanowa pokryta platyną, żel poliakrylamidowy od strony katody – płyta ze stali nierdzewnej). Na powierzchni żelu poliakrylamidowego umieszczano trzy bibuły Whatman nasączone w buforze do transferu i przykładano płytę katodową. Aparat podłączano do zasilacza i wykonywano elektrotransfer przez 1-1,5 h przy stałym natężeniu prądu 66 mA. Po elektrotransferze usuwano bibuły Whatman i żel poliakrylamidowy, a białka związane z błoną nitrocelulozową poddawano immunoidentyfikacji.

- Immunoidentyfikacja

Immunoidentyfikacja białka rekombinantowego DraC-C-His:

Z uwagi na fakt, iż białko DraC posiada na swoim C-końcu domenę oligohistydynową immunoidentyfikacja odbywała się z zastosowaniem mysich przeciwciał monoklonalnych wyznakowanych peroksydazą chrzanową (Materiały 4.11), specyficznie rozpoznających domenę oligohistydynową.

Immunoidentyfikacja białka DraE:

Immunoidentyfikację białka DraE prowadzono z zastosowaniem króliczych poliklonalnych przeciwciał anti-Dr, specyficznych dla białka adhezyny DraE oraz kozich przeciwciał rozpoznających przeciwciała królicze, wyznakowanych peroksydazą chrzanową (Materiały 4.11).

## METODY

---

### Wykonanie immunoidentyfikacji na przykładzie adhezyny DraE:

- Błonę nitrocelulozową z unieruchomionymi na niej białkami umieszczano w pojemniku w buforze TBS-T z dodatkiem 5% mleka i inkubowano przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Inkubacja z roztworem blokującym zawierającym kazeinę ma na celu zabezpieczenie przed niespecyficznym wiązaniem przeciwciał na membranie do miejsc nie zajętych przez przeniesione białka. Następnie odpłukiwano roztwór blokujący przez przemywanie błony nitrocelulozowej w buforze TBS-T.
- Wykonywano rozcieńczenia przeciwciał pierwszorzędowych w buforze TBS-T w stosunku 1:1000.
- Po inkubacji błon z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami, przez 1 h, w temperaturze pokojowej, usuwano nadmiar nie związanych przeciwciał za pomocą buforu TBS-T zawierającego Tween 20 o stężeniu 0,05%. Obecność niejonowego detergentu w buforze TBS zapobiega niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał z wykrywanym antygenem. Płukanie prowadzono przez 3-krotne przemycie błony roztworem TBS-T w ciągu 15 min.
- Wykonywano rozcieńczenia przeciwciał drugorzędowych wyznakowanych peroksydazą chrzanową w buforze TBS-T w stosunku 1:1000. Inkubowano błonę nitrocelulozową z tak sporządzonym roztworem przeciwciał przez 1 h w temperaturze pokojowej, a ich nadmiar usuwano przez 3-krotne przemycie roztworem TBS-T w ciągu 15 min.
- Błonę nitrocelulozową umieszczano w roztworze substratów dla peroksydazy chrzanowej (DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i obserwowano powstawanie brunatnego zabarwienia w miejscu rozpoznawania fimbrialnego białka adhezyny DraE przez swoiste przeciwciała.
- W momencie pojawienia się tła przerywano reakcję przez usunięcie roztworu i przepłukanie błony wodą. Następnie błonę osuszano i przechowywano bez dostępu światła.

### **5.13. Badanie zdolności białek podjednostkowych DraE rekombinantowych szczepów *E. coli* ekspresyjujących fimbrie Dr do hemaglutynacji ludzkich erytrocytów**

Do doświadczenia przygotowano zawiesinę ludzkich erytrocytów przeprowadzając następujące czynności:

- erytrocyty ludzkie odwirowywano z krwi zawierającej heparynę (środek hamujący krzepnięcie krwi) w celu oddzielenia ich od osocza,
- krwinki przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS (tak otrzymane erytrocyty przechowywano w temperaturze 4°C do dalszych doświadczeń),
- bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia erytrocyty ponownie płukano roztworem PBS (3 x 1 ml PBS) (Materiały 4.14).

Test hemaglutynacji wykonywano na szkiełku mikroskopowym z zagłębieniami. Nanoszono równe objętości zawiesiny erytrocytów i badanej próbki (20 µl). Wyniki obserwowano nieuzbrojonym okiem.

### **5.14. Ekspresja białka kanałotwórczego DraC w szczepie *E. coli* Top 10 F'/pACYCpBAD-DraC-C-His**

Ekspresję genu kodującego białko DraC z sekwencją sygnałną z plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His prowadzono kilkakrotnie, zmieniając parametry takie jak temperatura, wartość OD<sub>600</sub> w momencie indukcji, końcowe stężenie induktora arabinozy, czas prowadzenia ekspresji oraz napowietrzanie. Produkcja białka kanałotwórczego DraC-C-His była zawsze na porównywalnym poziomie niezależnie od zastosowanych warunków. Ostatecznie stosowano następujące warunki prowadzenia ekspresji:

- napowietrzanie: 250 obr./min,
- temperatura: 30°C,
- OD<sub>600</sub> w momencie indukcji: 0,6,
- końcowe stężenie arabinozy: 0,2%.,
- czas prowadzenia ekspresji: 3 h.

Sposób prowadzenia ekspresji



## METODY

---

- Zaszczepiono kolonią szczepu *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His 10 ml pożywki LB, zawierającej tetracyklinę i ampicylinę i inkubowano przez noc w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C.
- Następnie hodowlę nocną odmłodzono w 300 ml pożywki LB z tymi samymi antybiotykami i nadal prowadzono hodowlę w wytrząsarce powietrznej w tej samej temperaturze.
- Po uzyskaniu przez hodowlę odpowiedniego OD<sub>600</sub> wynoszącego 0,6 (po około 2,5 h) dokonano indukcji ekspresji dodając 0,6 g arabinozy.
- Podczas prowadzenia ekspresji zbierano próbki hodowli co godzinę po indukcji w celu przygotowania frakcji całkowitych lizatów (1,5 ml próbki wirowano 5 min przy 3000 obr./min, a osad zawieszano w 150 µl buforu TE i zamrażano).
- Po zakończeniu hodowli bakteryjnej komórki *E. coli* odwirowano przy 3000 obr./min w wirówce Sorvall, przez 20 min, a osad bakteryjny schładzano w lodzie i wykorzystywano do izolacji frakcji błon zewnętrznych.

### **5.15. Izolacja zewnętrznych błon komórkowych szczepu *E. coli* Top 10 F'/pACYCpBAD-DraC-C-His**

Frakcję zawierającą zewnętrzne błony komórkowe izolowano poprzez ekstrakcję sarkozylem [Thanassi i wsp., 2002]. Metoda ta wykorzystuje różnice we wrażliwości błony zewnętrznej i błony cytoplazmatycznej bakterii Gram-ujemnych na ten jonowy detergent. Różnica ta wynika z budowy obu błon. Większość lipidów zewnętrznej membrany to lipopolisacharydy (LPS), które mają inne właściwości niż glicerofosfolipidy budujące błonę wewnętrzną. Cząsteczka LPS zawiera 6-7 reszt kwasów tłuszczowych, które silnie między sobą oddziałują poprzez siły van der Waalsa i oddziaływania hydrofobowe. To powoduje, że trudno jest cząsteczce detergentu penetrować w przestrzenie między sąsiednimi lipopolisacharydami. Poza tym, warstwa LPS posiada większy powierzchniowy ładunek ujemny niż błona wewnętrzna. Sarkozyl posiadając prawie identyczną gęstość ładunku powierzchniowego co warstwa LPS, nie degraduje błony zewnętrznej w przeciwieństwie do błony wewnętrznej. Dlatego istnieje możliwość rozpuszczenia lipidów należących do błony cytoplazmatycznej bez naruszenia większości lipopolisacharydów błony zewnętrznej. Razem z lipidami rozpuszczają się

## METODY

---

również białka błony wewnętrznej, natomiast częściowo uszczuplona w lipidy błona zewnętrzna, zawiera niemal wszystkie białka. Ta różnicująca ekstrakcja Sarkozylem jest najczęściej stosowaną metodą izolacji białek błony zewnętrznej.

### Wykonanie

- Osad komórek uzyskany przez odwirowanie hodowli szczepu *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His (Metody 5.4) przemywano buforem A (Materiały 4.15), a następnie zawieszano w 10 ml tego samego buforu z dodatkiem 5  $\mu$ l 200 mM PMSF.
- Zawiesinę sonifikowano i następnie wirowano 15 min przy 5000 obr./min.
- Osad zawierający niezniszczone komórki usuwano, a do supernatantu dodawano 500  $\mu$ l 10% Sarkozylu i delikatnie mieszano przez 5 min w temperaturze pokojowej.
- Zawiesinę wirowano przez 1 h przy 26 000 obr./min, przy 4°C.
- Osad zawierający zewnętrzne błony komórkowe wykorzystywano do izolacji białka DraC.

### **5.16. Izolacja białka DraC-C-His z błon zewnętrznych komórek *E. coli***

- Frakcję błon zewnętrznych zawieszano w 2 ml buforu B (Materiały 4.15) i dodawano 15 mg DDM (do końcowego stężenia 0,75%) oraz 400  $\mu$ l glicerolu (do końcowego stężenia 20%), a następnie delikatnie wytrząsano przez noc, w 4°C.
- Mieszaninę wirowano przez 1 h, przy 26000 obr./min, przy 4°C. Osad usuwano, a supernatant zawierający białko DraC przechowywano w temperaturze 4°C.

### **5.17. Izolacja białek frakcji periplazmatycznej**

Izolacja frakcji periplazmatycznych komórek *E. coli* BL21(DE3) z próbek o objętości 1,5 ml prowadzona była według następującej procedury:

- 1,5 ml hodowli bakteryjnej wirowano w mikrowirówce przy 3000 obr./min, przez 10 min, a otrzymany osad komórkowy zawieszono w 100  $\mu$ l buforu sacharozowego i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej.
- Następnie zawiesinę komórek wirowano w mikrowirówce przy 4000 obr./min, przez 15 min, a uzyskany supernatant odrzucano, osad komórkowy zawieszano w 100  $\mu$ l 10 mM MgCl<sub>2</sub> i inkubowano 10 min w lodzie.

## METODY

---

- W ostatnim etapie zawiesinę komórek wirowano w mikrowirówce przy 7000 obr./min, przez 10 min, a następnie supernatant zawierający białka frakcji periplazmatycznej zbierano i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu analizy.

### 5.18. Izolacja białka podjednostkowego adhezyny DraE fimbrii Dr

- Zaszczepiono pojedynczą kolonią szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-DraB-C-His-DraE 10 ml pożywki LB, zawierającej kanamycynę i ampicylinę i inkubowano przez noc w wytrząsarce powietrznej, w temperaturze 37°C.
- Następnie hodowlę nocną odmładzono w 300 ml pożywki LB z tymi samymi antybiotykami i nadal prowadzono hodowlę w wytrząsarce powietrznej w tej samej temperaturze.
- Po uzyskaniu przez hodowlę OD<sub>600</sub> wynoszącego 0,6 (po około 2,5 h) dokonywano indukcji ekspresji dodając 0,6 g arabinozy oraz 75 µl 1 M IPTG.
- Po zakończeniu hodowli bakteryjnej komórki *E. coli* odwirowano przy 3000 obr./min, w wirówce Sorvall, przez 10 min, a osad bakteryjny zawieszano w 1,5 ml buforu PBS.
- Tak przygotowaną zawiesinę bakteryjną wortexowano przez 1 min i inkubowano w termobloku, przez 1 h, w temperaturze 65°C.
- W kolejnym etapie zawiesinę bakteryjną wirowano w wirówce Sorvall przy 6000 obr./min, przez 20 min.
- Uzyskany supernatant zbierano do jałowych probówek, a następnie białka precypitowano za pomocą 40% roztworu siarczanu amonu w buforze PBS przez noc, w temperaturze 4°C (do klarownego supernatantu dodano 40% roztworu siarczanu amonu do końcowego stężenia 20%).
- Po 24 h inkubacji wytrącone w supernatancie białka wirowano w wirówce Sorvall przy 5000 obr./min, przez 20 min, w temperaturze 4°C.
- Osad zawieszono w 3 ml buforu PBS i poddawano dializie (MWCO>100,000) do buforu PBS przez noc, w temperaturze 4°C.

## METODY

### 5.19. Oczyszczanie białek metodą chromatografii metalopowinowactwa

Sekwencje aminokwasowe, bogate w reszty histydyny, mają zdolność do wiązania kationów dwuwartościowych metali bloku d układu okresowego, np. jonów  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ . Produkowane białka fuzyjne z domenami oligohistydynowymi mogą być łatwo oczyszczane na modyfikowanych złożach agarozowych, wiążących wyżej wymienione kationy. Po związaniu białka przez złożę, płucze się je odpowiednio zbuforowanymi roztworami imidazolu o rosnącym stężeniu. Czynność ta ma na celu wypłukanie ze złoża niespecyficznie wiążących się białek. Elucji białka dokonuje się zbuforowanym roztworem imidazolu o wysokim stężeniu.

Białka rekombinantowe oczyszczano na kolumnie wypełnionej złożem  $Ni^{2+}$ -IDA (Novagen). Objętość stosowanego złoża kolumny wynosiła 4 ml, a objętość kolumny 20 ml.

Programy oczyszczania białek:

	DraC-C-His	N-DraC-C-His	Kompleksy BE	DraEdsc-N-His, DraDdsc-N-His i DraB-C-His
Bufor płuczący 1 (5 mM imidazol)	6 obj. kolumny	6 obj. kolumny	6 obj. kolumny	4 obj. kolumny
Bufor płuczący 2 (20 mM imidazol)	4 obj. kolumny	4 obj. kolumny		4 obj. kolumny
Bufor płuczący 3 (60 mM imidazol)		2 obj. kolumny		3 obj. kolumny
Bufor elucyjny (1 M imidazol)	2 x 5 ml	3 x 5 ml	2 x 5 ml	2 x 5 ml

### 5.20. Dializa frakcji i zagęszczanie

Fracje elucyjne o objętości 10 ml lub 15 ml umieszczano w woreczku dializacyjnym (MWCO 10 kDa; Sigma). Dializę prowadzono w buforze dializacyjnym (Materiały 4.18) w temperaturze 8°C przez dobę. Frakcje białek przenoszono do kolumnienki wirowniczej (MWCO 10 kDa – N-DraC-C-His lub 30 kDa – DraC-C-His) i zagęszczano dziesięciokrotnie (DraC-C-His-His) lub dwudziestokrotnie (N-DraC-C-His) w wirówce Sorvall przy 5000 obr./min.

### 5.21. Analiza domeny N-terminalnej białka DraC techniką IR

Widma zmierzone zostały w aparacie Nicole 8700 firmy Thermo, znajdującym się w Katedrze Chemii Fizycznej Politechniki Gdańskiej. Przygotowany zliofilizowany

## METODY

---

preparat białkowy rozpuszczano w ciężkiej wodzie (Sigma), a następnie odwirowywano, w celu usunięcia stałych zanieczyszczeń. Próbkę (około 25  $\mu$ l) umieszczano w termostатовanej kuwecie transmisyjnej z okienkami z fluorku wapnia, z przekładkami grubości 56  $\mu$ m. Pomiarów dokonywano z rozdzielczością 4  $\text{cm}^{-1}$ , uśredniając za każdym razem 64 niezależne skany. Widma tła mierzone były przed każdym pomiarem próbki.

Widma mierzone były w zakresie około 30 – 80°C (do temperatury 50°C co około 5°C, powyżej 50°C co około 2°C). Zmierzone widma korygowano ze względu na obecność pary wodnej oraz wygładzono z wykorzystaniem algorytmu Savitzky-Golaj (liczba punktów – 7, szerokość – 13). Drugie pochodne widm, wykorzystywane w analizie, uzyskane zostały z wykorzystaniem algorytmu Savitzky-Golaj (liczba punktów – 13, rząd wielomianu – 3).

### 5.22. Hodowla linii komórkowej HeLa

Komórki linii HeLa o gęstości  $10^6/\text{ml}$ , przesiane do 6-dołkowych płytek (zaopatrzonych w szkiełka nakrywkowe), hodowano w pożywce hodowlanej MEM (*ang.* Minimal Essential Medium) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej oraz roztworu penicyliny i streptomycyny, w 37°C, w 5% atmosferze  $\text{CO}_2$ , przez 18 h (Materiały 4.19). Po tym czasie hodowle komórkowe przepłukiwano dwa razy buforem PBS.

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

Do badania adhezji komórek bakteryjnych do komórek linii HeLa wykorzystano hodowle następujących szczepów *E. coli*: BL21(DE3), BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE, BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys100mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE, BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE, BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

Ekspresję genów kodujących odpowiednie białka prowadzono według procedury zawartej w punkcie 5.9. Po 2 h od indukcji ekspresji komórki bakterii odwirowywano, a osady bakterii przepłukiwano trzykrotnie 1 ml buforu PBS i rozcieńczano w buforze PBS do  $\text{OD}_{600}=1,7$  ( $5 \times 10^4$  CFU/ml). Następnie przygotowane zawiesiny bakterii rekombinantowych szczepów *E. coli* w buforze PBS inkubowano z komórkami linii HeLa.

Barwienie metodą Giemsy

## METODY

---

Do hodowli komórkowej linii HeLa (Metody 5.22) dodawano hodowle bakteryjne odpowiednich szczepów rekombinantowych. Po 2 h inkubacji (37°C, 5% atmosfera CO<sub>2</sub>) komórek HeLa z bakteriami, komórki przepłukiwano buforem PBS, utrwalano 70% roztworem metanolu przez 10 min. Po tym czasie szkiełka mikroskopowe osuszano i barwiono preparaty przy użyciu 10% roztworu Giemsa przez 3 min (Materiały 4.19). Wybarwione preparaty płukano 3-krotnie buforem PBS, a następnie suszono na powietrzu. Preparaty analizowano z wykorzystaniem mikroskopu Olympus BX-60.

### Metoda ELISA

Hodowlę komórek linii HeLa prowadzono według punktu 5.22, z tą różnicą, że płytki były 96-dołkowe, a hodowle komórkowe płukano dwa razy pożywką MEM. Po dodaniu do nich hodowli bakteryjnych odpowiednich szczepów rekombinantowych i 2 h inkubacji (37°C, 5% atmosfera CO<sub>2</sub>), komórki trzykrotnie płukano buforem płuczającym, utrwalano 3% roztworem formaliny i ponownie 3-krotnie płukano buforem płuczającym. Następnie komórki zawieszano w buforze blokującym i inkubowano przez noc, w temperaturze 4°C. Po dwukrotnym przepłukaniu buforem płuczającym, komórki inkubowano z przeciwciałami króliczymi anti-DraE (rozcieńczenie 1:500 w buforze blokującym), przez 40 min, w temperaturze 37°C, a następnie z przeciwciałami anti-króliczymi-HRP (rozcieńczenie 1:5000 w buforze blokującym, 40 min, w 37°C). Po inkubacji, komórki płukano buforem płuczającym. Detekcję komórek bakteryjnych związanych z komórkami linii HeLa dokonywano poprzez 40 min inkubację komórek zawieszonych w wodzie jałowej z substratem dla peroksydazy chrzanowej O-fenylo-diaminą i wodą utlenioną mocznikową, w 37°C. Reakcję zatrzymywano 2 N kwasem siarkowym i odczytywano absorbancję przy długości fali 490 nm.

### **5.24. Badanie adhezji fimbrii Dr opłaszczonych na kulkach fluorescencyjnych do komórek linii HeLa**

Pobierano 0,5 ml kulek fluorescencyjnych z 2,5% zawiesiny do probówki Eppendorfa i uzupełniano 0,1 M buforem boranowym i intensywnie mieszano. Po odwirowaniu kulek (5 min, 4000 obr./min), usuwano supernatant, a osad zawieszano w 1 ml buforu boranowego. Do tak przygotowanych kulek dodawano 100 µl frakcji fimbrialnych (Metody 5.18) i inkubowano z mieszaniem przez noc, w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu, osad zawieszano w 1 ml buforu boranowego z dodatkiem

## METODY

---

BSA (10 mg/ml) i inkubowano 1 h, w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Po odwirowaniu osad zawieszano w buforze do zawieszania (Materiały 4.21) i przechowywano w lodówce do czasu analizy.

Hodowlę komórkową linii HeLa (Metody 5.22) utrwalano 3% paraformaldehydem, po czym trzykrotnie płukano buforem PBS i inkubowano z 40  $\mu$ l zawiesiną kulek fluorescencyjnych opłaszczonych fimbriami Dr (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Stężenie białek frakcji fimbrialnej izolowanej z komórek produkujących DraC dzikiego typu wynosiło 306  $\mu$ g/ml, a dla komórek mutantów DraC-Phe4/Ala, DraC-Cys64/Ala, DraC-Cys100/Ala i DraC-Trp142/Ala wynosiło odpowiednio 121, 132, 163 i 30  $\mu$ g/ml. Po upływie 2 h inkubacji całość dwukrotnie płukano buforem PBS. Preparaty oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX60).

### **5.25. Badanie oddziaływań między białkami z zastosowaniem mikrokalorimetrii izotermalnej**

Do celki pomiarowej o pojemności 1,3 ml, w której znajdowało się po 20  $\mu$ M białka DraEdsc-N-His, DraDdsc-N-His lub DraB-C-His, przy użyciu precyzyjnej strzykawki o pojemności 250  $\mu$ l, w założonych odstępach czasu (300 s), wprowadzano 100  $\mu$ l (po 10  $\mu$ l) 260  $\mu$ M białka N-DraC-C-His. Strzykawka posiadała mieszadło, które pozwalało na szybkie i dokładne mieszanie (200 rpm). Wszystkie próbki przed pomiarem zostały odgazowane pod próżnią. Eksperymenty prowadzono w temperaturze 25°C. Po dodaniu każdorazowo objętości białka N-DraC-C-His następuje pomiar mocy wymaganej do utrzymania stałej temperatury między celkami, która następnie przeliczana jest na ciepło reakcji. Ciepło reakcji oddziaływania liganda z substancją miareczkowaną szacuje się na podstawie cyklu doświadczeń:

- 1) miareczkowanie bufor-bufor (poprawka wynikająca z różnicy temperatur);
- 2) miareczkowanie bufor-białko (poprawka związana z efektem rozcieńczenia);
- 3) miareczkowanie białko- bufor (poprawka związana z efektem rozcieńczenia);
- 4) miareczkowanie białko-białko.

Po odjęciu sumy efektów cieplnych z trzech pierwszych w/w eksperymentów od efektu cieplnego ostatniego doświadczenia uzyskuje się ciepło reakcji.

## 6. WYNIKI

### 6.1. Analiza sekwencyjna zewnątrzblonowych białek kanałotwórczych rodziny FUP

Białka kanałowe błony zewnętrznej należą do rodziny białek FUP i reprezentują jeden z najważniejszych, lecz najmniej poznanych elementów „maszyny” szlaku sekrecji typu „chaperone/usher”. Jednymi z lepiej poznanych białek kanałowych tego szlaku są białka FimD i PapC, determinujące ekspresję na powierzchni bakterii odpowiednio heteropolimerycznych pili typu 1 i typu P. Białko DraC, będące miejscem polimeryzacji homopolimerycznych fimbrii Dr, jest homologiem wymienionych białek i jest jak dotąd mało poznane.

Przeprowadzono porównawczą analizę sekwencyjną białek rodziny FUP w celu wyznaczenia kluczowych reszt aminokwasowych dla białka DraC mogących mieć wpływ na jego funkcję. Do analizy wybrano sekwencje 14 białek FUP (Tab. 1), z których siedem bierze udział w biogenezie struktur adhezyjnych typu FGL: DraC, AggC, CS3-2, Caf1A, MyfC, PsaC oraz SefC, a pozostałe siedem w biogenezie struktur adhezyjnych typu FGS: HifC, PmfC, MrpC, SfaF, FocD, FimD oraz PapC.

**Tab. 1.** Zestawienie sekwencji białek FUP poddanych analizie.

Podrodzina	Białko „usher”	Numer sekwencji w NCBI
FGS	PapC	AAY82874
	FimD	CAA35968
	SfaF	ABE06596
	FocD	CAA86605
	HifC	CAA83902
	Mrpc	CAA83635
	PmfD	P53514
FGL	MyfC	CAA79953
	PsaC	ABK63799
	CS3-2	P15484
	Caf1A	CAA43968
	SefC	P33388
	AggC	P46005
	DraC	AAK16477



## WYNIKI

Tabela 2 przedstawia zestawienie informacji na temat źródła izolacji poszczególnych białek FUP, struktury morfologicznej układu adhezyjnego oraz danych dotyczących jednostki chorobotwórczej, skorelowanej z danym czynnikiem wirulencji.

**Tab. 2.** Struktury adhezyjne obecne na powierzchni komórek bakteryjnych wraz z elementami maszynerii uczestniczącymi w szlaku „chaperone-usher”.

Podrodzina	Rodzaj struktury	Białko chaperone/usher	Organizm	Operon	Wywoływana choroba
FGS	P pile	PapD/PapC	<i>E. coli</i>	<i>pap</i>	zapalenie pęcherza moczowego; ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek
	pile typu 1	FimC/FimD	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>fim</i>	ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek
	S pile	SfaE/SfaF	<i>E. coli</i>	<i>sfa</i>	infekcje układu moczowego, zapalenie opon mózgowych
	F1C pile	FocC/FocD	<i>E. coli</i>	<i>foc</i>	ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek
	F1C pile	HifB/HifC	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>hif</i>	zapalenie ucha
	MR/P pile	MrpD/MrpC	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>mrp</i>	infekcje układu moczowego
	PMF pile	PmfC/PmfD	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>pmf</i>	infekcje układu moczowego
FGL	Myf fimbrie	MyfB/MyfC	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>myf</i>	zapalenie okrężnicy
	Antygen pH 6	PsaB/PsaC	<i>Yersinia pestis</i>	<i>psa</i>	dżuma
	CS3 pile	CS3-1/CS3-2	<i>E. coli</i>	<i>cs3</i>	biegunka
	Powierzchniowy antygen F1	Caf1M/Caf1A	<i>Yersinia pestis</i>	<i>caf</i>	dżuma
	Fimbrie SEF14	SefB/SefC	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>sef</i>	nieżyt żołądka i jelit
	AAF I	AggD/AggC	<i>E. coli</i>	<i>agg</i>	biegunka
	Fimbrie rodziny Dr	DraB/DraC	<i>E. coli</i>	<i>dra</i>	Infekcje układu moczowego

Analizę porównawczą otrzymanych sekwencji prowadzono w programie ClustalX wersja 1.8. Wygenerowaną przez program ClustalX analizę edytowano w programie GeneDoc do formatu rtf rozpoznawanego przez program Word.

## WYNIKI

---

W celu uwidocznienia możliwych w rodzinie białek FUP trendów sekwencyjnych i strukturalnych, związanych z podziałem struktur adhezyjnych na rodziny FGS i FGL, analizę sekwencyjną przeprowadzono w trzech układach. W pierwszym poddano analizie porównawczej wszystkie 14 sekwencji celem detekcji podstawowych wyznaczników charakterystycznych dla całej rodziny FUP (Zał. 1). Dwie pozostałe analizy zostały przeprowadzone w obrębie sekwencji białek „usher” biorących udział odpowiednio w biogenezie struktur adhezyjnych typu FGL (Zał. 2) oraz FGS (Zał. 3). W przypadku wszystkich analiz na rysunkach naniesiono informacje literaturowe dotyczące struktury i funkcji białek kanałotwórczych FimD oraz PapC.

Analizie poddano sekwencje białek w postaci pre-białek zawierających sekwencję sygnałną typu sec. Długość sekwencji badanych białek waha się od 814 reszt aminokwasowych w przypadku białka SefC *E. coli* do 882 reszt w przypadku białka SfaF *E. coli*. Przy czym obserwowane delecje i insercje występujące w poszczególnych białkach mają charakter lokalny i są rozproszone. W efekcie przeprowadzonej analizy jednoznacznie można stwierdzić, iż wszystkie białka FUP charakteryzują się identyczną strukturą III-rzędową, składającą się z trzech podstawowych domen wskazanych na podstawie badań białek FimD i PapC.

Z przeprowadzonej analizy wynika, iż znaczną homologię sekwencyjną wykazuje region domeny transmembranowej. W jej obrębie można wyróżnić najwięcej reszt aminokwasowych, zakonserwowanych wśród wszystkich badanych białek. Większość tych reszt jest zlokalizowana w obrębie sekwencji, wykazującej strukturę drugorzędową typu  $\beta$ -nici lub w jej pobliżu. Te wysoce zakonserwowane reszty, które stanowią część  $\beta$ -nici wykazują charakter hydrofobowy (I, L, V, M) bądź aromatyczny (F, Y, W). Na brzegach sekwencji wykazujących strukturę  $\beta$ -nici występują zakonserwowane reszty glicyny oraz proliny. Nietypowa budowa tych reszt decyduje o ich obecności w obrębie terminalnych końców  $\beta$ -nici. Glicyna, ze względu na brak reszty bocznej, wykazuje najmniejsze zatłoczenie steryczne oraz największą swobodę rotacji. Z tego powodu jej obecność jest pożądana w miejscach wymagających skrętu łańcucha polipeptydowego, między innymi w momencie przejścia struktury  $\beta$ -nici w motyw pętlowy. Natomiast reszty proliny, obecne na końcach  $\beta$ -nici, odpowiedzialne są za zagięcie łańcucha polipeptydowego oraz za usztywnienie struktur drugorzędowych. W rejonach  $\beta$ -nici

## WYNIKI

---

obecne są również reszty aminokwasowe o charakterze zasadowym (R, K), wykazujące różny stopień homologii. Tego typu reszty, występujące w strukturach  $\beta$ -nici transmembranowej  $\beta$ -beczki, odpowiedzialne są za tzw. stabilizację hydrofobową na powierzchni. Ten typ stabilizacji charakterystyczny jest dla reszt aminokwasowych posiadających łańcuch boczny zbudowany z długiego alifatycznego wysięgnika zakończonego grupą jonową. Alifatyczny fragment stabilizuje hydrofobowy rdzeń białka (lub oddziałuje z hydrofobową błoną), natomiast reszta boczna jest skierowana do rozpuszczalnika. Tego typu silnie zakonserwowane reszty w białkach FUP zlokalizowane są na końcach transmembranowych  $\beta$ -nici, gdzie konieczne jest zarówno oddziaływanie z błoną, jak i z rozpuszczalnikiem. Obserwowane zakonserwowanie w obrębie domeny transmembranowej dotyczy głównie reszt, które gwarantują zachowanie struktury transmembranowej  $\beta$ -beczki. Znaczące zróżnicowanie dotyczy głównie fragmentów pętlowych, a w szczególności ich długości.

Analiza periplazmatycznej domeny N-terminalnej białek FUP zostanie omówiona w następnym rozdziale. Sekwencyjna analiza porównawcza regionu C-terminalnej domeny periplazmatycznej jest utrudniona ze względu na skąpe dane literaturowe dotyczące jej funkcji i struktury. Cechą charakterystyczną dla całej rodziny białek FUP w tym regionie jest obecność mostka disiarczkowego stabilizującego strukturę tej domeny.

Załączniki 2 i 3 przedstawiają sekwencyjne analizy porównawcze białek „usher” zaangażowanych w biogenezę struktur adhezyjnych odpowiednio typu FGS i FGL. Widoczny jest wyraźnie wyższy poziom identyczności sekwencji białek FUP w obrębie obu podrodzin. Sugeruje to jednoznacznie, iż podobnie, jak w przypadku rodziny białek opiekuńczych, również w odniesieniu do białek FUP można mówić o adaptacji strukturalnej (sekwencyjnej), związanej z biogenezą struktur adhezyjnych o morfologii typu FGS lub FGL. Rysunek 12 przedstawia zestawienie w postaci macierzy danych liczbowych dotyczących podobieństwa sekwencji analizowanych białek FUP. Widać, iż badane sekwencje grupują się w dwie odrębne grupy. Jedna z nich obejmuje białka FUP biorące udział w biogenezie struktur adhezyjnych typu FGS, a druga białka biorące udział w biogenezie struktur typu FGL. W przypadku białek FUP typu FGL poziom identyczności waha się od 71% (MyfC *Y. enterocolitica* – PsaC *Y. pestis*), do 32% (Caf1A

## WYNIKI

*Y. pestis* – SefC *S. enteritidis*), a poziom podobieństwa od 81% (MyfC *Y. enterocolitica* – PsaC *Y. pestis*) do 51% (MyfC *Y. enterocolitica* - SefC *Y. pestis*).

	FGL						FGS						
	AggC	DraC	MyfC	PsaC	Caf1A	SefC	SfaF	FocD	FimD	PapC	MrpC	PmfC	HifC
<b>AggC</b>	842 0	65% 79%	39% 58%	38% 59%	38% 61%	34% 55%	30% 49%	30% 50%	27% 46%	22% 37%	20% 37%	19% 37%	23% 41%
<b>DraC</b>	563 681	859 0	41% 59%	40% 60%	41% 61%	36% 55%	31% 49%	31% 50%	29% 47%	22% 37%	21% 38%	20% 37%	23% 41%
<b>MyfC</b>	341 507	358 522	841 0	71% 81%	37% 58%	33% 51%	29% 48%	29% 48%	29% 47%	23% 40%	19% 38%	20% 37%	23% 41%
<b>PsaC</b>	335 507	355 524	608 694	823 0	36% 58%	33% 52%	30% 48%	30% 48%	30% 47%	24% 41%	20% 36%	20% 37%	23% 41%
<b>Caf1A</b>	328 523	360 533	326 500	315 500	833 0	32% 52%	28% 49%	28% 49%	29% 46%	22% 40%	19% 37%	21% 39%	24% 42%
<b>SefC</b>	298 475	315 483	285 444	285 448	272 447	814 0	27% 46%	27% 47%	25% 44%	22% 39%	19% 37%	22% 40%	23% 43%
<b>SfaF</b>	278 456	290 457	265 443	274 436	260 449	248 423	892 0	95% 96%	55% 72%	23% 39%	24% 41%	22% 40%	26% 44%
<b>FocD</b>	276 453	288 452	261 436	272 433	256 444	248 420	856 859	875 0	56% 72%	24% 39%	24% 42%	22% 41%	26% 44%
<b>FimD</b>	246 416	263 433	261 430	269 420	264 421	231 397	500 654	494 642	876 0	23% 38%	23% 40%	24% 41%	25% 42%
<b>PapC</b>	195 326	201 332	203 353	210 359	196 351	194 345	215 360	216 359	213 347	836 0	43% 62%	39% 60%	22% 39%
<b>MrpC</b>	184 337	196 350	181 350	188 331	177 334	172 332	229 394	229 393	217 371	380 554	871 0	38% 58%	23% 39%
<b>PmfC</b>	173 329	181 331	178 329	178 325	186 338	191 347	205 372	204 370	216 375	337 512	341 515	828 0	21% 39%
<b>HifC</b>	209 365	211 366	208 362	201 355	209 366	199 369	244 405	240 402	228 379	196 341	208 355	180 337	837 0

**Rys. 12.** Zestawienie w postaci macierzy danych liczbowych dotyczących podobieństwa sekwencji analizowanych zewnątrzłonowych białek kanałotwórczych FUP (dotyczy analizy sekwencyjnej przedstawionej w załączniku 1). Wartość górna w dwuczłonowej kolumnie prezentuje stopień identyczności porównywanych sekwencji, natomiast dolna stopień podobieństwa. Po lewej stronie linii umieszczone są wartości mierzone w liczbie reszt aminokwasowych, po prawej natomiast dane procentowe. Kolorem czerwonym i zielonym zaznaczono regiony macierzy, w których grupują się białka FUP tworzące odpowiednio podrodzinę FGL i FGS. Analiza wykonana z wykorzystaniem programu GenDoc.

## WYNIKI

---

W przypadku białek „usher” typu FGS obserwuje się podobny poziom identyczności i podobieństwa (identyczność od 95% do 23%, podobieństwo od 96% do 38%). Najwyższa wartość identyczności i podobieństwa pomiędzy obiema rodzinami białek FUP wynosi odpowiednio: 31% (DraC *E. coli* - FocD *E. coli*) oraz 50% (DraC *E. coli* – FocD *E. coli* i AggC *E. coli* – FocD *E. coli*). Natomiast najniższa wartość identyczności i podobieństwa pomiędzy dwoma wyodrębnionymi grupami białek FUP wynosi odpowiednio 19% (AggC *E. coli* – PmfC *P. mirabilis*) oraz 37% (w 9 przypadkach).

Przedstawione analizy sekwencyjne wskazują na dużą homologię w obrębie całej rodziny białek FUP. Wskazuje ona na istnienie jednego ogólnego mechanizmu funkcjonowania tych białek w szlaku biogenezy struktur adhezyjnych typu „chaperone – usher”. Mechanizm ten oparty jest o trój-domenową budowę białek FUP i można przyjąć, iż dla wszystkich białek jest on zgodny z mechanizmem funkcjonowania zaproponowanym dla białka FimD oraz PapC. Przeprowadzona analiza wskazuje jednocześnie na występowanie w rodzinie FUP preferencji strukturalnych, związanych z typem struktury adhezyjnej, w którego biogenezie dane białko „usher” uczestniczy. Podobnie jak w przypadku białek opiekuńczych prowadzi to do podziału rodziny białek FUP na dwie podrodziny. Podział ten dokładnie odpowiada podziałowi białek opiekuńczych na podrodziny FGS i FGL. Jednoznaczne wskazanie elementów sekwencyjnych pozwalających na określenie przynależności danego białka FUP do konkretnej podrodziny jest stosunkowo trudne. Wynika to bezpośrednio z braku danych strukturalnych dotyczących białek FUP. Druga trudność jest związana z wielkością białek FUP i trudnością weryfikacji istotności obserwowanej tendencji sekwencyjnej. Sytuację tę mogą zmienić badania nad własnościami mutantów różnych białek FUP.

### **6.2. Analiza sekwencyjna N-terminalnej domeny białek rodziny FUP**

Kluczowym etapem inicjacji procesu biogenezy struktur adhezyjnych typu „chaperone – usher” jest rozpoznanie oraz wiązanie przez N-terminalną domenę białka kanałotwórczego kompleksu binarnego białka opiekuńczego oraz podjednostki strukturalnej. Domena N-terminalna jest w dużym stopniu zaangażowana w proces tworzenia struktur adhezyjnych na tym etapie. W przypadku domeny N-terminalnej

## WYNIKI

---

białka FimD dostępne są dane strukturalne, które pozwalają na określenie roli poszczególnych regionów w procesie stabilizacji struktury domeny oraz jej funkcji w biogenezie struktur adhezyjnych. W bazie struktur białkowych, Protein Data Bank, zdeponowane są trzy struktury N-terminalnej domeny białka FimD. Struktura o kodzie PDB 1ZE3 zawiera współrzędne koordynacyjne kompleksu potrójnego FimD<sub>N</sub>/FimC/FimH. Na podstawie struktury kompleksu można określić reszty aminokwasowe białka FimD<sub>N</sub> zaangażowane w oddziaływania z kompleksem białko opiekuńcze FimC – podjednostka adhezyjna FimH. W strukturze tej daje się zaobserwować sekwencję 25 N-terminalnych reszt aminokwasowych niewidocznych w dwóch pozostałych strukturach. Region ten jest bezpośrednio zaangażowany w oddziaływania z kompleksem binarnym. Struktura o kodzie PDB 1ZDV zawiera współrzędne koordynacyjne regionu N-terminalnej domeny białka FimD od reszty 25 do 139. Unikalną cechą tej struktury jest obecność regionu zawiasowego (reszty od 126 do 139) łączącego rdzeń białka FimD<sub>N</sub> z domeną transmembranową. Na podstawie właśnie tej struktury zaproponowano mechanizm funkcjonowania domeny FimD<sub>N</sub> w procesie translokacji podjednostek strukturalnych przez transbłonowy kanał. Struktura o kodzie PDB 1ZDV zawiera współrzędne koordynacyjne regionu domeny FimD<sub>N</sub> od reszty 25 do 125 i jako taka nie wnosi żadnych informacji w stosunku do struktur 1ZE3 i 1ZDV.

W załącznikach 4, 5 i 6, przedstawiających analizę porównawczą sekwencji aminokwasowych białek FUP w rejonie odpowiadającym N-terminalnej domenie białka FimD, naniesiono oznaczenia subdomen: N-terminalnego peptydu, rdzenia, zawiasu, struktur II-rzędowych oraz zaznaczono reszty aminokwasowe istotne z punktu widzenia funkcjonowania domeny. Taka korelacja analizy sekwencyjnej z danymi strukturalnymi pozwala jednoznacznie określić molekularną przyczynę zakonserwowania danej reszty aminokwasowej. W załączniku 4, przedstawiającym porównanie 14 białek FUP z podrodzin FGS i FGL w rejonie odpowiadającym domenie FimD<sub>N</sub> można zauważyć kilka motywów sekwencyjnych, zakonserwowanych w całej rodzinie. 100% zakonserwowania wykazują dwie reszty cysteiny występujące w subdomenie rdzenia domeny FimD<sub>N</sub>. Tworzą one zakonserwowany mostek disiarczkowy, stabilizujący strukturę całej domeny. Również 100% poziom zakonserwowania wykazuje reszta Trp w rejonie subdomeny zawiasu. W rejonie bezpośrednio za resztą Trp znajduje się 10 aminokwasowa

sekwencja charakteryzująca się dużym poziomem zakonserwowania. Jest to prawdopodobnie związane z istotnością tej sekwencji w odpowiednim pozycjonowaniu reszty Trp oraz tworzeniu funkcjonalnego złącza z domeną transmembranową. Znaczący poziom podobieństwa obserwuje się również w rejonie reszt aminokwasowych tworzących w obrębie rdzenia domeny FimD<sub>N</sub> hydrofobową kieszeń oddziałującą z zakonserwowaną resztą Trp subdomeny zawiasu. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej jest również znaczące w przypadku reszt aminokwasowych, które w domenie FimD<sub>N</sub> oddziałują z białkiem opiekuńczym i podjednostką strukturalną. Reszty te są głównie zgrupowane w obrębie N-terminalnego peptydu (reszty od 1 do 24) oraz N-końcowego regionu rdzenia domeny FimD<sub>N</sub>. Pozostałe reszty rejonu domeny FimD<sub>N</sub> wykazujące wysoki poziom podobieństwa mają w większości charakter czysto strukturalny, związany ze stabilizacją hydrofobowego rdzenia domeny, bądź też stanowią tzw. zworniki steryczne, gwarantując odpowiedni przebieg przestrzenny łańcucha polipeptydowego.

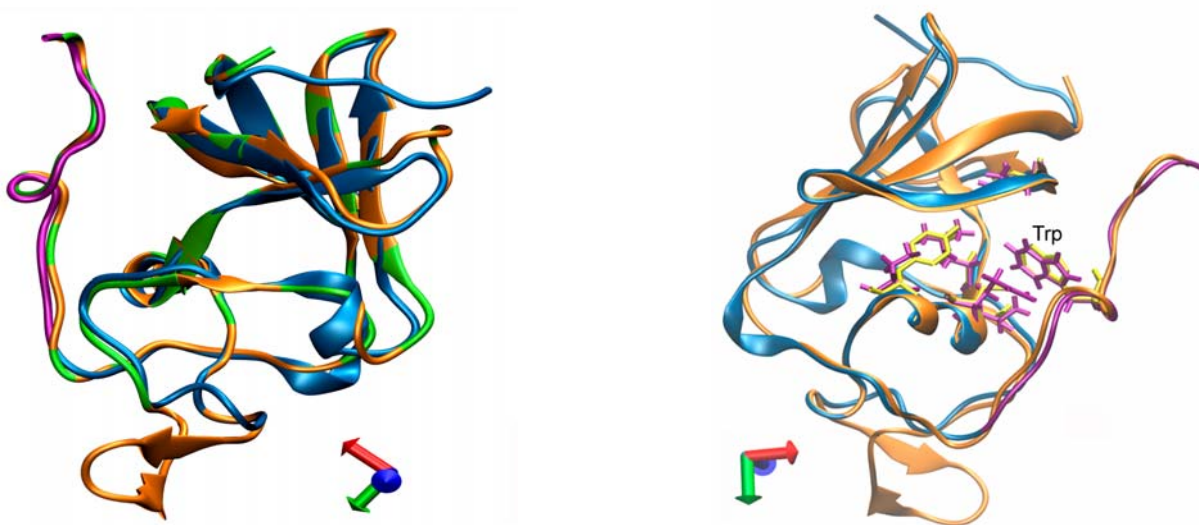
Podsumowując, analiza sekwencyjna przeprowadzona dla białek FUP jasno wskazuje, iż funkcja i struktura periplazmatycznej domeny N-terminalnej tych białek jest silnie zakonserwowana ewolucyjnie. Z drugiej strony, analizy prowadzone w obrębie podrodzin FGS i FGL struktur adhezyjnych wykazują wyższy poziom identyczności niż analiza globalna pomiędzy podrodzinami. Wskazuje to na istnienie pewnych adaptacji strukturalnych w obrębie obu podrodzin, predysponujących dane białka FUP do biogenezy struktur adhezyjnych typu FGS lub FGL. Szczególnie zaznacza się wydłużenie regionu pętlowego łączącego  $\alpha$ -helisy 2 i 3 w rejonie rdzeniowym domeny N-terminalnej białek FUP typu FGL (np.: DraC). Obserwowane w analizie sekwencyjnej różnice pomiędzy dwiema podrodzinami białek FUP mogą mieć istotny charakter mechanistyczny. Jednak, aby tego dowieść, należy przeprowadzić badania z wykorzystaniem mutagenezy ukierunkowanej, tworząc odpowiednie formy mutantowe białka DraC, co jest jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej.

### **6.3. Modelowanie homologiczne N-terminalnej domeny białka DraC**

W celu lepszego zobrazowania poziomu identyczności pomiędzy białkami FUP podrodzin FGS i FGL w rejonie periplazmatycznej N-terminalnej domeny

## WYNIKI

przeprowadzono modelowanie homologiczne. Proces modelowania przeprowadzono na zewnętrznym serwerze, korzystając z programu SWISS-Model W (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>). Modelowaniu poddano rejon sekwencji białka DraC (FUP typu FGL) wyznaczony na podstawie analizy sekwencyjnej jako homologiczny do domeny N-terminalnej białka FimD (FUP typu FGS), dla której dostępne są dane strukturalne. Przeprowadzono dwa modelowania, raz stosując jako matrycę strukturę FimD<sub>N</sub>, reszty od 25 do 139 (kod PDB 1ZDV), w drugim przypadku jako matrycę zastosowano strukturę domeny FimD<sub>N</sub> (reszty od 1 do 125), znajdującej się w kompleksie potrójnym z białkami FimC i FimH (kod PDB 1ZE3). W wyniku modelowania uzyskano dwie struktury N-terminalnej domeny białka DraC. Struktura uzyskana na matrycy 1ZDV przedstawia subdomenę rdzeniową oraz zawiasową N-terminalnej domeny białka DraC (Rys. 13). Strukturę tej domeny z widocznym fragmentem N-terminalnym zaangażowanym w oddziaływanie z kompleksem podwójnym FimC/FimH przedstawia Rys. 14.



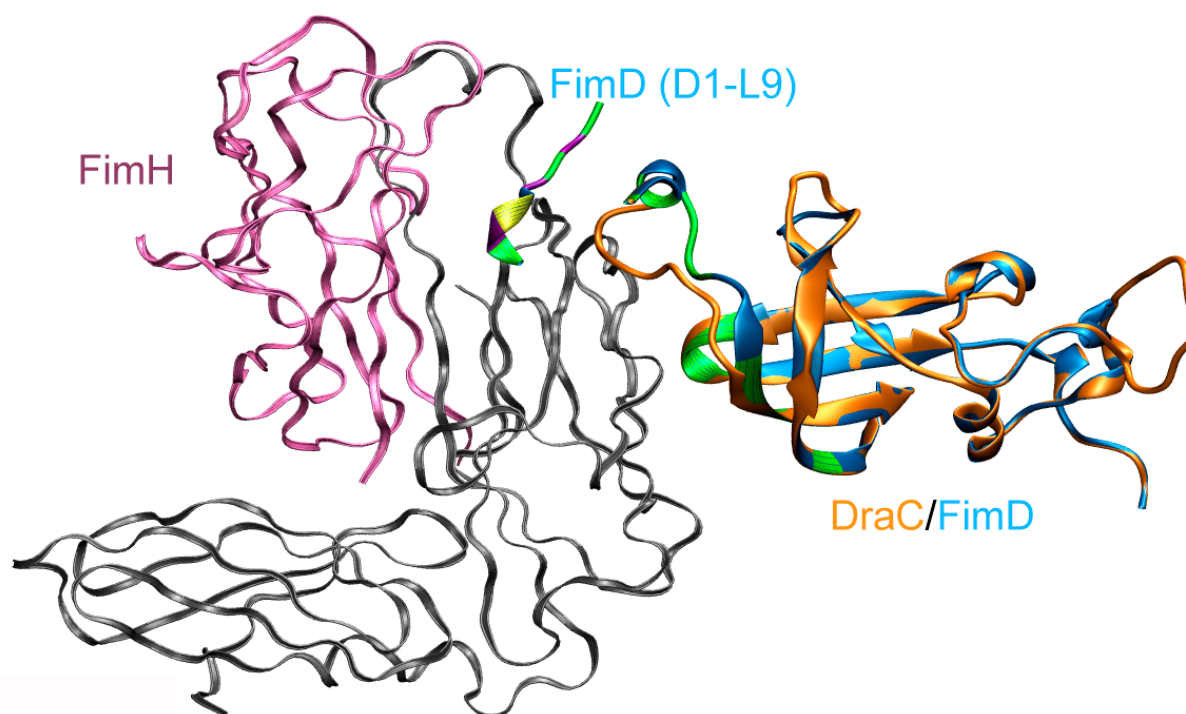
**Rys. 13.** Nałożenie struktury N-terminalnej domeny białka FimD (reszty 25-139, kod PDB 1ZDV) z otrzymanym na podstawie tej struktury modelem N-terminalnej domeny białka DraC (matryca 1ZDV). Kolorem pomarańczowym oznaczona została domena białka DraC. Kolorem niebieskim zaznaczono rdzeniową domenę białka FimD, a kolorem purpurowym jego region zawiasowy. Kolorem zielonym zaznaczono reszty białka DraC wykazujące wysokie podobieństwo w stosunku do odpowiednich reszt w białku FimD<sub>N</sub>. Modelem patyczkowym zaznaczono reszty aminokwasowe hydrofobowej kieszeni i resztę Trp w białku FimD<sub>N</sub> – kolor purpurowy i białku DraC – kolor żółty.



## WYNIKI

Procent identyczności sekwencji aminokwasowej w modelowanym regionie białka DraC w stosunku do zastosowanej matrycy 1ZE3 wyniósł 34%, a matrycy 1ZDV 37%. Wskazuje to na dużą wiarygodność otrzymanych modeli. Należy jednak pamiętać, iż wygenerowane modele są w znacznym stopniu wymuszone strukturą matrycy i jako takie nie mogą służyć do wnioskowania na temat funkcji poszczególnych reszt aminokwasowych.

A



**Rys. 14.** Nałożenie struktury fragmentu domeny N-terminalnej białka FimD o długości od 1 do 125 reszty aminokwasowej oraz modelu struktury N-terminalnej domeny białka DraC, uzyskanego w wyniku modelowania molekularnego (matryca 1ZE3). Kolorem pomarańczowym zaznaczona została N-terminalna domena białka DraC, a kolorem niebieskim N-terminalna domena białka FimD. Reszty aminokwasowe FimD<sub>N</sub> oddziałujące jednocześnie z podjednostką strukturalną FimH i białkiem opiekuńczym FimC zostały zaznaczone na fioletowo, reszty oddziałujące tylko z białkiem opiekuńczym na zielono, z samą podjednostką na żółto. Kolorem purpurowym oznaczono strukturę białka opiekuńczego FimC, kolorem szarym podjednostkę strukturalną FimF.

Uzyskane modele w sposób przestrzenny obrazują regiony, dla których istotne są ich własności fizykochemiczne – hydrofobowość, hydrofilowość. Szczególnie dobrze jest

to widoczne w przypadku analizy reszt tworzących hydrofobową kieszeń w rejonie rdzeniowym, oddziałującą z silnie zakonserwowanym Trp subdomeny zawiasu. Lokalizacja na otrzymanych modelach zakonserwowanych w obrębie N-terminalnej domeny białek FUP reszt aminokwasowych o potencjalnym charakterze stabilizacji struktury pozwala na jednoznaczne potwierdzenie takiej ich funkcji.

Powyższe analizy i modelowanie molekularne stały się podstawą wytypowania odpowiednich mutantów alaninowych białka DraC dla badań reszt aminokwasowych białka zaangażowanych w oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna.

#### **6.4. Konstrukcja modelu doświadczalnego do badań *in vivo***

Dla badania oddziaływań kompleksu białko opiekuńcze DraB-podjednostka strukturalna DraE z kanałotwórczym białkiem DraC i jego formami mutantowymi oraz wyznaczenia kluczowych reszt aminokwasowych w sekwencji białka DraC odpowiedzialnych za to oddziaływanie należało stworzyć odpowiedni model badawczy. W tym celu skonstruowano szczep *E. coli* BL21(DE3) niosący dwa plazmidy rekombinantowe: pACYCpBAD-sygDraC-C-His, ekspresyjny białko „usher” DraC z domeną oligohistydynową na C-końcu oraz pET30-sygDraB-C-His-DraE [Piątek i wsp., 2005], ekspresyjny do przestrzeni periplazmatycznej białka DraB i DraE. Te dwa plazmidy posiadają różne *ori* replikacji, dlatego mogą współistnieć w jednej komórce bakteryjnej. Taki szczep bakteryjny powinien produkować na powierzchni komórek funkcjonalne fimbrie Dr.

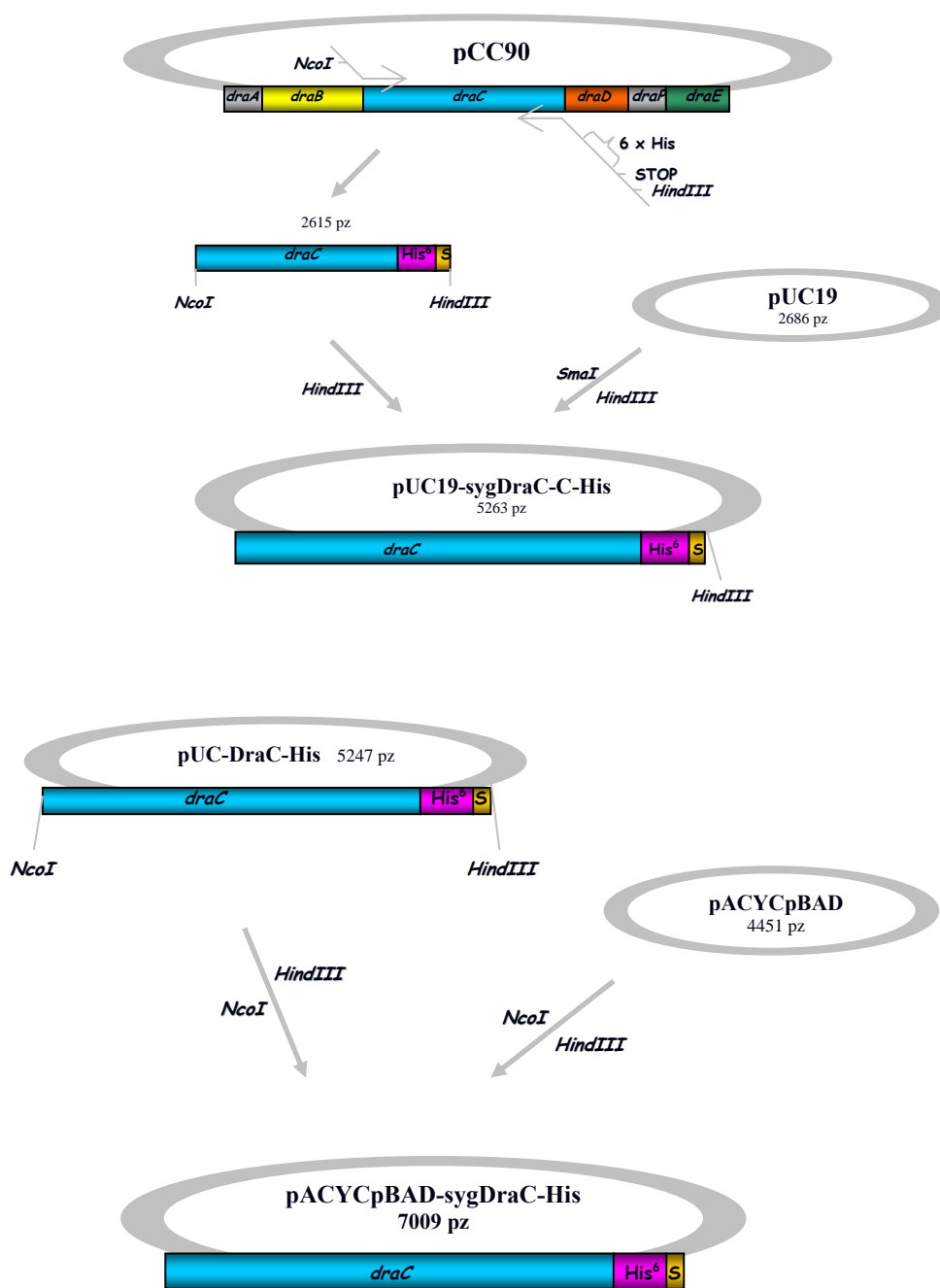
##### Konstrukcja plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C- His

Skonstruowano plazmid rekombinantowy pACYCpBAD-sygDraC-C-His, zawierający wklonowany pod kontrolą promotora arabinozowego gen kodujący białko „usher” DraC z domeną oligohistydynową na C-końcu (Rys. 15). Plazmid pACYCpBAD-sygDraC-C-His posiada *ori* replikacji pochodzące z plazmidu pACYC177 (*ori* p15A).

Reakcję amplifikacji genu *draC* na matrycy plazmidu pCC90 (Materiały 4.2) przeprowadzono z użyciem starterów DraC-HindIII-His oraz DraC-NcoI (Materiały 4.9). Do produktu PCR wprowadzone zostały miejsca rozpoznania dla restryktazy *HindIII* (C-koniec), restryktazy *NcoI* (N-koniec) oraz sekwencja kodująca domenę oligohistydynową

## WYNIKI

(His<sub>6</sub>). W wyniku amplifikacji z wykorzystaniem wymienionych starterów, zgodnie z profilem temperaturowo-czasowym (Metody 5.1), otrzymano właściwy produkt PCR o wielkości 2615 pz. Produkt trawiono restryktazą *Hind*III (Materiały 4.8, Metody 5.2) i poddano reakcji ligacji z DNA wektora pUC19 (Metody 5.3), trawionym restryktazami *Hind*III i *Sma*I, otrzymując plazmid rekombinantowy pUC-sygDraC-C-His o wielkości 5263 pz.



Rys. 15. Schemat konstrukcji plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His.

## WYNIKI

---

Aby móc przeprowadzać kontrolowaną ekspresję genu *draC* w komórkach *E. coli* Top 10F', przeklonowano fragment DNA kodujący białko DraC z sekwencją sygnałną i domeną oligohistydynową na C-końcu z plazmidu pUC-DraC-C-His do plazmidu ekspresyjnego pACYCpBAD (Materiały 4.2), z użyciem restryktaz *NcoI* i *HindIII*. Zastosowanie analizy restrykcyjnej, z użyciem restryktaz *PstI*, *HindIII*, *HincII*, *EcoRV* oraz *NcoI* (Materiały 4.8, Metody 5.2), pozwoliło na wyselekcjonowanie klonu zawierającego plazmid rekombinantowy pACYCpBAD-sygDraC-C-His o wielkości 7009 pz. W celu ostatecznego potwierdzenia poprawności sekwencji nukleotydowej skonstruowanego plazmidu dokonano jego sekwencjonowania.

Porównując wyniki sekwencjonowania genu *draC* plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His z sekwencją genu *draC* zamieszczoną w bazie NCBI [AAK16477] zidentyfikowano różnice w analizowanych sekwencjach. Sklonowany gen *draC* zawierał insercję dwóch nukleotydów TG po 490 nt oraz jednego C po 512 nt. Następna różnica występowała dla nukleotydów 1239-1240, gdzie zamiast CG jest GC. Aby potwierdzić czy rzeczywiście są błędy w zdeponowanej w bazie NCBI sekwencji genu *draC* poddano sekwencjonowaniu gen *draC* z bibliotecznego plazmidu szczepu klinicznego pBJN406 [Nowicki i wsp., 1989] oraz analogiczny gen *afaC-3* z plazmidu pILL1152 [Garcia i wsp., 1996]. kodującego białko kanałotwórcze dla biogenezy struktur adhezyjnych Afa-III. Sekwencjonowanie genu *draC* z pBJN406 potwierdziło uzyskaną sekwencję genu *draC* z plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His. Natomiast sekwencjonowanie genu *afaC-3* wykazało różnicę w dwóch nukleotydach w porównaniu z opublikowaną sekwencją genu *afaC-3* [Garcia i wsp.1994]. Porównanie otrzymanych sekwencji *draC* i *afaC-3* wykazało 100% homologię między tymi genami. Zidentyfikowane różnice w sekwencji nukleotydowej genu *draC* zmieniły sekwencję aminokwasową białka DraC, którą przedstawiono na rysunku 16.

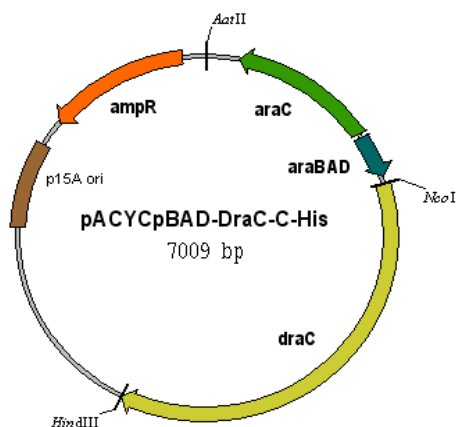
Białko DraC jest dłuższe o jedną resztę aminokwasową i zamiast reszt aminokwasowych PSAAEGDW jest LRPQLRGIA (reszty 129-137) oraz zamiast DD jest EH (reszty 413-414). Otrzymane sekwencje genów *draC* i *afaC-3* zostały zdeponowane w banku NCBI [numer tymczasowy: FJ843076].

## WYNIKI

MRDTSSGRMRTGVTGLALAVMVACVMFRAESGIARTYSFDAAML  
KGGGKGVDLTLFEEGGQLPGIYPVDIILNGSRVDSQEMAFHAERD  
AEGRPYLKTCLTREMLARYGVRIEEYPALFRASGEGRGASVAEEA  
CADLTAIPQATESYQFAAQQLVLGIPQVALRPQLRGIAPeALWDD  
GIPAFLLNWQANAGRSEYRGYGKRVTD SYWVSLQPGINIGPWRV  
RNLT TWRNRSSGQSGKWESSYIRAERGLNGIKSRLTLGEDYTPSDI  
FDSV PFRGAMMSSDESMVPYNLREFAPVVRGIARTQARIEVRQNG  
YLIQSQT VAPGAFALDLPVTGSGSDLQVTVLESDGTAQVFTVPFT  
TPAIALREGYLKYNVTAGQYRSSDDAVEHTSLGQVTAMYGLPWGL  
TVYGG LQGA EHYQSAALGLGWSLGR LGAVSLDTTHSRGQQKGHD  
YETGDTWRIRYNKSFELTGT SFTAASYQYSSDGYHTLPDVLDTWR  
DDRYAYRHTENRSRRTT LSLSQSLGQWGYVGLNGSRDEYRDRPH  
RDYFGASYSTSWNNISLSVNWSRNRNSGGYYGGWSRTEDSVSM  
WMSVPLGRWFGGADNDISTTAQMQRSTGQDTRYEAGLNGRAFD  
RRLYWDVREQMVPGSESHADTSRLNLTWYGTYGELTGMYSYSST  
MRQLNAGMSGSMVAHSEGVTFGQRTGDTVALIAAPGVSGASVGG  
WPGVRTDFR GYTLAGYASPYQENVLTLDPPTTFPEDA EVPQTDSRV  
VPTKGAVVRAGFRTRVGGRALVSLARQDGTPLPFGAVVTVEGEA  
GQAAGSAGVVGDRGEVYLSGLKESGKLKAQWGENSLCHADYRLP  
EEKGPAGIFLTRTVCM **Stop**

**Rys. 16.** Weryfikacja sekwencji aminokwasowej białka DraC. Na czerwono zaznaczono różnice w sekwencji w porównaniu z sekwencją zdeponowaną w banku NCBI [AAK16477].

Schemat mapy plazmidu rekombinantowego pACYCpBAD-sygDraC-C-His pokazano na rysunku 17. Komórki *E. coli* niosące plazmid pACYCpBAD-sygDraC-C-His warunkują produkcję białka kanałotwórczego DraC z domeną oligohistydynową na C-końcu, o masie cząsteczkowej 93,9 kDa (obliczony punkt izoelektryczny tego białka wynosi 6,10).



**Rys. 17.** Mapa plazmidu ekspresyjnego pACYCpBAD-sygDraC-C-His.

Do komórek szczepu *E. coli* BL21(DE3) wprowadzono drogą transformacji DNA plazmidu rekombinantowego pACYCpBAD-sygDraC-C-His oraz DNA plazmidu pET30-sygDraB-C-His-DraE, wcześniej otrzymanego w Katedrze Mikrobiologii PG. W ten sposób otrzymano szczep *E. coli*, będący wygodnym modelem badawczym do doświadczeń *in vivo* [Kur i wsp., 2007].

### **6.5. Badanie zdolności białka DraC do biogenezy fimbrii Dr**

Aby sprawdzić funkcjonalność rekombinantowego białka DraC, kodowanego przez skonstruowany plazmid pACYCpBAD-sygDraC-C-His, zbadano jego zdolność do tworzenia fimbrii Dr. Eksperymenty przeprowadzono na skonstruowanym między innymi do tego celu modelu badawczym komórek *E. coli* BL21(DE3) niosących dwa plazmidy rekombinantowe: pACYCpBAD-sygDraC-C-His oraz pET30-sygDraB-C-His-DraE. W wyniku ekspresji prowadzonej w szczepie *E. coli* BL21(DE3), zawierającym te dwa plazmidy, na powierzchni komórek powinny pojawić się funkcjonalne fimbrie Dr, do biogenezy których konieczne są trzy funkcjonalne białka – białko kanałotwórcze DraC, białko opiekuńcze DraB i białko podjednostkowe fimbrii DraE. Obecność fimbrialnych struktur typu Dr na powierzchni komórek *E. coli* może być analizowana przy zastosowaniu techniki Western blotting, mikroskopii fluorescencyjnej oraz testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów.

#### **6.5.1. Badanie powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr metodą Western blotting**

Powstanie fimbrii Dr w układzie modelowym testowano z wykorzystaniem następujących szczepów *E. coli* BL21(DE3):

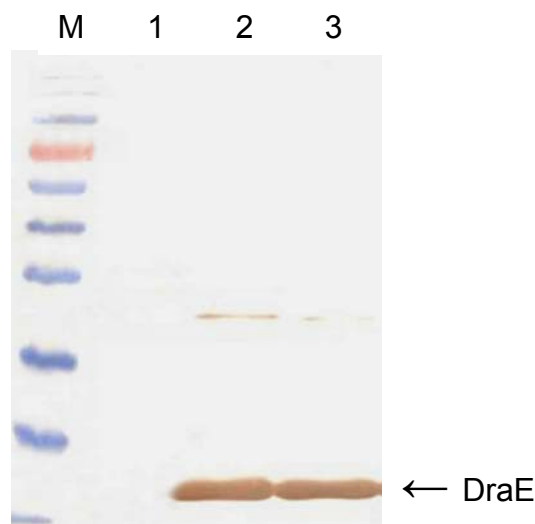
- szczep niosący plazmid pET30-sygDraB-C-His-DraE (kontrola negatywna), produkujący białka DraB i DraE;
- szczep niosący plazmid pCC90, zdolny do ekspresji natywnych fimbrii Dr (kontrola pozytywna) oraz
- szczep niosący plazmidy pACYCpBAD-DraC-C-His i pET30-sygDraB-C-His-DraE, produkujący DraB, DraE i DraC.

Z odpowiednich hodowli (Metody 5.18) powyższych szczepów izolowano frakcje fimbrialne, które poddano następnie analizie Western blotting (Metody 5.12).

## WYNIKI

Analiza Western blotting, za pomocą króliczych przeciwciał anti-Dr, wykazała obecność adhezyny DraE we frakcjach fimbrialnych szczepów: *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE oraz *E. coli* BL21(DE3)/pCC90 (Rys. 18). Ilość uzyskanego białka DraE w układzie dwuplazmidowym była porównywalna do ilości uzyskanej ze szczepu z plazmidem pCC90, zawierającym cały operon *dra* (około 10 mg adhezyny DraE z 0,5 litra hodowli).

Wyniki immunoidentyfikacji wykazały obecność fimbrii Dr na powierzchni komórek szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE, co świadczy o zdolności rekombinantowego białka DraC do biogenezy fimbrii w zastosowanym układzie badawczym.



**Rys. 18.** Immunoidentyfikacja fimbrialnych białek podjednostkowych DraE fimbrii Dr we frakcjach fimbrialnych szczepu *E. coli*: BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

M - marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting wielkości – 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 i 10 kDa. Frakcje fimbrialne izolowane z szczepów *E. coli*: 1 - BL21(DE3)/ pET30-sygDraB-C-His-DraE, 2 - BL21(DE3)/pCC90 i 3 - BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

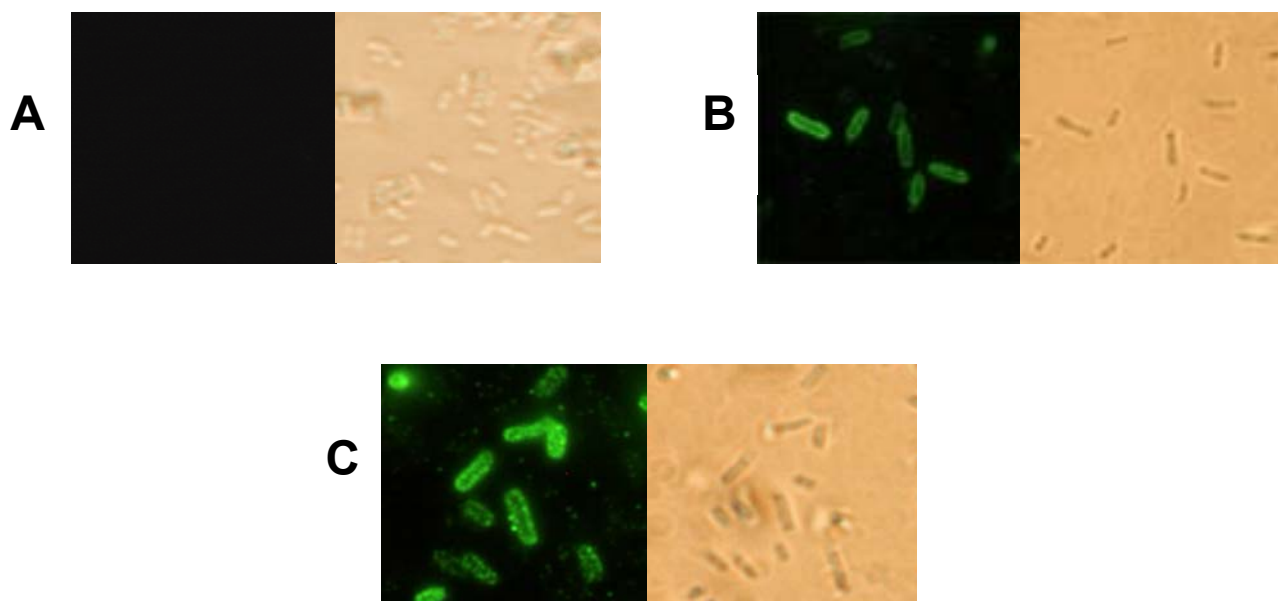
### 6.5.2. Badanie powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr metodą mikroskopii fluorescencyjnej

Obecność fimbrialnych struktur typu Dr na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE potwierdzono również przy pomocy mikroskopii immunofluorescencyjnej z wykorzystaniem przeciwciał

## WYNIKI

króliczych anty-Dr oraz przeciwciał gatunkowo specyficznych znakowanych izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC). Do badań wykorzystano te same hodowle jak w przypadku analizy Western blotting.

Hodowle odpowiednich szczepów bakteryjnych prowadzono według procedury przedstawionej w Metodach 5.9. Osady komórek bakteryjnych *E. coli* zawieszano w buforze PBS, a następnie komórki inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami króliczymi anty-Dr i drugorzędowymi przeciwciałami anty-króliczymi, znakowanymi fluorescencyjnie. Nie stwierdzono powierzchniowej ekspresji białka adhezyny DraE w szczepie kontrolnym *E. coli* BL21(DE3) (Rys.19A). Natomiast w przypadku dwóch pozostałych szczepów zaobserwowano obecność białek DraE na powierzchni ich komórek (Rys. 19 B i C). Przeprowadzone badania potwierdziły efektywny transport podjednostek fimbrialnych DraE na powierzchnię komórek bakteryjnych ekspresujących rekombinantowe białko kanałotwórcze DraC (*E. coli*. BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE).



**Rys. 19.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* szczepów: A - BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE, B - BL21(DE3)/pCC90, C - BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE, inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anty-Dr i anty-króliczymi znakowanymi FITC w połączeniu z mikrofotografiami kontrastowo-fazowymi komórek bakteryjnych powyższych szczepów *E. coli* (powiększenie 10 000x, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

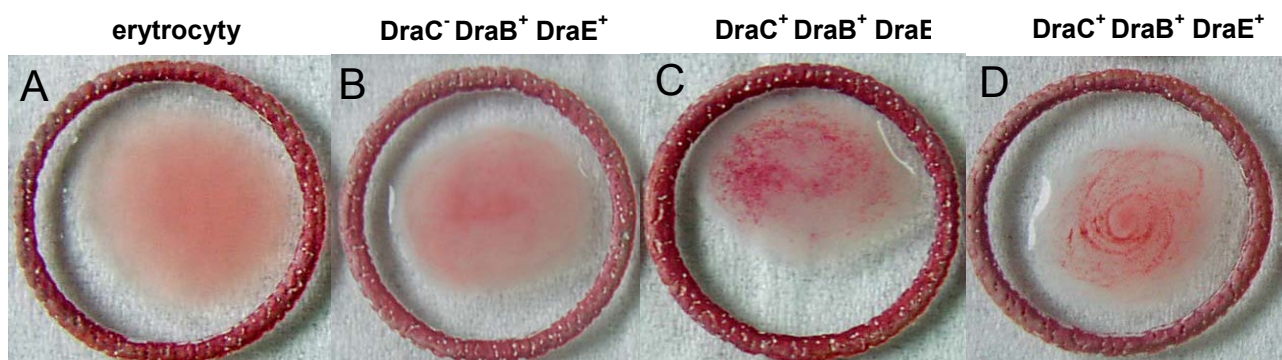


## WYNIKI

### 6.5.3. Badanie powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr metodą hemaglutynacji ludzkich erytrocytów

Zdolność rekombinantowego białka DraC do sekrecji na powierzchnię komórki funkcjonalnych fimbrii Dr sprawdzano również za pomocą testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów. Zasada testu opiera się na zdolności adhezyn do wiązania specyficznych receptorów na powierzchni erytrocytów (DAF w przypadku większości adhezyn rodziny Dr), czego wynikiem jest aglutynacja komórek obserwowana okiem nieuzbrojonym lub pod mikroskopem optycznym. Badaniu poddano zawiesiny komórek bakterii *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE (kontrola negatywna), *E. coli* BL21(DE3)pCC90 (kontrola pozytywna) oraz *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

Zawiesiny bakterii *E. coli* BL21(DE3)pCC90 oraz *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE w buforze PBS wykazywały wysoką aktywność hemaglutynacyjną wobec ludzkich erytrocytów, co świadczy o powierzchniowej ekspozycji fimbrii Dr w tych komórkach (Rys. 20). Wynik pozytywny hemaglutynacji można było zaobserwować nieuzbrojonym okiem.



**Rys. 20.** Wyniki testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów z badanymi szczepami *E. coli*: A – same erythrocyty, B – z komórkami BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE, C – z komórkami BL21(DE3)/pCC90 i D – z komórkami BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

Bakterie szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE (brak białka DraC) nie wykazywały zdolności do hemaglutynacji ludzkich erytrocytów, co świadczy o

nieobecności fimbrii Dr, zbudowanych z podjednostek adhezyny DraE, na powierzchni komórek bakteryjnych.

Pozytywny wynik hemaglutynacji w przypadku szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE, podobnie jak opisane wyżej wyniki analizy Western blotting i mikroskopii immunofluorescencyjnej, świadczą o zdolności rekombinantowego białka DraC do biosyntezy fimbrii Dr w modelowym, dwuplazmidowym układzie badawczym. Plazmidy te posiadają niezależnie regulowane promotory (indukcja ekspresji arabinozą i/lub IPTG), co pozwala na w pełni kontrolowaną ekspresję fimbrii Dr.

### **6.6. Zastosowanie skonstruowanego dwuplazmidowego modelu badawczego do produkcji chimericznych fimbrii Dr**

Opisany wyżej szczep *E. coli* BL21(DE3) niosący plazmidy pACYCpBAD-DraC-C-His i pET30-sygDraB-C-His-DraE stanowi wygodny i uniwersalny system do badania i produkcji różnych zewnątrzkomórkowych struktur adhezyjnych. Może być wykorzystany do produkcji różnych białek adhezyjnych z rodziny Dr lub chimericznych adhezyn, zawierających heterologiczne wstawki, np. determinanty antygenowe. W łatwy sposób, wymieniając w plazmidzie pET30-sygDraB-C-His-DraE geny kodujące białko opiekuńcze DraB lub/i podjednostkę adhezyjną DraE na geny kodujące inne białka opiekuńcze lub/i podjednostki adhezyjne (np. niefimbrialne adhezyny AfaEIII lub chimeryczne podjednostki adhezyn), możliwa jest ich produkcja i badanie.

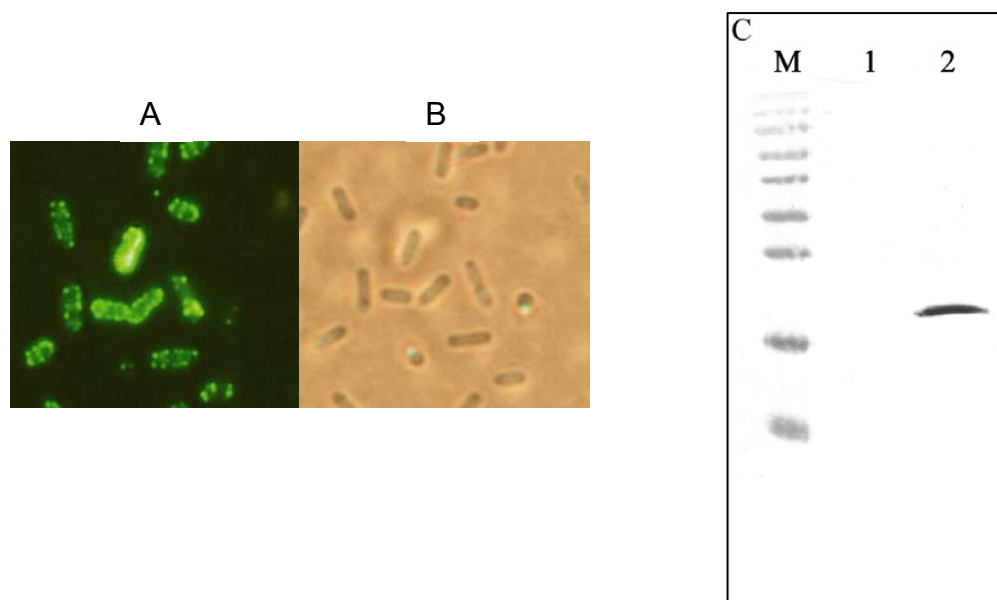
Podjednostki strukturalne fimbrii są wykorzystane jako nośniki peptydowych determinant antygenowych pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego. Układ immunologiczny, wytwarzający komórki B i przeciwciała, w pierwszym rzędzie reaguje i rozpoznaje antygeny powierzchniowe. Takimi antygenami są adhezyny, których dodatkową zaletą jest to, że są długimi polimerycznymi strukturami powierzchniowymi zbudowanymi z setek podjednostek, występującymi w liczbie około 500 kopii na komórkę. Ponadto, wykazano, że niektóre fragmenty struktury białkowej adhezyn są szczególnie immunogenne, są to tzw. regiony immunodominujące, występujące najczęściej w obszarach pętli polipeptydowych pozbawionych sztywnej struktury. Te regiony w szczególności nadają się do wstawiania sekwencji heterologicznych determinant antygenowych. Czynnikiem ograniczającym zastosowanie adhezyn

## WYNIKI

---

bakteryjnych jako nośników determinant antygenowych jest wielkość determinanty, jaka może zostać wprowadzona. Wprowadzenie determinanty nie może zaburzyć struktury adhezyny i nie powinno mieć wpływu na prawidłowy proces polimeryzacji podjednostek w strukturę fimbrii. Dobrze poznanym konstruktem do produkcji chimericznych fimbrii Dr jako nośników heterogennych determinant antygenowych jest układ ekspresyjny pozwalający na otrzymanie chimericznych fimbrii Dr-HSV1. Chimericzne fimbrie Dr-HSV1, będące potencjalnymi szczepionkami rekombinantowymi, powstały poprzez wprowadzenie determinanty antygenowej HSV1 pochodzącej z glikoproteiny D wirusa *Herpes Simple* typu 1 zamiast 11 aminokwasowego regionu domeny 2 białka DraE [Zalewska i wsp., 2003]. Szczep *E. coli* do produkcji tych chimericznych fimbrii nosi 2 plazmidy rekombinantowe, jeden pDraE-HSV3 ekspresyjny adhezynę DraE z determinantą antygenową HSV1 i drugi pCC90D54stop, zawierający operon *dra* z zmutowanym genem *draE*, z wprowadzonym kodonem stop, powodującym przedwczesną terminację syntezy białka DraE.

Układ do produkcji chimericznych fimbrii zaproponowany w oparciu o skonstruowany w niniejszej pracy dwuplazmidowy model badawczy jest inny od opisanego wyżej. Na bazie plazmidów pET30-sygDraB-C-His-DraE i pDraE-HSV3 skonstruowano plazmid pET30-sygDraBE-HSV1, zawierający geny kodujące białko DraB i białko DraE z determinantą antygenową HSV1. Fragment DNA, zawierający gen *draE-HSV1*, uzyskany z plazmidu pDraE-HSV3 poprzez trawienie restryktazami *SacI* i *HindIII*, ligowano z DNA plazmidu pET30-sygDraB-C-His-DraE, trawionym tymi samymi enzymami. Poprawność powstałego plazmidu rekombinantowego zweryfikowano przez sekwencjonowanie. W celu produkcji chimericznych fimbrii Dr-HSV1, szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His transformowano otrzymanym plazmidem pET30-sygDraBE-HSV1. W wyniku ekspresji uzyskano z wyizolowanej frakcji fimbrialnej około 16 mg białka DraE-HSV1 z litra hodowli bakteryjnej, co jest porównywalne z ilością uzyskiwanego białka DraE (około 20 mg/litr hodowli). Obecność chimericznych fimbrii na powierzchni komórki bakteryjnej potwierdzono za pomocą techniki Western blotting i mikroskopii immunofluorescencyjnej z użyciem przeciwciał anti-Dr, rozpoznających białko DraE-HSV1 (Rys. 21).



**Rys. 21.** Immunoidentyfikacja chimerycznych fimbrii Dr-HSV1: A - mikrofotografia immunofluorescencyjna komórek bakteryjnych *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraBE-HSV1, inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anti-Dr i anty-króliczymi znakowanymi FITC; B - mikrofotografia kontrastowo-fazowa tych samych komórek; C - analiza Western blotting białek podjednostkowych DraE-HSV w frakcjach fimbrialnych szczepów *E. coli*: BL21(DE3)/pET30-sygDraBE-HSV1 (ścieżka 1) i BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His/pET30-sygDraBE-HSV1 (ścieżka 2).

### 6.7. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych zawierających mutacje punktowe w genie *draC*

Dla wyznaczenia reszt aminokwasowych białka DraC, pełniących kluczową rolę w oddziaływaniu z kompleksem białko opiekuńcze DraB-podjednostka fimbrialna DraE, skonstruowano zmutowane formy genu *draC*. Wprowadzone mutacje przy użyciu mutagenyzy ukierunkowanej zamieniały wybrane aminokwasy w białku DraC na alaninę. Skupiono się głównie na resztach aminokwasowych zakonserwowanych ewolucyjnie dla białek kanałotwórczych biorących udział w biogenezie struktur adhezyjnych na drodze „chaperone/usher” wytypowanych na podstawie przeprowadzonej analizy sekwencji aminokwasowych białek FUP (Wyniki 6.1) i ich N-terminalnych domen (Wyniki 6.2) oraz na odpowiadającym kluczowym resztom aminokwasowym zaangażowanym w oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna dla białka FimD (Wyniki 6.3) [Nishiyama i wsp., 2005]. Mutagenyzie poddawano DNA plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His przy użyciu

## WYNIKI

---

zestawu do mutagenizacji (QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) (Metody 3.8). Następujące reszty aminokwasowe białka DraC zamieniano na alaninę:

- Phe4, Leu9, Asp17, Leu18, Phe21, Leu27, Pro28, Tyr31, Asp34 – odpowiadają resztom aminokwasowym domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub>, oddziałującym z białkiem opiekuńczym FimC;
- Asp5, Met8 - odpowiadają resztom aminokwasowym domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub>, oddziałującym zarówno z białkiem opiekuńczym FimC, jak i z białkiem podjednostkowym FimH;
- Leu20 – odpowiadającej reszcie domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub>, odpowiedzialnej za kontakt hydrofobowy z kompleksem FimC-FimH;
- Trp142 – zakonserwowana reszta tryptofanu w obrębie regionu zawiasowego domeny N-terminalnej;
- Leu65, Thr66 – reszty aminokwasowe odpowiadające hydrofobowej kieszeni rdzenia N-terminalnej domeny FimD<sub>N</sub> oddziałującej z Trp133;
- Cys64, Cys100 – tworzące wysoce zakonserwowany mostek disiarczkowy w obrębie fragmentu rdzeniowego białek kanałotwórczych rodziny FUP.

Z otrzymanych klonów rekombinantowych *E. coli* XL1-Blue izolowano DNA plazmidowe i poddawano sekwencjonowaniu celem potwierdzenia wprowadzenia mutacji w odpowiednie miejsca.

Otrzymano 17 różnych plazmidów rekombinantowych o wielkości 7009 pz, posiadających pojedyncze mutacje punktowe w obrębie genu *draC*, kodujące zmutowane formy białka DraC z wprowadzonymi resztami alaniny w określonych miejscach.

### 6.8. Badanie zdolności zmutowanych form białka DraC do biogenezy fimbrii Dr

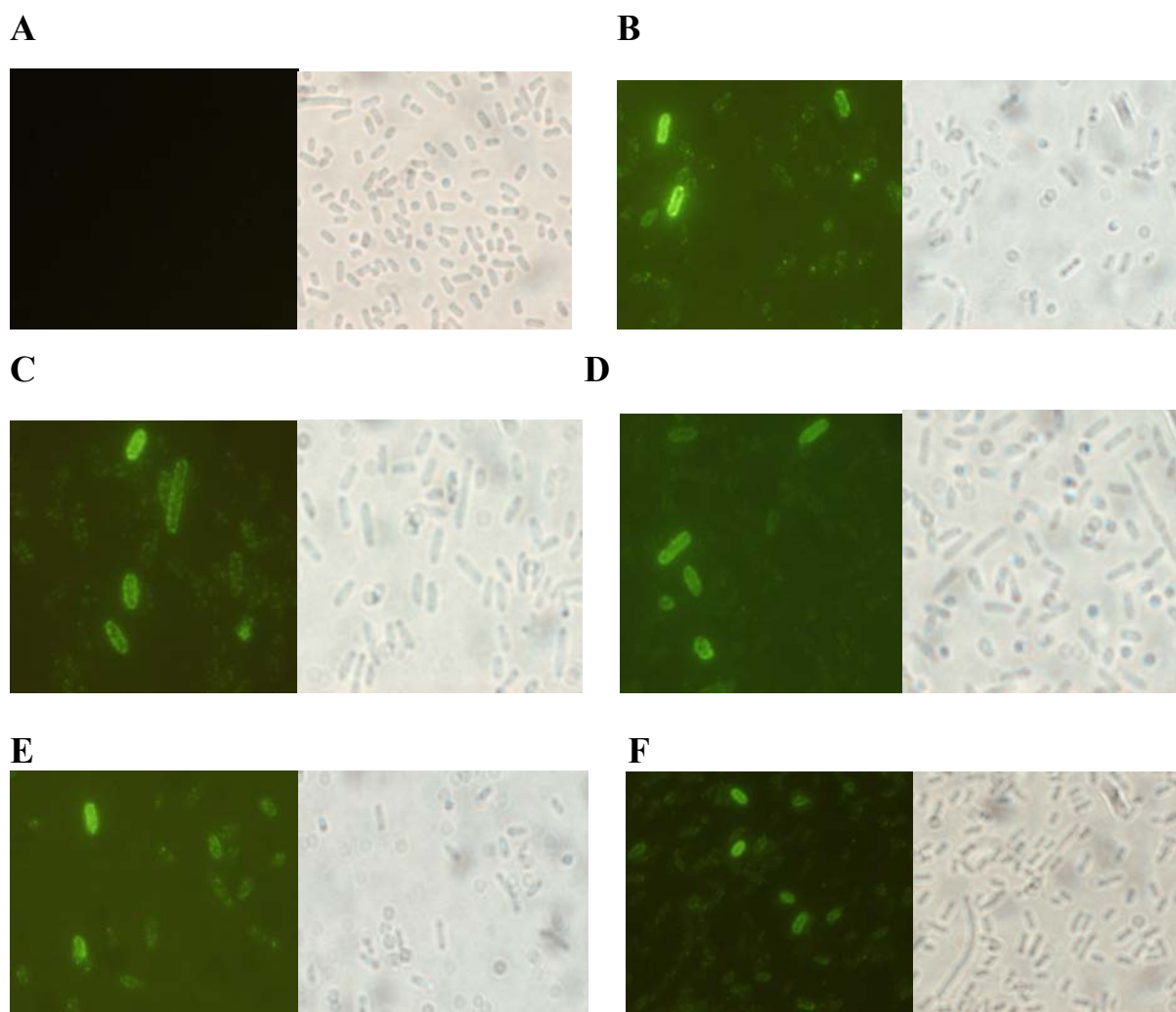
Do badania zdolności zmutowanych form białka DraC do biogenezy fimbrii Dr wykorzystano wyżej opisany szczep *E. coli* zawierający plazmid pET30-sygDraB-C-His-DraE, z którego zachodzi ekspresja do przestrzeni periplazmatycznej białek DraB i DraE oraz plazmid pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut z wprowadzoną mutacją, zamiast plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His, kodującego natywną formę białka DraC. Na powierzchni komórek bakteryjnych powinny pojawić się funkcjonalne fimbrie Dr tylko przy braku wpływu mutacji na mechanizm biogenezy. Obecność fimbrii Dr na powierzchni komórek *E. coli* BL21(DE3) badano przy pomocy mikroskopii immunofluorescencyjnej, techniki Western blotting, testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów oraz eksperymentów na lini komórkowej HeLa. W poniżej opisanych doświadczeniach szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE stanowił kontrolę pozytywną (produkcja fimbrii Dr), a szczep *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE stanowił kontrolę negatywną (brak produkcji fimbrii Dr na powierzchni komórki spowodowany nieobecnością białka kanałotwórczego DraC).

#### 6.8.1. Wykrywanie fimbrii Dr metodą mikroskopii immunofluorescencyjnej

Przygotowano mikroskopowe preparaty komórek badanych 17 szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE do obserwacji z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego (Metody 5.10).

Na rysunku 23 zamieszczono mikrofotografie komórek bakteryjnych szczepów kontrolnych oraz przykładowych szczepów, zawierających plazmid ze zmutowanym genem *draC*. Nie stwierdzono powierzchniowej ekspresji białka adhezyny DraE w szczepie kontrolnym (*E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE) (Rys. 22A). Natomiast w przypadku pozostałych szczepów zaobserwowano obecność białek DraE na powierzchni ich komórek. Otrzymane wyniki metodą mikroskopii immunofluorescencyjnej nie pozwoliły na wyselekcjonowanie mutantów DraC, które zaburzają proces biogenezy fimbrii Dr. Spowodowane jest to zastosowaną metodą, która nie jest ilościowa i wykrywa nawet bardzo niewielką ilość fimbrii Dr na powierzchni komórki bakteryjnej.

## WYNIKI



**Rys. 22.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne komórek bakteryjnych *E. coli* BL21(DE3) zawierających: A - pET30-sygDraB-C-His-DraE, B - pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE, C - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys64mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE, D - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE, E - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE, F - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Leu9mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE, inkubowanych z przeciwciałami króliczymi anty-Dr i anty-króliczymi znakowanymi FITC w połączeniu z mikrofotografiami kontrastowo-fazowymi komórek bakteryjnych powyższych szczepów (powiększenie 10 000x, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

### 6.8.2. Wykrywanie fimbrii Dr metodą Western blotting

Hodowle bakteryjne badanych 17 szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE doprowadzano do tego samego OD, a następnie z komórek izolowano frakcje fimbrialne (Metody 5.18). Stężenie białek w otrzymanych preparatach określano metodą spektrofotometryczną (Tab. 3).

## WYNIKI

**Tab. 3.** Stężenia białek we frakcjach fimbrialnych szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

Mutacje DraC	Stężenie frakcji fimbrialnych [µg/ml]
Kontrola+	298
Phe4	111
Asp5	257
Met8	230
Leu9	268
Asp17	283
Leu18	293
Leu20	281
Phe21	230
Leu27	269
Pro28	274
Tyr31	285
Asp34	292
Cys64	140
Leu65	275
Thr66	260
Cys100	123
Trp142	50

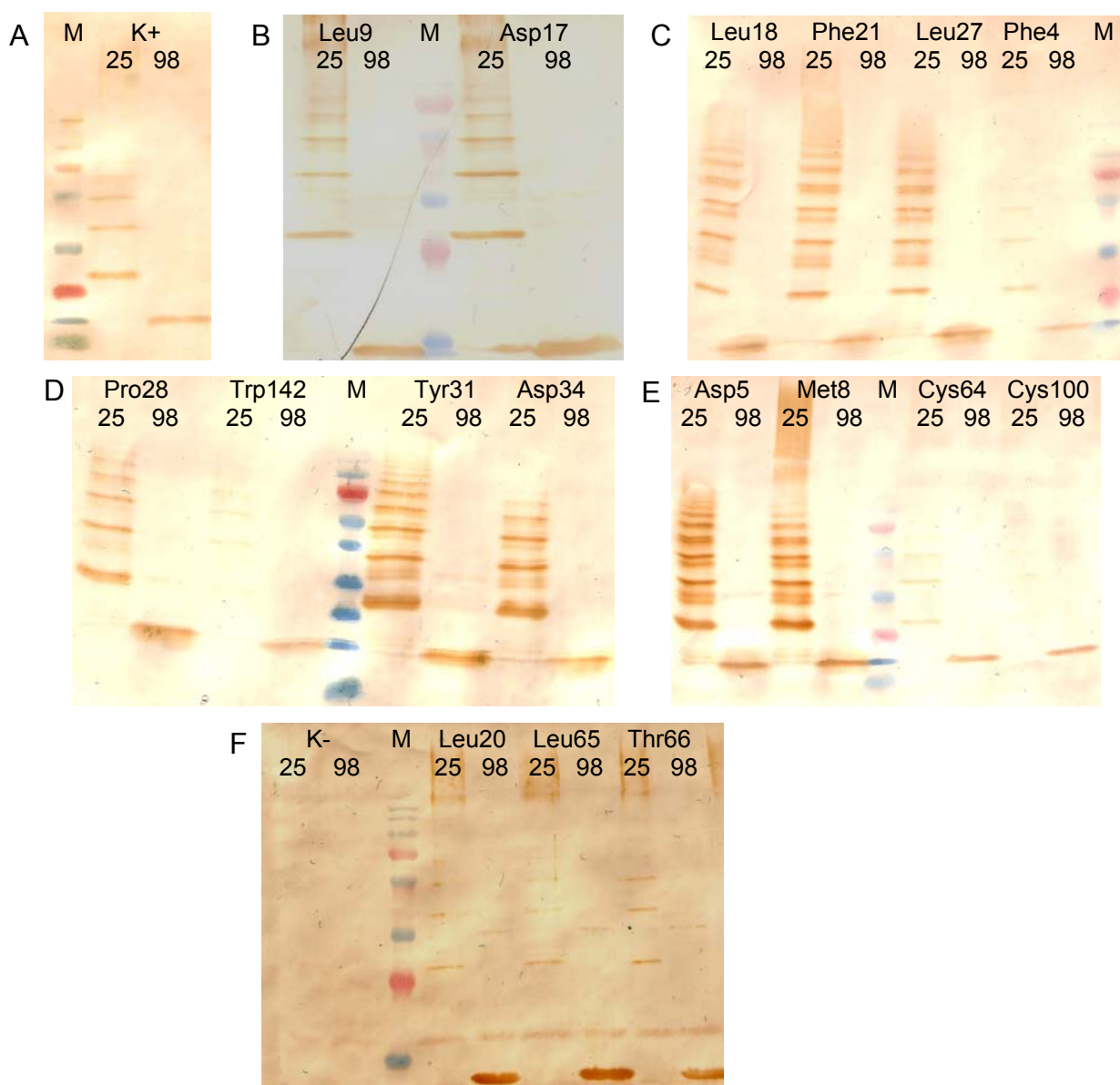
Najniższe stężenia białek stwierdzono we frakcjach fimbrialnych szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE z mutacjami w genie *draC* zmieniającymi Phe4, Cys64, Cys100 i Trp142 na alaninę w białku DraC .

Wyizolowane frakcje poddawano analizie Western blotting (Rys. 23). Poszczególne frakcje fimbrialne przed naniesieniem na żel inkubowano w buforze Laemmli w 25°C i 95°C. Na ścieżkach, gdzie rozdzielane były próbki denaturowane termicznie (95°C) widoczny jest pojedynczy prążek odpowiadający monomerycznej formie białka DraE. Natomiast na ścieżkach zawierających próbki inkubowane przed elektroforezą w buforze Laemmli w 25°C, widoczna jest „drabinka” prążków form oligomerycznych adhezyny DraE.

Zaobserwowano obecność białka DraE we wszystkich frakcjach fimbrialnych szczepów produkujących zmutowane białko DraC. Jednak dla czterech mutantów (Phe4/Ala, Cys64/Ala, Cys100/Ala i Trp142/Ala) zaobserwowano znacznie mniejsze ilości białka DraE (Rys. 23 C, D, E), co było zgodne z bezpośrednimi pomiarami stężenia białek we frakcjach fimbrialnych (Tab. 3). Wyniki te sugerują, że biogeneza fimbrii Dr w przypadku tych mutantów została zahamowana.



## WYNIKI



**Rys. 23.** Immunoidentyfikacja białek podjednostkowych DraE fimbrii Dr we frakcjach fimbrialnych szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE. M - marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting wielkości – 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 i 10 kDa.

### 6.8.3. Wykrywanie fimbrii Dr metodą hemaglutynacji ludzkich erytrocytów

Zdolność zmutowanych form białka DraC do sekrecji na powierzchnię komórki funkcjonalnych fimbrii Dr sprawdzono również za pomocą testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów (Metody 5.13). Mieszano równą objętość 3% roztworu erytrocytów w buforze PBS z zawiesinami hodowli komórkowych *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE przy różnym  $OD_{600}$  (0,6; 0,8; 1,0; 1,2 i 1,4). Dla każdej hodowli bakteryjnej wyznaczono najniższą

## WYNIKI

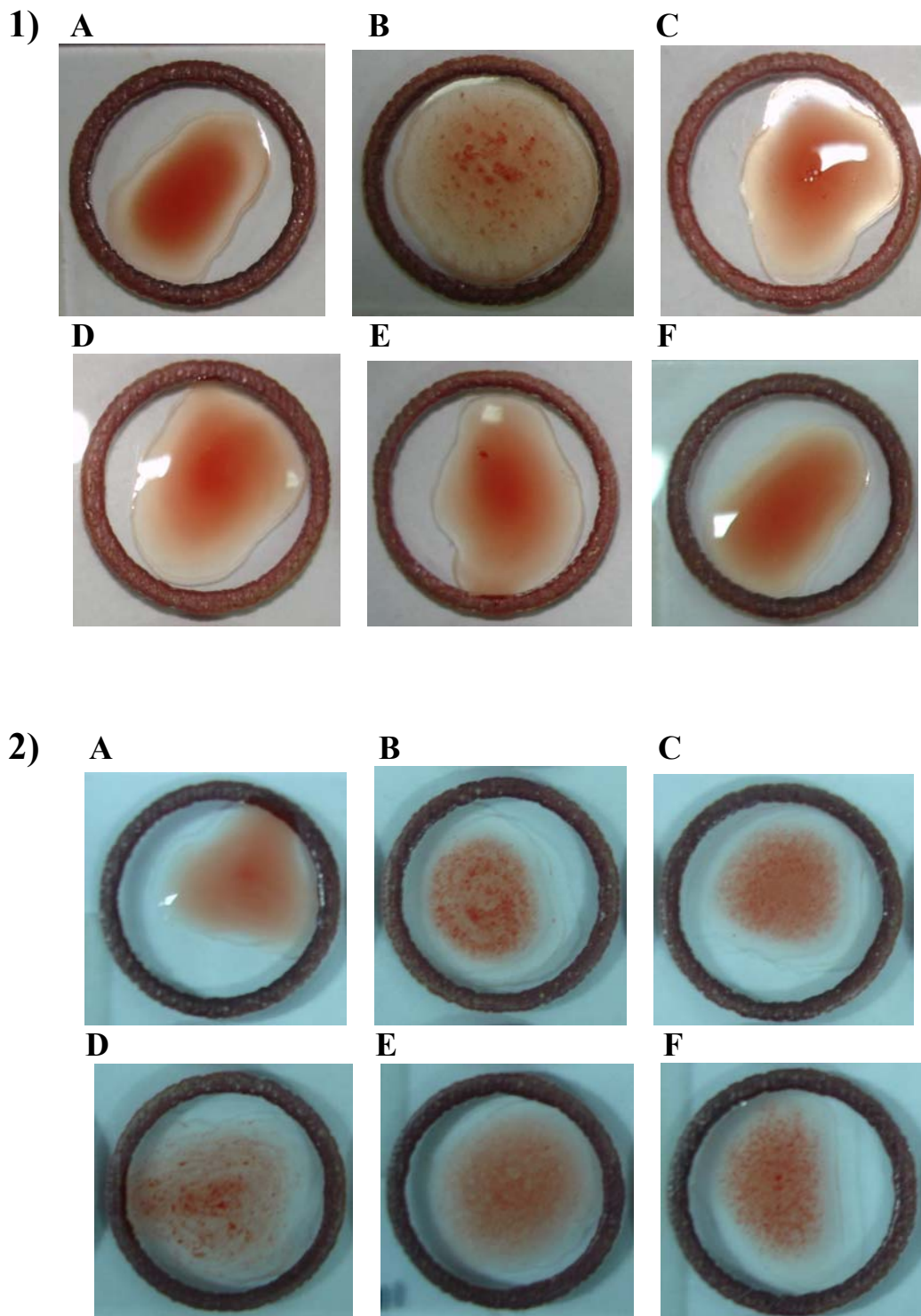
wartość OD mierzona przy długości fali 600 nm, przy którym następowała hemaglutynacja.

W przypadku czterech mutantów zaobserwowano różnicę w stosunku do kontroli pozytywnej, jaką stanowił szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE, produkujący natywne białko DraC. Szczepy produkujące zmutowane formy białka DraC w miejscu Trp142/Ala i Phe4/Ala wykazywały zdolność do hemaglutynacji ludzkich erytrocytów dopiero przy  $OD_{600}=1,4$ , a w miejscu Cys64/Ala i Cys100/Ala przy  $OD_{600}=1,2$ . Szczep będący kontrolą pozytywną oraz pozostałe szczepy produkujące zmutowane formy białka DraC dawały pozytywny wynik testu hemaglutynacji już przy  $OD_{600}=0,6$  (Tab. 4 i Rys. 24).

**Tab. 4.** Wyniki testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów przy różnym  $OD_{600}$  hodowli bakteryjnych szczepów *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

Mutacje DraC	OD=0,6	OD=0,8	OD=1	OD=1,2	OD=1,4
Kontrola+	+	+	+	+	+
Phe4	-	-	-	-	+
Asp5	+	+	+	+	+
Met8	+	+	+	+	+
Leu9	+	+	+	+	+
Asp17	+	+	+	+	+
Leu18	+	+	+	+	+
Leu20	+	+	+	+	+
Phe21	+	+	+	+	+
Leu27	+	+	+	+	+
Pro28	+	+	+	+	+
Tyr31	+	+	+	+	+
Asp34	+	+	+	+	+
Cys64	-	-	-	+	+
Leu65	+	+	+	+	+
Thr66	+	+	+	+	+
Cys100	-	-	-	+	+
Trp142	-	-	-	-	+

## WYNIKI



**Rys. 24.** Przykładowe wyniki testów hemaglutynacji ludzkich erytrocytów: 1) przy  $OD_{600}=0,8$  i 2)  $OD_{600}=1,4$ .

A - *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE

B - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE

C - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys64mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE

D - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE

E - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE

F - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys100mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE

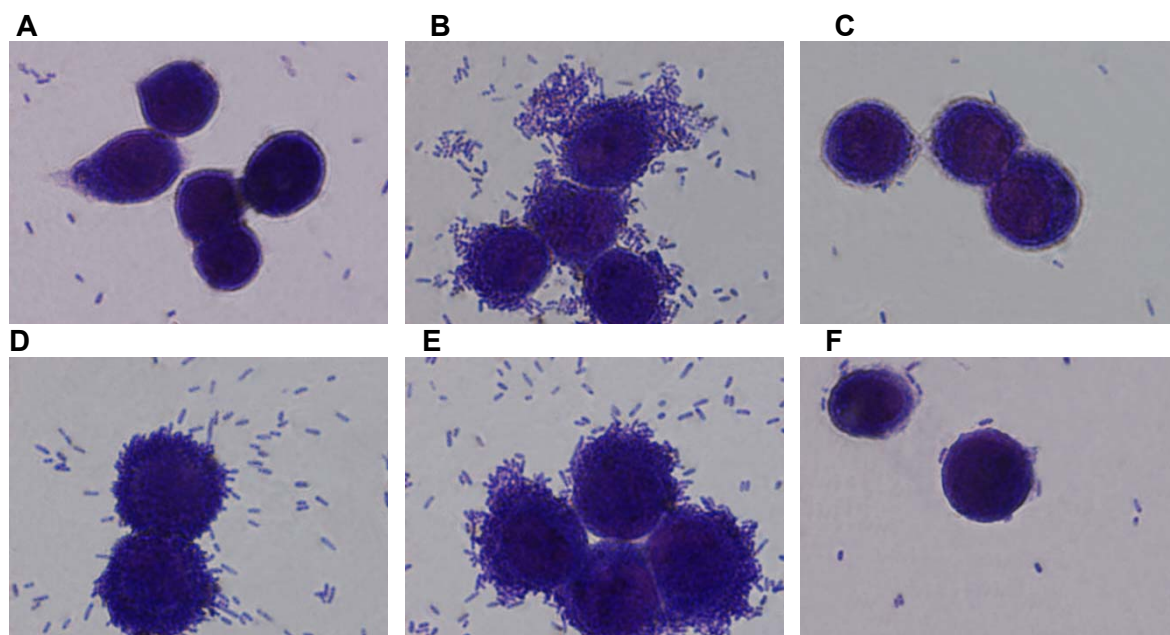
Dużo słabsza zdolność do hemaglutynacji ludzkich erytrocytów przez szczepy *E. coli* produkujące zmutowane formy białka DraC w miejscach Phe4/Ala, Cys100/Ala, Cys64/Ala i Trp142/Ala wynika z obniżonej produkcji fimbrii Dr na powierzchni odpowiednich komórek, co najprawdopodobniej spowodowane jest zahamowaniem procesu biogenezy na etapie oddziaływań zmutowanej formy białka DraC z kompleksem białka opiekuńczego DraB i podjednostki adhezyjnej DraE.

#### **6.8.4. Badanie adherencji rekombinantowych szczepów *E. coli* do komórek linii HeLa**

Szczepy bakteryjne *E. coli* produkujące fimbrie Dr są zdolne do wiązania się z komórkami linii HeLa, zawierającymi na swojej powierzchni receptor DAF. W celu potwierdzenia faktu obniżonej produkcji fimbrii Dr szczepów bakteryjnych *E. coli*, zawierających plazmidy z mutacjami punktowymi w obrębie genu *draC* (Phe4/Ala, Cys64/Ala, Cys100/Ala i Trp142/Ala) zbadano ich właściwości adherentne do komórek linii HeLa.

Hodowle bakteryjne odpowiednich szczepów inkubowano z komórkami HeLa, a następnie dodawano do komórek barwnik Giemsa (Metody 5.23) w celu ich barwienia.

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na stwierdzenie, że szczepy bakteryjne *E. coli*, zawierające plazmidy z mutacją punktową w genie *draC* posiadają obniżoną zdolność adhezji do komórek linii HeLa, w porównaniu ze szczepem bakteryjnym zawierającym plazmid bez mutacji (Rys. 25). Szczególnie mutacje w obrębie sekwencji nukleotydowej genu *draC* kodującego resztę aminokwasową Phe w pozycji 4 (Rys. 25 C) oraz Trp w pozycji 142 (Rys. 25 F) zaburzyły adherencję komórek bakteryjnych (obecność tylko pojedynczych komórek bakteryjnych na powierzchni komórek linii HeLa).



**Rys. 25.** Mikrofotografie komórek linii HeLa inkubowanych z komórkami bakteryjnymi *E. coli* BL21(DE3) nosących plazmidy: A - pET30-sygDraB-C-His-DraE; B - pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE; C - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; D - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys64mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; E - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys100mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; F - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

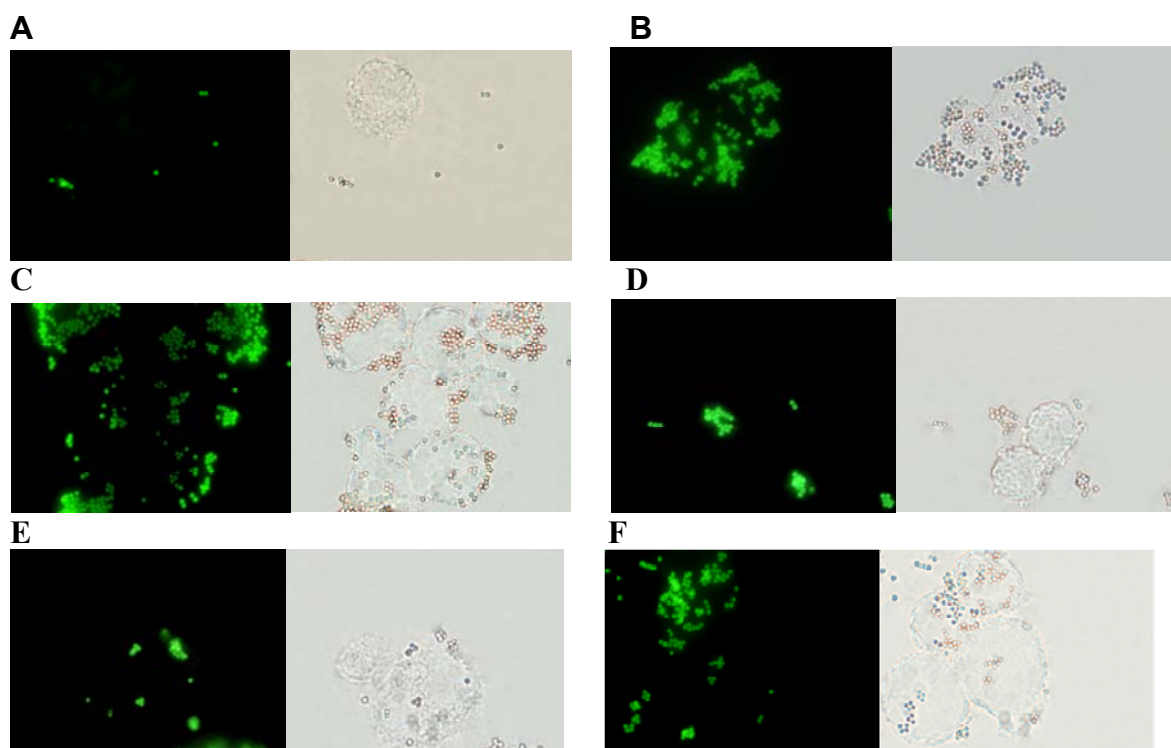
### 6.8.5. Badanie właściwości adherentnych fimbrii Dr opłaszczonych na kulkach fluorescencyjnych do komórek linii HeLa

Kolejną metodą sprawdzającą poziom ekspresji fimbrii Dr szczepów *E. coli* produkujących zmutowane formy białka DraC (DraC-Phe4/Ala, DraC-Trp142/Ala, DraC-Cys64/Ala i DraC-Cys100/Ala) było badanie adhezji kulek fluorescencyjnych opłaszczonych białkami frakcji fimbrialnych, otrzymanych z poszczególnych rekombinantowych szczepów *E. coli* do komórek linii HeLa za pomocą mikroskopii immunofluorescencyjnej (Rys. 26).

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wskazują na obniżony poziom adhezji kulek fluorescencyjnych opłaszczonych frakcjami fimbrialnymi Dr szczepów *E. coli* kodujących zmutowane białko DraC-Phe4/Ala i DraC-Trp142/Ala. Nie zaobserwowano różnicy między kontrolą pozytywną, którą stanowiła frakcja fimbrialna szczepu *E. coli* kodującego białko DraC bez mutacji, a frakcjami fimbrii Dr izolowanymi ze szczepów *E. coli* kodujących białko DraC-Cys64/Ala i DraC-Cys100/Ala. Takie badania pozwalają tylko na identyfikację wyraźnych różnic

## WYNIKI

jakościowych, wskazując na niskie stężenie fimbrii Dr izolowanych ze szczepów *E. coli* produkujących zmutowane formy białka DraC w pozycji Phe4 i Trp142.



**Rys. 26.** Mikrofotografie immunofluorescencyjne kompleksów kulek fluorescencyjnych opłaszczonych frakcjami fimbrii Dr rekombinantowych szczepów *E. coli* do komórek linii HeLa.

Frakcje fimbrialne pochodziły ze szczepów *E. coli* BL21(DE3) niosących plazmidy: A - pET30-sygDraB-C-His-DraE; B - pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE; C - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys100mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; D - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; E - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; F - pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys64mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE. Prawa część panelu – światło widzialne, lewa – UV (powiększenie 2500x, mikroskop immunofluorescencyjny Olympus BX60).

### 6.8.6. Badanie właściwości adherentnych fimbrii Dr do komórek linii HeLa metodą ELISA

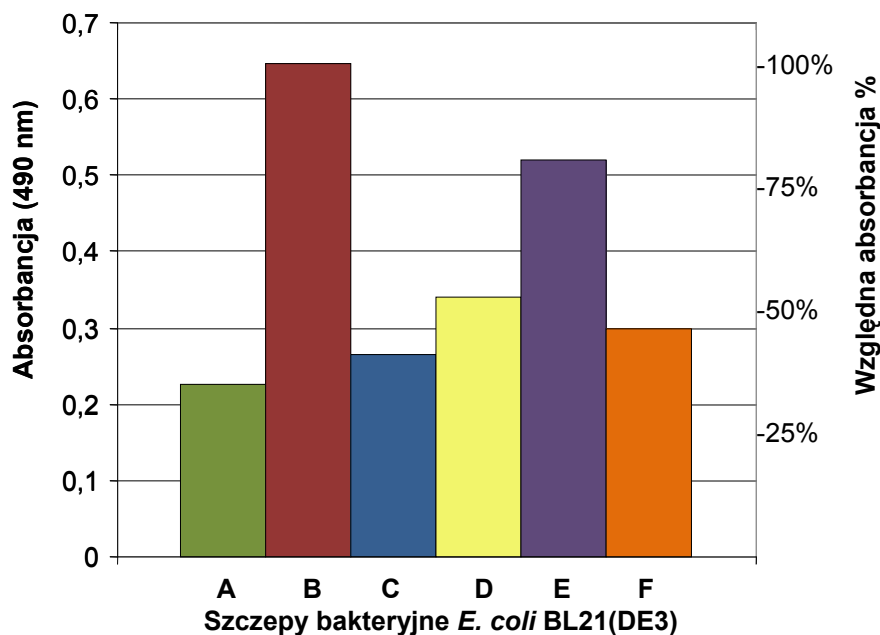
Właściwości adherentne czterech rekombinantowych szczepów *E. coli*, produkujących zmutowane formy białka DraC (DraC-Phe4/Ala, DraC-Cys64/Ala, DraC-Cys100/Ala i DraC-Trp142/Ala) do komórek linii HeLa zbadano z wykorzystaniem zmodyfikowanego testu ELISA. Doświadczenie to pozwala na ilościową ocenę interakcji fimbrii Dr z receptorem komórkowym DAF.

## WYNIKI

Wykonano test ELISA, w którym studzienki mikroplątki opłaszczano komórkami linii HeLa, a następnie dodawano zawiesiny bakteryjne o tym samym  $OD_{600}$  (Metody 5.23).

Zaobserwowano obniżoną absorbcję w przypadku wszystkich czterech szczepów *E. coli* kodujących zmutowane formy białka DraC, a szczególnie w pozycji Phe4 i Trp142 (Rys. 27). Poziomy absorbcji w stosunku do szczepu dzikiego (100%) wynosiły: 40% dla mutantu DraC-Phe4/Ala; 46,2% dla mutantu DraC-Trp142/Ala; 53,3% dla mutantu DraC-Cys64/Ala oraz 78,5% dla mutantu DraC-Cys100/Ala.

Wyniki tego eksperymentu potwierdziły wnioski z wcześniejszych doświadczeń, że szczepy *E. coli* z plazmidem, niosącym zmutowany gen *draC* w sekwencji nukleotydowej kodującej Phe4, Trp142, Cys64 i Cys100, posiadają obniżoną zdolność do biogenezy fimbrii Dr.



**Rys. 27.** Diagram przedstawiający oddziaływanie fimbrii Dr szczepów bakteryjnych *E. coli* z komórkami linii HeLa: A - *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE; B - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE; C - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; D - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys64mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; E - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys100mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE; F - *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut/pET30-sygDraB-C-His-DraE.

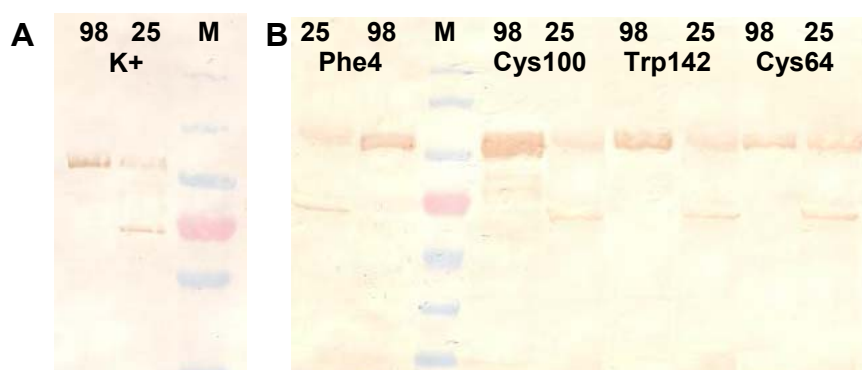
### 6.9. Badanie struktury mutantów białka DraC

Cechą wszystkich bakteryjnych zewnątrzłonowych białek kanałowych jest ich charakterystyczna temperaturowo-zależna ruchliwość podczas elektroforezy SDS-PAGE. Białka inkubowane przed rozdziałem elektroforetycznym w buforze zawierającym SDS w temperaturze 95°C migrują w żelu poliakryloamidowym zgodnie z ich masą cząsteczkową. Natomiast, białka inkubowane w buforze zawierającym SDS, ale w niższej temperaturze, migrują w elektroforezie żelowej odmiennie, tzn niezgodnie z ich masą cząsteczkową. Wynika to z faktu, że obecna w tych białkach struktura  $\beta$ -beczki nie ulega denaturacji pod wpływem samego SDS bez ogrzewania i stąd białka te migrują w elektroforezie szybciej niż ich formy zdenaturowane termicznie.

Dla sprawdzenia, czy zahamowanie biogenezy fimbrii Dr dla niektórych zmutowanych form białka DraC zachodzi w wyniku zaburzeń w oddziaływaniu z kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna, czy też jest wynikiem zmiany w ich strukturze, wykonano eksperymenty badania temperaturowo-zależnej ruchliwości elektroforetycznej tych białek. W tym celu wyizolowane frakcje zewnątrzłonowe (Metody 5.15) z komórek *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mutPhe4, *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mutTrp142, *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mutCys64, *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-mutCys100 i *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His inkubowano przed rozdziałem elektroforetycznym w buforze Laemmli w temperaturze 25°C i 98°C. Jak pokazano na Rys. 28 badane zmutowane formy białka DraC migrowały w żelu poliakrylamidowym znacznie szybciej niż to wynika z ich masy cząsteczkowej i porównywalnie z białkiem DraC dzikiego typu. Na podstawie tych doświadczeń można twierdzić, że wprowadzone mutacje nie zaburzały struktury mutantowych form białek DraC. Fakt, że mutacje te hamowały biogenezę fimbrii Dr pozwala przypuszczać, iż zastąpione reszty aminokwasowe alaniną destabilizują tylko samą domenę N-terminalną białka DraC, odpowiedzialną za interakcję z kompleksem białek DraE/DraB.



## WYNIKI



**Rys. 28.** Immunoidentyfikacja zmutowanych białek DraC we frakcjach błony zewnętrznej inkubowanych przed elektroforezą w buforze Laemmli w temperaturze 25°C i 98°C. Frakcje fimbrialne izolowane ze szczepów: A - *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His (kontrola pozytywna); B - *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut; C - *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys100mut; D - *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut; E - *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Cys64mut; M - marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting wielkości – 170, 130, 100, 70 (czerwony prążek), 55, 40, 35, 25, 15 i 10 kDa.

### 6.10. Ekspresja i oczyszczanie białka DraC-C-His do badań *in vitro*

Ekspresję genu kodującego białko DraC-C-His z plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His w komórkach *E. coli* Top 10F' prowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w Metodach 5.14. Zbierano próbki całkowitych lizatów w różnych odstępach czasu od momentu indukcji ekspresji arabinozą. Próbkę poddawano elektroforezie poliakrylamidowej w celu wykrycia białka DraC-C-His. Jednak, wśród wielu widocznych na żelu prążków trudne jest wskazanie prążka odpowiadającego białku DraC, gdyż jego ekspresja najprawdopodobniej (jak większości białek błonowych) zachodzi na stosunkowo niskim poziomie (wyniki nie pokazane). W związku z tym obecność białka DraC-C-His w otrzymanych frakcjach całkowitych lizatów identyfikowano stosując technikę Western blotting z użyciem przeciwciał anty-His-Tag (Metody 5.12).

Jak pokazano na Rys. 29, obecność białka DraC-C-His w lizatach komórkowych szczepu *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-DraC-C-His potwierdzono techniką Western blotting. Widoczne są prążki białkowe na wysokości odpowiadającej masie cząsteczkowej białka DraC. W każdym przypadku (oprócz lizatu izolowanego w momencie indukcji) widoczne są dwa prążki odpowiadające białku DraC z sekwencją sygnałną i białku DraC bez sekwencji sygnałnej. Wynik pozytywny przeprowadzonej analizy w przypadku zastosowania przeciwciał anty-

## WYNIKI

His•Tag potwierdza poprawność wykonanego klonowania poprzez stwierdzenie obecności domeny oligohistydynowej w badanym białku.



**Rys. 29.** Immunoidentyfikacja białka DraC w lizatach białkowych komórek bakterii *E. coli* TOP 10F', zawierających plazmid pACYCpBAD-sygDraC-C-His, za pomocą mysich przeciwciał anti-His-Tag.

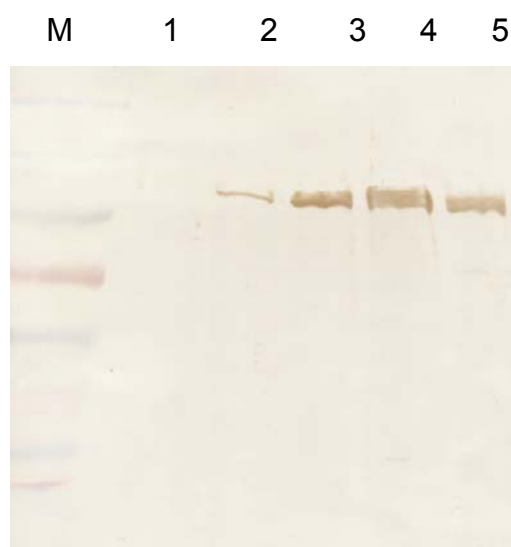
M - marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting wielkości – 160, 110, 90, 70 (czerwony prążek), 55, 45, 35, 25, 15 i 10 kDa; frakcje całkowitych lizatów komórek pobranych w momencie indukcji arabinozą; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 h po indukcji arabinozą; odpowiednio ścieżki od 1 do 7.

W celu oczyszczenia białka kanałotwórczego DraC z komórek bakteryjnych *E. coli* TOP 10F'/pACYCpBAD-DraC-C-His, konieczna jest na etapie wstępnym izolacja błon zewnętrznych z komórek. Oddzielanie zewnętrznych błon komórkowych od błon cytoplazmatycznych polega na różnicowej ekstrakcji detergentem, np. Sarkozylem (Metody 5.15). W wyniku odwirowania frakcji komórkowej poddanej uprzednio sonifikacji (lub po dezintegracji prasą Frencha) z dodatkiem Sarkozylu, otrzymujemy osad zewnętrznych błon komórkowych, zawierających białko DraC. Następnie białka błonowe ekstrahujemy przy pomocy niejonowego detergentu DDM, z dodatkiem 20% glicerolu, wspomagającego ekstrakcję. Detergent ten jest często używany do rozpuszczania białek błonowych, z zachowaniem ich funkcjonalnych właściwości. Niestety, mimo wielokrotnych prób, tylko niewielka część białek DraC przechodziła do frakcji rozpuszczalnej, a duża jego ilość wciąż pozostawała we frakcji błonowej. Próbowano optymalizować stężenie DDM i glicerolu używanych do ekstrakcji białka z błony. Wykazano, że najlepsze rezultaty otrzymuje się stosując 0,75% stężenie DDM i 20% glicerolu. Stężenie detergentu używanego do rozpuszczania białek błonowych jest bardzo ważne, gdyż musi być ono wyższe od tzw. wartości cmc, czyli

## WYNIKI

minimalnego stężenia detergentu, gdzie tworzą się micelle. Stężenie to zależy od wielu czynników, m.in. temperatury, czy pH.

Poszczególne frakcje otrzymywane podczas izolacji białka DraC z zewnętrznej błony komórkowej poddawano identyfikacji metodą Western blotting. Frakcje osadów przygotowywano do nanoszenia w ten sposób, że pobierano minimalną ilość osadu końcówką tipsa i zawieszano w 200  $\mu$ l buforu TE i z tego pobierano 15  $\mu$ l do przygotowania próbki do elektroforezy. Na Rys. 30 (ścieżka 2) widoczny jest prążek białkowy odpowiadający wyizolowanemu z błony zewnętrznej białku DraC-C-His o stężeniu 0,04 mg/ml. Frakcję białka, wyizolowanego z 3 litrów hodowli, oczyszczano stosując technikę chromatografii metalopowinowactwa (Metody 5.19), a następnie dializowano i zagęszczano dziesięciokrotnie do objętości 1 ml. Przeciętnie z 1 litra hodowli uzyskiwano zaledwie 0,1 mg białka.



**Rys. 30.** Immunoidentyfikacja rekombinantowego białka DraC-His we frakcjach uzyskanych podczas jego izolacji z błony zewnętrznej.

M - marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting wielkości – 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 i 10 kDa; 1 – supernatant po ekstrakcji 2% DDM i 20% glicerolem; 2 – supernatant po ekstrakcji 0,75% DDM i 20% glicerolem; 3 – osad po ekstrakcji 2% DDM i 20% glicerolem; 4 – osad po ekstrakcji 0,75% DDM i 20% glicerolem; 5 – frakcja błony zewnętrznej po ekstrakcji sarkozylem.

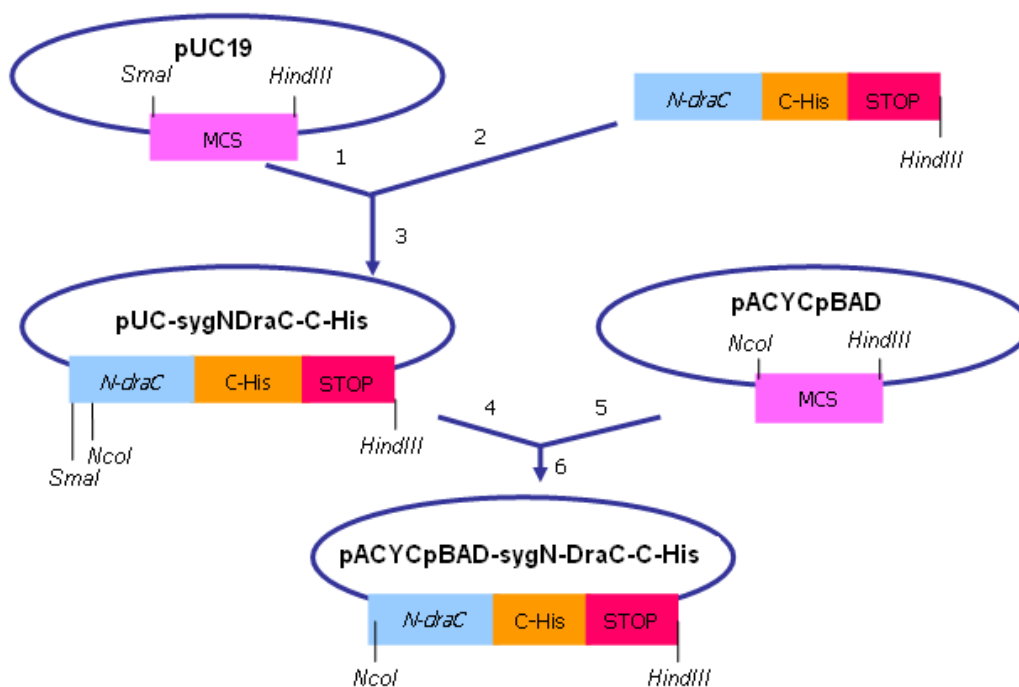
### 6.11. Konstrukcja szczepu *E. coli* produkującego N-terminalną domnę białka DraC

Bardzo niska wydajność izolacji całego białka kanałotwórczego DraC stanowiła duży problem, gdyż do badań *in vitro* oddziaływań tego białka z innymi białkami uczestniczącymi w biogenezie fimbrii Dr potrzebna jest jego znaczna ilość. W

## WYNIKI

związku z tym postanowiono do tych badań otrzymać tylko domenę N-terminalną białka DraC, licząc na jej efektywną produkcję.

Skonstruowano plazmid rekombinantowy kodujący N-terminalną domenę białka DraC z fuzją oligohistydynową na C-końcu (Rys. 31).



**Rys. 31.** Schemat konstrukcji plazmidu pACYCpBAD-sygN-DraC-C-His.

Kolejnymi numerami zostały zaznaczone następujące etapy: 1 - trawienie wektora pUC19 enzymami restrykcyjnymi *SmaI* oraz *HindIII*; 2 - trawienie produktu amplifikacji fragmentu genu *draC* powstałego na matrycy DNA plazmidu pCC90 enzymem restrykcyjnym *HindIII*; 3 – reakcja ligacji DNA wektora z DNA insertu; 4 - trawienie plazmidu rekombinantowego pUC19-sygN-DraC-C-His enzymami *NcoI* oraz *HindIII*; 5 - trawienie wektora pACYCpBAD enzymami *NcoI* oraz *HindIII*; 6- reakcja ligacji DNA wektora z otrzymanym insertem N-DraC-C-His.

Fragment N-terminalny białka DraC, reszty od 1 do 148, stanowił fragment homologiczny do N-terminalnej domeny białka FimD<sub>N</sub> badanego przez zespół Nishiyamy [Nishiyama i wsp., 2003]. Na podstawie sekwencji genu *draC* zaprojektowano parę starterów, N-DraC-up oraz N-DraC-down (Materiały 4.9), do amplifikacji techniką PCR DNA fragmentu genu, kodującego N-terminalny fragment białka DraC. Do produktu PCR wprowadzone zostały za pomocą starterów miejsca rozpoznania dla restryktazy *HindIII* (C-koniec), *NcoI* (N-koniec) oraz sekwencja kodująca domenę oligohistydynową (His<sub>6</sub>). W wyniku amplifikacji otrzymano właściwy produkt PCR o wielkości 587 pz, kodujący N-terminalną domenę białka DraC wraz z

sekwencją sygnałną, warunkującą transport do przestrzeni periplazmatycznej. Otrzymany amplikon trawiono restryktazą *Hind*III (Materiały 4.8, Metody 5.2) i poddano reakcji ligacji z DNA wektora pUC19 (Metody 5.3), trawionym restryktazami *Hind*III i *Sma*I, otrzymując plazmid rekombinantowy pUC-sygNDraC-C-His. Następnie przeklonowano fragment DNA kodujący N-terminalną domenę białka DraC z sekwencją sygnałną i domeną oligohistydynową na C-końcu do plazmidu ekspresyjnego pACYCpBAD (Materiały 4.2), z użyciem restryktaz *Nco*I i *Hind*III. W wyniku klonowania otrzymano plazmid rekombinantowy pACYCpBAD-sygNDraC-C-His o wielkości 4972 pz. Poprawność konstruktów zweryfikowano przez sekwencjonowanie.

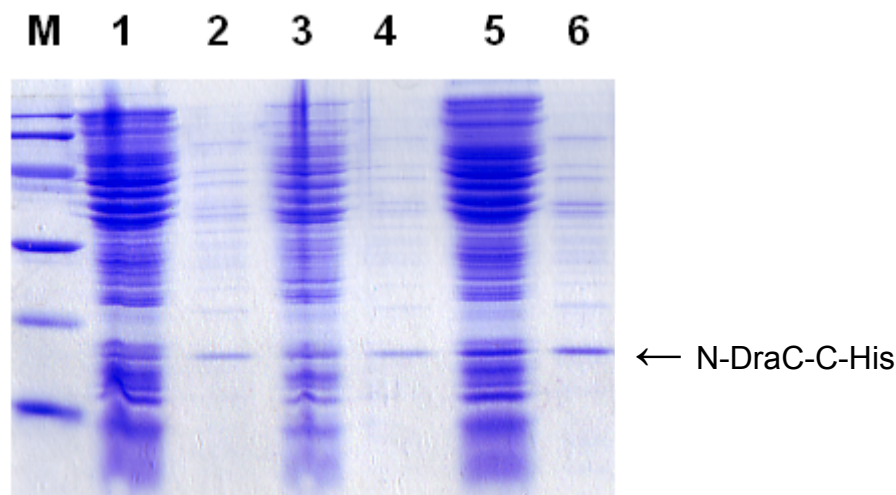
### 6.12. Ekspresja i oczyszczanie domeny N-terminalnej białka DraC-C-His

Szczep *E. coli* TOP10F' niosący DNA plazmidu rekombinantowego pACYCpBAD-sygNDraC-C-His zastosowano do otrzymania białka N-DraC-C-His, złożonego z N-terminalnej domeny białka DraC (reszty aminokwasowe od 1 do 148) i domeny oligohistydynowej na C-końcu. Podczas prowadzenia ekspresji (Metody 5.9) zbierano próbki hodowli w celu przygotowania frakcji całkowitych lizatów (1,5 ml hodowli wirowano 5 min, przy 12000 rpm, a osad zawieszano w 100 µl buforu TE i zamrażano) oraz frakcji periplazmatycznych (Metody 5.17). Analiza elektroforetyczna tych frakcji (Rys. 32) w 15% żelu poliakryloamidowym pozwoliła na stwierdzenie obecności białka N-DraC-C-His w obu frakcjach. Na elektroforogramie widoczny jest prążek, który odpowiada domenie N-terminalnej bez sekwencji sygnałnej o masie cząsteczkowej 15,8 kDa.

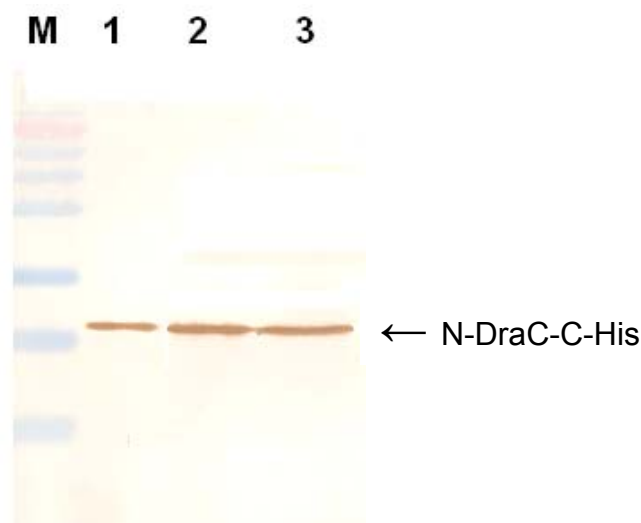
Aby jednoznacznie potwierdzić obecność białka N-DraC-C-His w otrzymanych frakcjach, poddano je analizie Western blotting z użyciem przeciwciał anti-His•Tag.(Metody 5.12).

Technika Western blotting potwierdziła obecność domeny N-terminalnej białka DraC we frakcjach periplazmatycznych (Rys. 33). Wykrycie tego rekombinantowego białka w przestrzeni periplazmatycznej świadczy o tym, iż jest ono ekspymowane wraz z sekwencją sygnałną, która umożliwiła jego transport przez błonę wewnętrzną. Otrzymany wynik potwierdza także poprawność przeprowadzonej procedury klonowania poprzez stwierdzenie obecności domeny oligohistydynowej z użyciem przeciwciał anti-His•Tag.

## WYNIKI



**Rys. 32.** Rozdział elektroforetyczny białek zawartych w całkowitych lizatach oraz we frakcjach perioplazmatycznych komórek *E. coli* Top 10F' niosących plazmid pACYCpBAD-sygNDraC-C-His. M – białkowy marker wielkości – 97, 66, 45, 30, 20, 14.4 kDa (Amersham). Frakcje całkowitych lizatów pobranych w 1, 2 lub 3 h po indukcji arabinozą, odpowiednio ścieżki 1, 3 i 5. Frakcje perioplazmatyczne izolowane w 1, 2 lub 3 h po indukcji arabinozą, odpowiednio ścieżki 2, 4 i 6.



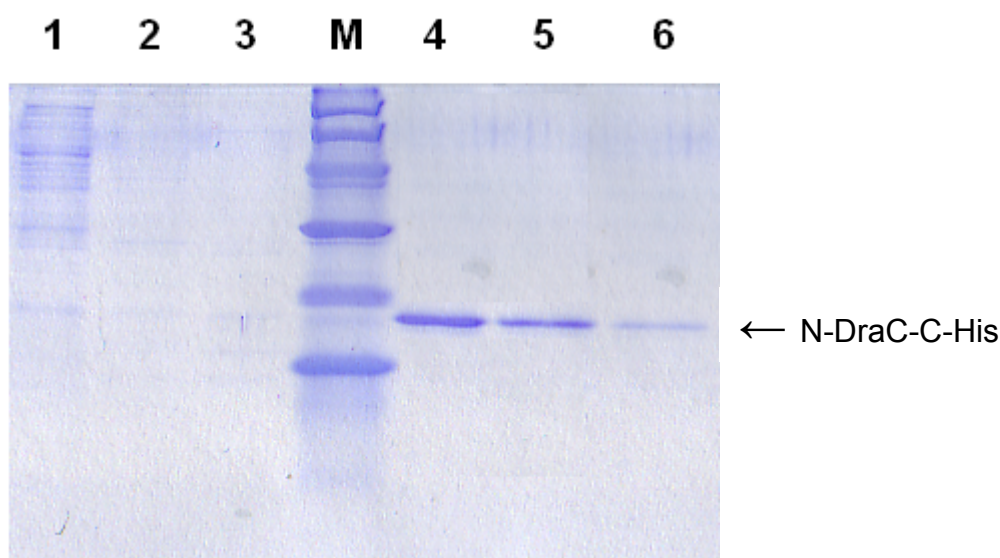
**Rys. 33.** Immunoidentyfikacja białka N-DraC-C-His we frakcjach perioplazmatycznych *E. coli* Top 10F' zawierających plazmid pACYCpBAD-sygNDraC-C-His za pomocą mysich przeciwciał anty-His•Tag. M – marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting – 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15 i 10 kDa. Frakcje perioplazmatyczne izolowane w 1, 2 i 3 h po indukcji arabinozą, odpowiednio ścieżki 1, 2 i 3.

Produkcję białka N-DraC-C-His prowadzono najczęściej jednocześnie w czterech kolbach. Sumaryczna objętość hodowli wynosiła więc 3200 ml. Z takiej ilości uzyskiwano przeciętnie ok. 25 g mokrej masy osadu komórkowego. Następnie z komórek izolowano frakcję perioplazmatyczną (Metody 5.17), uzyskując w ten

## WYNIKI

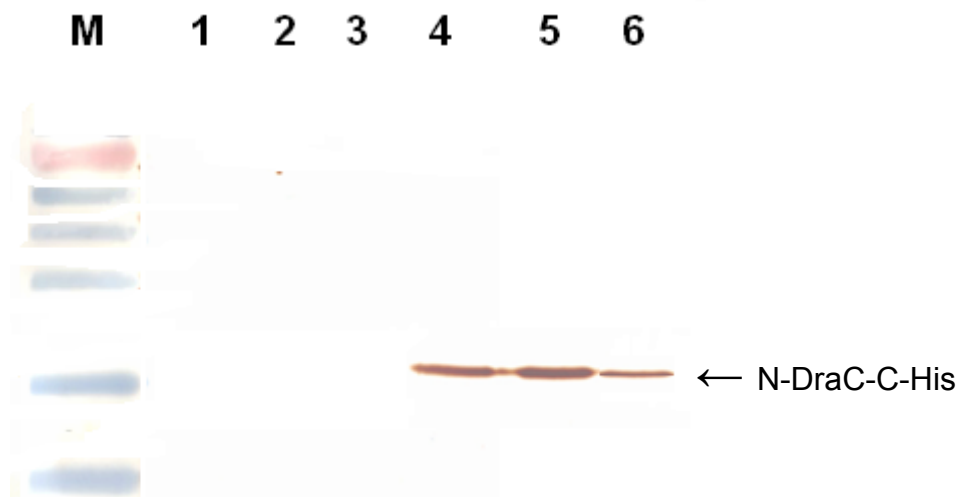
sposób 50 ml frakcji białek periplazmatycznych. Uzyskaną frakcję oczyszczano stosując technikę chromatografii metalopowinowactwa (Metody 5.19). Następnie otrzymane po oczyszczeniu frakcje poddawano analizie elektroforetycznej (Rys. 34) oraz Western blotting (Rys. 35).

W wyniku oczyszczania za pomocą chromatografii metalopowinowactwa uzyskano homogenny elektroforetycznie preparat N-terminalnej domeny białka DraC. Frakcje elucyjne dializowano wobec 10 mM buforu fosforanowego (pH 7,2), a po 24-godzinnej dializie zagęszczano dziesięciokrotnie do objętości 1,5 ml. Przeciętnie z 1 litra hodowli uzyskiwano 10 mg białka.



**Rys. 34.** Rozdział elektroforetyczny w 15% żelu poliakrylamidowym próbek uzyskanych podczas procedury oczyszczania białka N-DraC-C-His za pomocą chromatografii metalopowinowactwa.

1 – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem A; 2 – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem B; 3 – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem C; M – białkowy marker wielkości – 97, 66, 45, 30, 20, 14.4 kDa (Amersham); 4, 5 i 6 – frakcje elucyjne zawierająca białko N-DraC-C-His bez sekwencji sygnałnej, odpowiednio po 1, 2 i 3 elucji.



**Rys. 35.** Immunoidentyfikacja białka N-DraC-C-His w oczyszczonych frakcjach periplazmatycznych za pomocą mysich przeciwciał anti-His-Tag. M – marker białkowy do detekcji białek metodą Western blotting wielkości – 160, 110, 90, 70, 55, 45, 35, 25, 15 i 10 kDa; 1 – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem A; 2 – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem B; 3 – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem C; 4, 5 i 6 – frakcje elucyjne zawierające białko N-DraC-C-His bez sekwencji sygnałnej, odpowiednio po 1, 2 i 3 elucji.

### 6.13. Badanie struktury drugorzędowej i stabilności termicznej domeny N-terminalnej białka DraC techniką spektroskopii w podczerwieni

Oczyszczony preparat domeny N-terminalnej białka DraC przygotowano do badania techniką IR (Metody 5.21), a następnie analizowano drugie pochodne uzyskanych widm (Rys. 36).

Analiza drugiej pochodnej widma w temperaturze ok. 29°C wskazuje na obecność struktur  $\beta$ -krotek i  $\alpha$ -helis lub struktur pętlowych. Składowa odpowiadająca strukturom  $\beta$  jest składową dominującą (ok. 1630  $\text{cm}^{-1}$ ). Zanika ona wraz ze wzrostem temperatury i jest praktycznie niewidoczna w temperaturze powyżej 70°C. Składowa ta, o wysokiej wartości absorbancji, wskazuje bezpośrednio na obecność struktur typu  $\beta$ -krotki [Barth i Zscherp, 2002; Stuart, 2004]. Wyznaczona dla tej długości fali krzywa denaturacji białka oraz jej pochodna (Rys. 37) wskazują na przejście jednoetapowe z temperaturą denaturacji wynoszącą ok. 61,7°C. Składowa znajdująca się przy 1644  $\text{cm}^{-1}$  może odpowiadać strukturom  $\alpha$ -helisy lub fragmentom pętlowym. Obie struktury są dość trudne do rozróżnienia na widmach IR, nawet pomimo zastosowania  $\text{D}_2\text{O}$  jako rozpuszczalnika. W trakcie ogrzewania próbki składowa ta początkowo maleje, później staje się wyraźniejsza i przesuwa się w

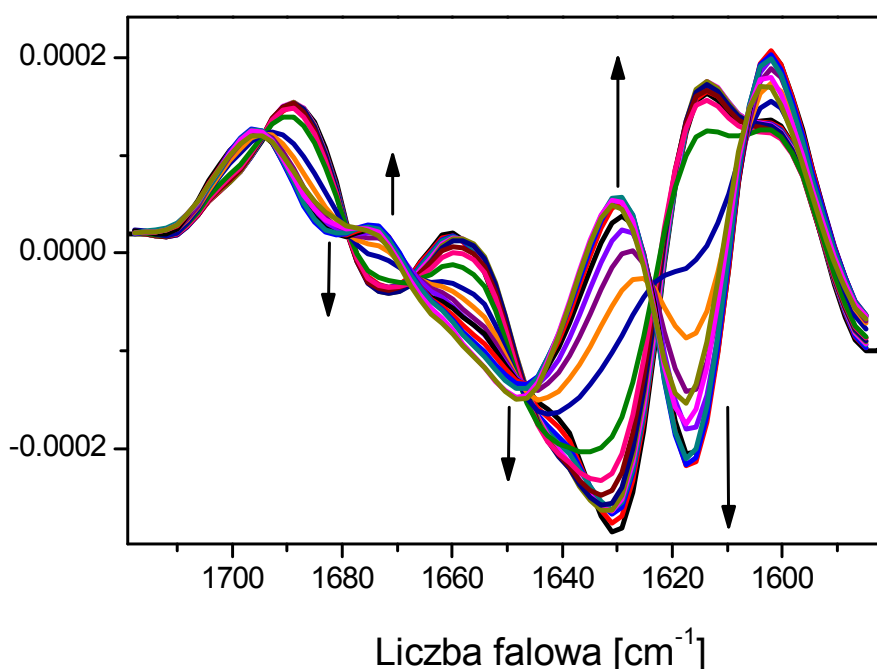


## WYNIKI

stronę wyższych liczb falowych do  $1646\text{ cm}^{-1}$ . Można podejrzewać, że w tym samym zakresie absorbują jednocześnie obie wymienione struktury. Krzywa denaturacji białka, utworzona na podstawie tej długości fali (Rys. 37) wskazuje na temperaturę denaturacji ok.  $61,4^{\circ}\text{C}$ .

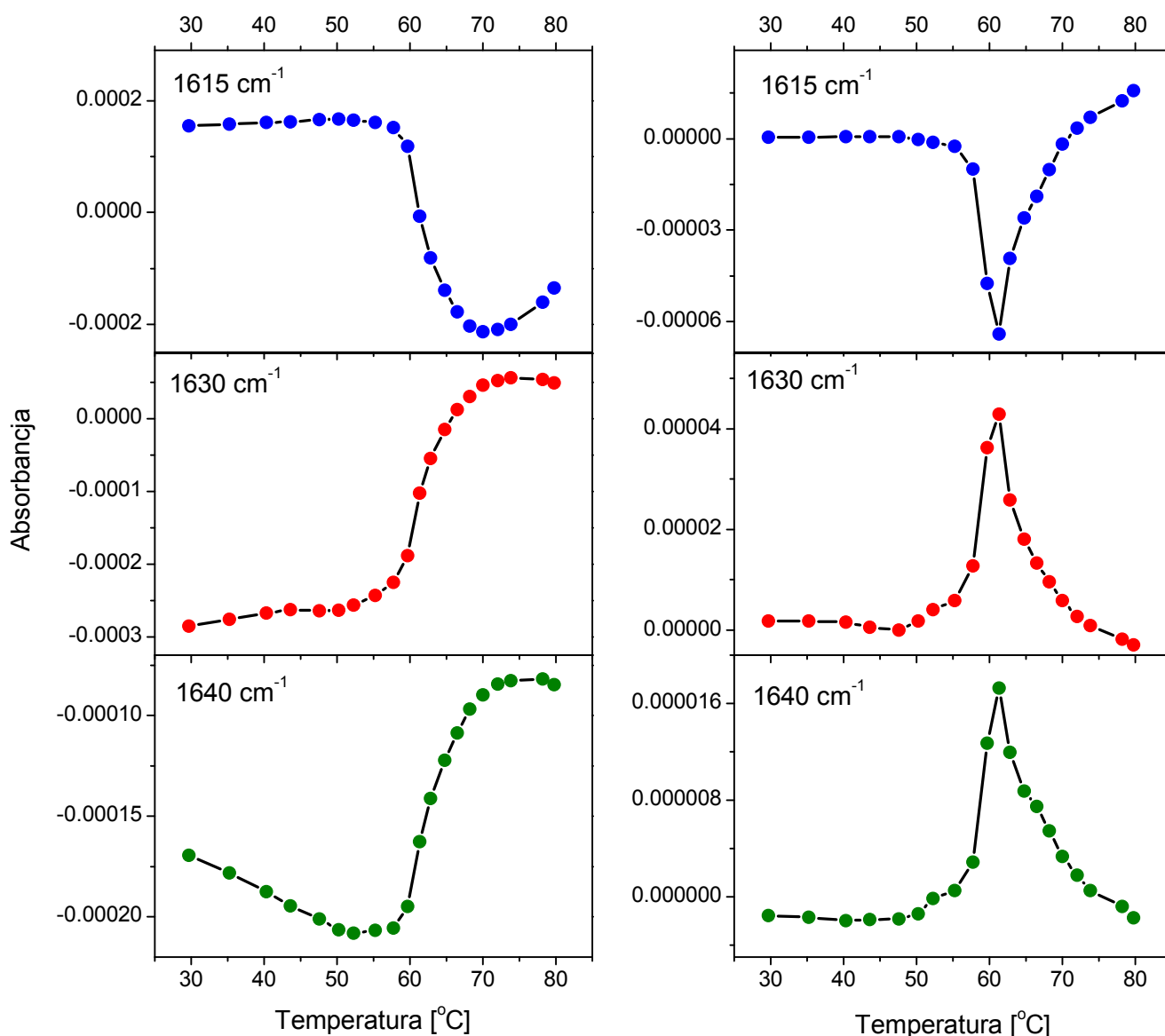
Denaturacja termiczna domeny N-terminalnej białka zachodzi w sposób charakterystyczny dla wielu innych białek globularnych, tj. pojawiają się charakterystyczne pasma odpowiadające białku denaturowanemu (Rys. 36). Największa zmiana widoczna na serii drugich pochodnych widm dotyczy pasma  $1616\text{ cm}^{-1}$ , niewidocznego na widmach białka w niższych temperaturach. Podobnym wskaźnikiem denaturacji jest słabe pasmo przy ok.  $1680\text{ cm}^{-1}$ . Wszystkie uzyskane krzywe denaturacji oraz ich pochodne wskazują na podobną temperaturę denaturacji – niewiele ponad  $61^{\circ}\text{C}$  (Rys. 37).

Uzyskane informacje na temat budowy drugorzędowej białka N-DraC-C-His pokrywały się z dotychczasowymi wiadomościami na temat białek homologicznych. Wyniki te świadczą również o prawidłowej strukturze uzyskanej domeny.



**Rys. 36.** Seria drugich pochodnych widma białka w zakresie temperatur  $30 - 80^{\circ}\text{C}$ . Strzałki wskazują kierunek najważniejszych zmian. Analiza w tekście.

## WYNIKI



Rys. 37. Krzywe denaturacji (po lewej) i ich pochodne (po prawej).

### 6.14. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych zawierających mutacje punktowe w genie kodującym fuzyjne białko NDraC-C-His

Aby sprawdzić jaki jest wpływ mutacji w miejscach Phe4, Trp142, Cys64, Cys100 w białku DraC na jego oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze DraB – podjednostka strukturalna DraE, konieczne jest uzyskanie oczyszczonych preparatów domeny N-terminalnej białka DraC, zawierających powyższe mutacje. W tym celu, na bazie plazmidu pACYCpBAD-sygNDraC-C-His, skonstruowano mutanty białka DraC<sub>N</sub> (Materiały 5.8). Komórki *E. coli* TOP 10F' transformowano otrzymanymi plazmidami, zawierającymi mutacje w genie kodującym domenę N-terminalną białka DraC. Podczas prowadzenia ekspresji (Metody 5.9) zbierano próbki hodowli w celu

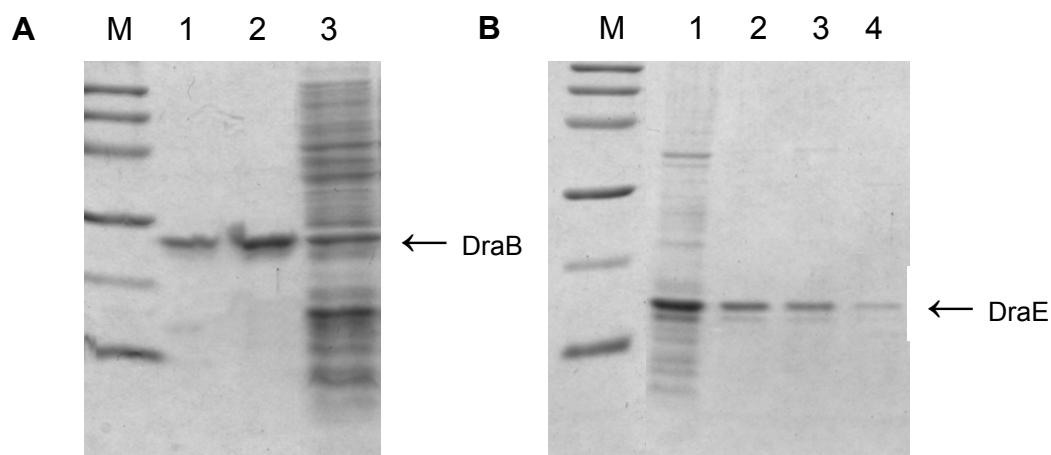
izolacji frakcji periplazmatycznych (Metody 5.17). Analiza elektroforetyczna tych frakcji w 15% żelu poliakryloamidowym pozwoliła na stwierdzenie obecności tylko dwóch mutantów białka N-DraC-C-His: Phe4 i Trp142, natomiast nie zaobserwowano prążków, odpowiadającym mutantom domeny N-terminalnej w miejscach Cys64 i Cys100 (dane nie pokazane).

Izolację i oczyszczanie mutantów białka DraC<sub>N</sub> (Phe4 i Trp142) prowadzono analogicznie do białka DraC<sub>N</sub> bez mutacji (Wyniki 6.12) i uzyskiwano zbliżoną ilość białka, którą przechowywano w 4<sup>0</sup>C do czasu dalszych analiz.

### **6.15. Próby otrzymywania kompleksów białko opiekuńcze DraB – podjednostka DraE**

Do badania oddziaływań białka DraC-C-His lub jego domeny N-terminalnej z kompleksem białko opiekuńcze -podjednostka strukturalna konieczne jest uzyskanie preparatu, zawierającego oczyszczone kompleksy białek DraB i DraE. W tym celu izolowano frakcje periplazmatyczne (Metody 5.17) ze szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30-DraB-C-His-DraE, który pozwala na ekspresję do przestrzeni periplazmatycznej natywnego białka DraE oraz białka DraB zawierającego fuzję histydynową na C-końcu. Uzyskaną frakcję oczyszczano stosując technikę chromatografii metalopowinowactwa (Metody 5.19). Zastosowano fizjologiczne stężenie soli celem eliminacji potencjalnego wpływu tego czynnika na dysocjację kompleksów DraB/DraE. Frakcje z płukania kolumny oraz frakcje elucyjne analizowano przy pomocy techniki SDS-PAGE. We frakcji periplazmatycznej szczepu *E. coli* BL21(DE3) /pET30-DraB-C-His-DraE widoczne są białka DraE i DraB-C-His. Niestety we frakcjach elucyjnych zaobserwowano tylko prążek odpowiadający białku DraB-C-His, natomiast białko DraE znajdowało się we frakcji zebranej podczas płukania kolumny (Rys. 38).

## WYNIKI



**Rys. 38.** Rozdział elektroforetyczny w 15% żelu poliakryloamidowym frakcji elucyjnych uzyskanych podczas procedury oczyszczania za pomocą chromatografii metalopowinowactwa kompleksów DraB/DraE z frakcji perioplazmatycznych szczepu *E. coli* BL21(DE3)/pET30-DraB-C-His-DraE.  
A - frakcje elucyjne (ścieżki 1 i 2); frakcja perioplazmatyczna (ścieżka 3).  
B - kolejne frakcje otrzymane podczas płukania złoża buforem płuczającym (ścieżki 1-3).

Sprawdzono również, czy uda się oczyścić kompleksy białko opiekuńcze DraB -podjednostka strukturalna DraE, ze szczepów produkujących białka DraB i DraE z zablokowaną zdolnością do tworzenia oligomerów w perioplazmie. Analizie poddano następujące szczepy:

- *E. coli* BL21(DE3)/pET30-DraB-C-His- $\Delta$ 3DraE - pozwala na ekspresję do przestrzeni perioplazmatycznej białka DraE w postaci mutantu delecyjnego w obrębie N-terminalnej nici donorowej, oraz białko DraB zawierające fuzję histydynową na C-końcu;
- *E. coli* BL21(DE3)/pET30-DraB-C-His-DraE - pozwala na ekspresję do przestrzeni perioplazmatycznej białka DraE, w którym usunięto N-terminalna nić donorową, a w jej miejsce wprowadzono fuzję oligohistydynową, oraz białko DraB w postaci natywnej.

Jednak, tak jak w przypadku opisanego wyżej eksperymentu, stwierdzano obecność białek bez domeny oligohistydynowej głównie we frakcjach z płukania złoża, a białek z domeną oligohistydynową tylko we frakcjach elucyjnych.

### **6.16. Badanie oddziaływań między białkami z zastosowaniem mikrokalorymetrii izotermalnej**

Pomimo, że nie udało się otrzymać kompleksów białka opiekuńczego DraB z podjednostką adhezyny DraE do badań oddziaływań z N-terminalną domeną białka DraC postanowiono przeprowadzić doświadczenia z zastosowaniem mikrokalorymetrii izotermalnej wykorzystując oczyszczone metodą chromatografii metalopowinowactwa preparaty białek DraB-C-His, DraEdsc-N-His i DraDdsc-N-His. Do otrzymania powyższych białek zastosowano szczepy: *E. coli* TOP10F'/pACYCpBAD-sygN-DraC-C-His (N-DraC-C-His), *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraB-C-His-DraE (DraB z domeną oligohistydynową na C-końcu), *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraEdsc-N-His i *E. coli* BL21(DE3)/pET30-sygDraDdsc-N-His (fuzyjne białka rekombinantowe DraEdsc i DraDdsc z domeną oligohistydynową na N-końcu, stabilne, monomeryczne formy nie ulegające polimeryzacji).

Badano oddziaływania domeny N-terminalnej białka DraC z poszczególnymi białkami: DraB, DraEdsc i DraDdsc. Wyniki eksperymentów wskazywały jednoznacznie na brak oddziaływań między tymi białkami. Nie zaobserwowano efektów cieplnych świadczących o oddziaływaniach. Są one na poziomie oddziaływań wynikających z mieszania buforów o różnych temperaturach i rozcieńczenia białka.

### 7. PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

Niniejsza praca doktorska stanowi część szeroko zakrojonych badań prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej nad biogenezą fimbrii Dr eksprymowanych przez uropatogenne szczepy *E. coli* Dr+, wywołujących przewlekłe infekcje górnych dróg moczowych. Przedmiotem prowadzonych badań było badanie białka DraC, kodowanego przez operon *dra* tych bakterii, odpowiedzialnego za zewnątrzkomórkową polimeryzację fimbrii Dr. Obecny stan wiedzy na temat tego białka jest bardzo znikomy, gdyż brakuje danych doświadczalnych dotyczących jego struktury i mechanizmu działania. Bardzo dokładnie zbadane są natomiast białka PapC i FimD, biorące udział w biogenezie pili typu P (PapC) i typu 1 (FimD), pełniące w niej tę samą rolę, co białko DraC w biogenezie fimbrii Dr. Przeprowadzono szereg doświadczeń, które pozwoliły na poznanie struktury tych białek, mechanizmu działania, a także określenia reszt aminokwasowych, istotnych dla funkcjonowania tych białek [Dodson i wsp., 1993; Jacob-Dubuisson i wsp., 1994; Saulino i wsp., 1998; Thanassi i wsp., 1998, 2002; Ng i wsp., 2004; Henderson i wsp., 2004; Li i wsp., 2004; Capitani i wsp., 2006; So i Thanassi, 2006; Munera i wsp., 2007, 2008; Daniels i Normark, 2008; Remaut i wsp., 2008; Daniels i Normark, 2008; Nishiyama i wsp., 2008; Eidam i wsp., 2008; Yu i wsp., 2009;].

Badania rozpoczęto od przeprowadzenia porównawczej analizy sekwencyjnej białek FUP, do których należy DraC. Analiza ta wykazała wysoki stopień homologii pomiędzy białkami kanałotwórczymi bakterii Gram-ujemnych. Szczególnie duże podobieństwo można zauważyć w obrębie domeny N-terminalnej. Pozwala to przypuszczać, iż białko DraC, podobnie jak inne białka „usher” biorące udział w szlaku biogenezy struktur adhezyjnych typu „chaperone/usher”, funkcjonują według jednego ogólnego mechanizmu, według którego działają białka FimD i PapC [Nishiyama, 2005]. Bliższa analiza sekwencyjna pokazała, iż w obrębie białek FUP mogą występować potencjalne preferencje strukturalne związane z udziałem tych białek w biogenezie struktur adhezyjnych, w których biorą udział białka opiekuńcze z rodziny FGL i FGS. Tak jak w przypadku białek opiekuńczych, również w obrębie białek kanałotwórczych, preferencje strukturalne można wiązać z unikalnymi własnościami kompleksów białko opiekuńcze – podjednostka strukturalna odpowiednio podrodzin FGS i FGL. Można zaobserwować wyższy poziom

## PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

---

identyczności w obrębie białek „usher” biorących udział w biogenezie struktur homopolimerycznych (FGL) lub heteropolimerycznych (FGS), niż w obrębie wszystkich białek FUP. Białka PapC i FimD razem z białkami opiekuńczymi typu FGS, biorą udział w biogenezie struktur adhezyjnych heteropolimerycznych, natomiast białko DraC i białko DraB (rodzina FGL) uczestniczą w powstawaniu struktur adhezyjnych homopolimerycznych. Pomimo ogólnego zakonserwowania, obserwowane w analizie sekwencyjnej różnice pomiędzy dwiema podrodzinami białek FUP mogą skutkować w występowaniu różnic w mechanizmie działania białek kanałotwórczych. Jednak, aby to sprawdzić, należało stworzyć odpowiednie formy mutantowe białka DraC i wyznaczyć kluczowe reszty aminokwasowe, odpowiedzialne za oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze DraB – podjednostka adhezyjna DraE.

Do badań skonstruowano plazmid rekombinantowy pACYCpBAD-sygDraC-C-His, pozwalający na produkcję białka kanałotwórczego DraC z domeną oligohistydynową na C-końcu. Sekwencjonowanie genu *draC* plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His ujawniło różnice w sekwencji tego genu z sekwencją zamieszczoną w bazie NCBI. Ten nieoczekiwany wynik sekwencjonowania był przyczyną podjęcia badań dotyczących weryfikacji sekwencji nukleotydowych genów *draC* i *afaC-3* zdeponowanych w bazie NCBI. Sekwencjonowanie genu *draC* z bibliotecznego plazmidu pBJN406 szczepu klinicznego oraz genu *afaC-3* plazmidu pILL61 wykazało, że geny te posiadają identyczną sekwencję nukleotydową. Zidentyfikowane różnice w sekwencji nukleotydowej genu *draC* zmieniły sekwencję aminokwasową tego białka. Białko DraC jest dłuższe o jedną resztę aminokwasową i zamiast reszt aminokwasowych PSAAEGDW jest LRPQLRGIA (reszty 129-137) oraz zamiast DD jest EH (reszty 413-414). Otrzymane sekwencje genów *draC* i *afaC-3* zostały zdeponowane w banku NCBI [numer tymczasowy:FJ843076].

Otrzymany plazmid pACYCpBAD-sygDraC-C-His wykorzystano do konstrukcji modelowego szczepu *E. coli* BL21(DE3), pozwalającego na kontrolowaną produkcję fimbrii Dr. Szczep ten, niosący dwa plazmidy rekombinantowe: pACYCpBAD-sygDraC-C-His, eksprymujący białko „usher” DraC z domeną oligohistydynową na C-końcu oraz pET30-sygDraB-C-His-DraE, eksprymujący do przestrzeni periplazmatycznej białka DraB i DraE, został wykorzystany do doświadczeń *in vivo* badania oddziaływań kompleksu białko opiekuńcze DraB-podjednostka strukturalna DraE z kanałotwórczym białkiem DraC i jego formami mutantowymi oraz

## PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

---

wyznaczenia kluczowych reszt aminokwasowych w sekwencji białka DraC odpowiedzialnych za to oddziaływanie. Plazmidy obecne w skonstruowanym szczepie posiadają niezależnie regulowane promotory stwarzające możliwość regulacji ilości poszczególnych białek, poprzez indukcję w różnym czasie, co pozwala na w pełni kontrolowaną ekspresję adhezyn. Obecność funkcjonalnych fimbrii na powierzchni komórek powstałego szczepu *E. coli* potwierdzono przy pomocy techniki Western blotting, mikroskopii immunofluorescencyjnej oraz hemaglutynacji ludzkich erytrocytów. Wyniki tych doświadczeń świadczą również o braku negatywnego wpływu domeny oligohistydynowej na funkcjonalność białka DraC.

Wykonane eksperymenty z szczepem *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-sygDraC-C-His/pET30-sygDraB-C-His-DraE wykazały, że stanowi on wygodny i uniwersalny system, pozwalający na kontrolowaną ekspresję fimbrii Dr, produkcję różnych zewnątrzkomórkowych struktur adhezyjnych z rodziny Dr lub chimerycznych adhezyn, zawierających heterologiczne wstawki, np. determinanty antygenowe. Można tego dokonać poprzez zamianę jednego z plazmidów na inny plazmid, zawierający geny kodujące białko opiekuńcze i adhezynę (w przypadku zamiany plazmidu pET30-sygDraB-C-His-DraE) lub białko kanałotwórcze (w przypadku zamiany plazmidu pACYCpBAD-sygDraC-C-His), zaangażowanych w powstawanie innych adhezyn rodziny Dr. Opisany układ dwuplazmidowy wykorzystano do efektywnej produkcji innej adhezyny z rodziny Dr - AfaE-III, poprzez zamianę plazmidu pET30-sygDraB-C-His-DraE na inny plazmid zawierający geny *afaE-III* i *afaB*. Takie eksperymenty mogą być pomocne w szczegółowym poznaniu mechanizmów biogenezy struktur adhezyjnych bakterii Gram-ujemnych. Możliwa jest również produkcja adhezyn chimerycznych, niosących determinanty antygenowe pochodzenia bakteryjnego lub wirusowego. Na bazie plazmidów pET30-sygDraB-C-His-DraE i pDraE-HSV3 [Zalewska i wsp., 2003] skonstruowano plazmid pET30-sygDraBE-HSV1, którym następnie transformowano szczep *E. coli* BL21(DE3)/pACYCpBAD-DraC-C-His. Powstały układ pozwolił na efektywną ekspresję chimerycznych fimbrii Dr-HSV1 niosących determinantę antygenową HSV pochodzącą z glikoproteiny D wirusa *Herpes Simple* typu 1. Obecność chimerycznych fimbrii na powierzchni komórki bakteryjnej potwierdzono za pomocą techniki Western blotting i mikroskopii immunofluorescencyjnej.



## PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

---

Kolejnym etapem pracy było wyznaczenie kluczowych reszt aminokwasowych w sekwencji białka DraC, odpowiedzialnych za oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze DraB - podjednostka fimbrialna DraE. Modelowanie homologiczne periplazmatycznej N-terminalnej domeny białka DraC na matrycy domeny N-terminalnej białka FimD oraz analiza sekwencyjna białek FUP pozwoliły na wytypowanie reszt aminokwasowych w sekwencji białka DraC najbardziej zakonserwowanych ewolucyjnie oraz tych będących prawdopodobnie zaangażowanych w oddziaływanie z kompleksem białko opiekuńcze-podjednostka strukturalna. Aby sprawdzić, które z nich odgrywają najważniejszą rolę w biogenezie fimbrii Dr, skonstruowano 17 mutantów białka DraC. Mutacje polegały na zastępowaniu poszczególnych aminokwasów domeny N-terminalnej białka DraC alaniną. Na podstawie badań z wykorzystaniem mikroskopii immunofluorescencyjnej, techniki Western blotting, testu hemaglutynacji ludzkich erytrocytów oraz doświadczeń na linii komórkowej HeLa wykazano, że szczepy produkujące zmutowane formy białka DraC w miejscach Trp142/Ala, Cys64/Ala, Cys100/Ala i Phe4/Ala charakteryzują się obniżoną zdolnością do biogenezy fimbrii Dr. Wyniki te częściowo pokrywają się z danymi literaturowymi odnośnie białek homologicznych PapC i FimD. Wykazano, iż pojedyncze mutacje alaninowe Phe3Ala, Cys70Ala oraz Cys97Ala w białku PapC spowodowały zahamowanie biogenezy struktur adhezyjnych. [Ng i wsp., 2004]. Taki sam efekt wykazywał również mutant Phe4Ala białka FimD [Nishiyama i wsp., 2005]. Występuje jednak pewna różnica, gdyż zastąpienie alaniną reszt fenyloalaniny Phe8 i Phe22 w białku FimD, spowodowało zahamowanie biogenezy pili, a w przypadku reszt homologicznych w białku DraC, mutacje nie miały żadnego wpływu na biogenezę fimbrii Dr.

Sprawdzono również wpływ wprowadzonych mutacji na budowę białka DraC. Wykazano, iż nie mają one wpływu na zdolność białka DraC do temperaturo-zależnej ruchliwości podczas elektroforezy SDS-PAGE, co jest cechą charakterystyczną wszystkich bakteryjnych białek tworzących kanał w błonie zewnętrznej. Mutacje w miejscach Cys64/Ala i Cys100/Ala zaburzyły jednak strukturę domeny N-terminalnej, gdyż nie uzyskano ekspresji tych mutantów ze szczepów *E. coli* TOP10 F'/pACYCpBAD-sygNDraC-C-His-Cys64mut i *E. coli* TOP10 F'/pACYCpBAD-sygNDraC-C-His-Cys100mut, produkujących zmutowaną domenę N-terminalną białka DraC. Reszta aminokwasowa Cys64 razem z resztą aminokwasową Cys100 tworzą w obrębie domeny N-terminalnej białka DraC silnie zakonserwowany (w całej

## PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

---

rodziny białek FUP) mostek disiarczkowy. Mostek ten stabilizuje domenę N-terminalną, a wprowadzenie mutacji punktowych w miejscu reszt cysteinowych uniemożliwia jego utworzenie, co skutkuje w niemożności uzyskania przez domenę N-terminalną białka DraC prawidłowej struktury. Brak mostka disiarczkowego upośledza prawidłowe funkcjonowanie domeny N-terminalnej i następuje blokowanie asocjacji podjednostek adhezyjnych DraE w polimeryczną strukturę fimbrialną na powierzchni komórek *E. coli*.

Pomimo obniżenia poziomu biogenezy fimbrii Dr w szczepach *E. coli* TOP10 F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Phe4mut i *E. coli* TOP10 F'/pACYCpBAD-sygDraC-C-His-Trp142mut, udało się uzyskać ekspresję domeny N-terminalnej zmutowanej w miejscu Phe4/Ala i Trp142/Ala, na poziomie zbliżonym do dzikiej formy N-terminalnej domeny białka DraC. Świadczy to o tym, że mutacje te nie wykazują większego wpływu na stabilność samej domeny, lecz mają charakter funkcjonalny w aspekcie procesu biogenezy. Brak reszty aminokwasowej Trp142 może powodować niemożność uzyskania przez domenę N-terminalną konformacji „otwartej”, gotowej na związanie kompleksu DraB – DraE. Można przypuszczać, że mutacja w białku DraC w miejscu Phe4 powoduje zmniejszenie powinowactwa domeny N-terminalnej do kompleksu białko opiekuńcze DraB - podjednostka strukturalna DraE, gdyż analogiczna reszta aminokwasowa Phe4 białka FimD odpowiada za kontakt hydrofobowy z białkiem opiekuńczym. Fakt wysokiej homologii tych białek i zakonserwowania tej reszty w obrębie całej rodziny białek FUP, pozwala wysnuć hipotezę, że reszta Phe4 pełni taką rolę również w przypadku białka DraC.

Próbowano uzyskać oczyszczony preparat białka DraC (oraz mutantów białka DraC hamujących biogenezę fimbrii) do badania oddziaływań z innymi białkami operonu *dra* w doświadczeniach *in vitro*. Jednak zbyt mała wydajność izolacji z błony zewnętrznej i oczyszczania spowodowała, iż uzyskiwano ilości niewystarczające do tych badań. Fakt niepowodzenia w uzyskaniu dużej ilości preparatu jest związany z trudnościami w pracy z białkami błonowymi. Liczba nowych sekwencji aminokwasowych białek błonowych znacznie wzrasta w ciągu ostatnich kilku lat. Niestety znacznie mniej informacji pojawia się na temat struktury tych białek oraz mechanizmu ich działania. Jest kilka powodów wyjaśniających ten brak informacji. Trudności związane z pracą z białkami błonowymi są spowodowane między innymi faktem ograniczonej pojemności błony. Organizmy są zazwyczaj bardzo wrażliwe na zmiany we właściwościach błony spowodowane insercją dużej ilości białek. Bardzo

## PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

---

duży problem stanowi również uzyskanie dużej ilości homogennego preparatu białkowego, potrzebnego do badań strukturalnych. Białka błonowe zazwyczaj występują na niskim poziomie w błonach biologicznych i rzadko zdarza się, że składnikiem błony jest pojedynczy rodzaj białka. Rozwiązaniem tego problemu jest nadekspresja. Jednak w przypadku ekspresji rekombinantowych białek błonowych, np. w *E. coli* lub innych systemach, występuje problem agregacji białek w cytoplazmie. Białka błonowe sprawiają problemy nie tylko podczas ekspresji, ale i podczas izolacji, gdyż wymagają ekstrakcji detergentami. Hydrofobowa natura białek błonowych sprawia, że nie są rozpuszczalne w roztworach wodnych. Detergenty zapewniają białkom błonowym dogodne hydrofobowe środowisko i utrzymują je w stabilnym stanie, zapobiegając ich agregacji podczas oczyszczania. Jednak ekstrakcja detergentami jest dosyć drastyczną metodą i może powodować zmiany konformacyjne białka. Ponadto obecność detergentów sprawia trudności w przygotowaniu próbek do badań strukturalnych. Białka znajdujące się poza membraną mogą agregować i precypitować. Precypitaty nie wiążą się wydajnie ze złożem niklowym, co znacznie utrudnia ich oczyszczanie. Doświadczenie osób borykających się z eksperymentalnymi problemami związanymi z białkami błonowymi, potwierdza, że produkcja tych białek jest znacznie trudniejsza niż białek rozpuszczalnych. Jednak pomimo tych problemów, białka błonowe, nadal pozostają bardzo ważne jako cele molekularne dla potencjalnych chemoterapeutyków.

Aby uzyskać większą ilość białka DraC, potrzebną do badań *in vitro* oddziaływań z innymi białkami uczestniczącymi w biogenezie fimbrii Dr, skonstruowano szczep, zawierający plazmid kodujący periplazmatyczną, rozpuszczalną w wodzie N-terminalną domenę białka DraC z fuzją oligohistydynową na C-końcu. Nie było problemów w uzyskaniu oczyszczonych preparatów tej domeny. Za pomocą badania tej domeny techniką IR stwierdzono prawidłową jego strukturę.

Niepowodzeniem zakończyła się też próba uzyskania oczyszczonego kompleksu białka opiekuńczego DraB i adhezyny DraE. Najprawdopodobniej wynika to z jego stosunkowo niskiej stabilności. Fakt ten pokrywa się z informacjami uzyskanymi od badaczy innych zespołów pracujących w tym temacie oraz współpracowników Katedry Mikrobiologii PG, którym nigdy nie udało się uzyskać takiego kompleksu stosując bardzo różne podejścia metodyczne. Należy tu nadmienić, że takie kompleksy udawało się otrzymywać dla pili typu P i 1 i ich

## PODSUMOWANIE I DYSKUSJA

---

otrzymywanie zostało bardzo dobrze opisane [Saulino i wsp., 1998, Barnhart i wsp., 2003]. We wszystkich publikacjach dotyczących badań strukturalnych dla DraE i AfaE, autorzy zawsze opierają się tylko na konstruktach dsc i przedstawiają struktury DraE-dsc, DraD-dsc, AfaE-dsc oraz DraD-DraE-dsc [Anderson i wsp., 2004, Cota i wsp., 2006], choć zdecydowanie bardziej pożądane dla szczegółowego poznania molekularnego mechanizmu biogenezy fimbrii Dr byłyby struktury tych białek w kompleksie z białkiem opiekuńczym DraB.

Z powodu niemożności uzyskania kompleksów białka opiekuńczego DraB i podjednostki adhezyjnej DraE do badań *in vitro* oddziaływania domeny N-terminalnej białka DraC z poszczególnymi białkami biorącymi udział w procesie biogenezy fimbrii Dr użyto otrzymane preparaty białek DraB, DraEdsc i DraDdsc. Przeprowadzone doświadczenia techniką mikrokalorymetrii izotermalnej wskazały na brak oddziaływań między tymi białkami. Fakt, że nie zaobserwowano oddziaływań domeny N-terminalnej białka DraC z białkiem DraDdsc potwierdza wyniki innych badań przeprowadzanych w Katedrze Mikrobiologii PG, że białko inwazyjne DraD nie jest białkiem inicjującym proces polimeryzacji fimbrii Dr. Natomiast brak pozostałych interakcji pokrywa się z danymi na temat białek homologicznych, gdyż żadnemu z zespołów badawczych zajmujących się badaniem białka FimD czy PapC nie udało się zaobserwować żadnych oddziaływań białka „usher” (lub jego domeny N-terminalnej) z samym białkiem opiekuńczym czy samą podjednostką strukturalną [Dodson i wsp., 1993; Nishiyama i wsp., 2003; Saulino i wsp., 1998]. Obserwowano wyłącznie oddziaływania białek kanałotwórczych z kompleksem białko opiekuńcze - podjednostka. Brak kompleksu DraB-DraE uniemożliwił przeprowadzenie właściwych doświadczeń badania oddziaływań z białkiem DraC i jego zmutowanymi formami.

Uzyskanie kompleksu białka PapD z cząsteczką pilicydu, który hamował biogenezę pili typu P, pozwoliło zaobserwować, że związek ten oddziałuje z białkiem opiekuńczym w miejscu jego oddziaływania z białkiem „usher”, co powoduje blokowanie interakcji pomiędzy białkiem opiekuńczym a domeną N-terminalną białka kanałotwórczego [Pinkner i wsp., 2006]. Pokazano, że pilicyd „naśladuje” oddziaływania jakie tworzą łańcuchy boczne reszt Phe4, Leu19 i Phe22 domeny N-terminalnej białka „usher”. Wyselekcjonowanie reszty Phe4 w białku DraC, jako tej, która ma wpływ na biogenezę fimbrii Dr pozwala przypuszczać, iż związek ten będzie blokował również oddziaływanie białka DraC z białkiem opiekuńczym DraB.

## 8. PIŚMIENNICTWO

1. Anderson K.L., Billington J., Pettigrew D., Cota E., Simpson P., Roversi P., Chen H.A., Urvil P., du Merle L., Barlow P.N., Medof M.E., Smith R.A., Nowicki B., Le Bouguéne C., Lea S.M., Matthews S. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. *Mol. Cell.* **2004**; 15: 647-657.
2. Barnhart M.M., Sauer F.G., Pinkner J.S., Hultgren S.J. Chaperone-subunit-usher interactions required for donor strand exchange during bacterial pilus assembly. *J Bacteriol.* **2003**; 185: 2723-2730.
3. Capitani G., Eidam O., Glockshuber R., Grütter M. G. Structural and functional insights into the assembly of type1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and Infection.* **2006**; 8: 2284-2290.
4. Carnoy Ch., Moseley S.L. Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins. *Mol. Microbiol.* **1997**; 23: 365-379.
5. Connell H., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S. and Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**; 93: 9827-9832.
6. Connolly A. & Thorp J.M. Urinary tract infections in pregnancy. *Urol. Clin. North. Am.* **1999**; 26: 779-787.
7. Cota E., Jones C., Simpson P., Altroff H., Anderson K., du Merle L., Guignot J., Servin A., Le Bouguenec C., Mardon H., Matthews S. The solution structure of the invasive tip complex from Afa/Dr fibrils. *Mol. Microbiol.* **2006**; 62: 356-66.
8. Daniels R, Normark S. Twin ushers guide pili across the bacterial outer membrane. *Cell.* **2008**; 16: 133: 574-576.
9. Dodson K.W., Jacob-Dubuisson F., Striker R.T., Hultgren SJ. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1993**; 90: 3670-3674.
10. Duława J., Zakażenia układu moczowego. Medycyna praktyczna, Kraków, **1998**.
11. Eidam O., Dworkowski F.S., Glockshuber R., Grütter M.G., Capitani G. Crystal structure of the ternary FimC-FimF(t)-FimD(N) complex indicates conserved pilus chaperone-subunit complex recognition by the usher FimD. *FEBS Lett.* **2008**; 582: 651-655.
12. Garcia M.I., Gounon P., Courcoux P., Labigne A., Le Bouguenec C. The afimbrial adhesive sheath encoded by the afa-3 gene cluster of

- pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Mol. Microbiol.* **1996**; 19: 683-693.
13. Garcia MI, Labigne A, Le Bouguenec C. Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking IS1 insertion sequences. *J Bacteriol.* **1994**;176: 7601-7613.
  14. Harlow E., Lane D. Antibody. Laboratory manual. AVI Publishing Company, St. Paul, Minesota, USA, **1988**.
  15. Hedenström M., Emtenäs H., Pemberton N., Aberg V., Hultgren S.J., Pinkner J.S., Tegman V., Almquist F., Sethson I., Kihlberg J. NMR studies 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.
  16. Henderson N.S., So S.S., Martin C., Kulkarni R., Thanassi D.G. Topology of the outer membrane usher PapC determined by site-directed fluorescence labeling. *J Biol Chem.* **2004**; 279: 53747-53754.
  17. Hung D.L., Knight S.D., Woods R.M., Pinkner J.S., Hultgren S.J. Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *EMBO J.* **1996**; 15: 3792-3805.
  18. Jacob-Dubuisson F., Striker R., Hultgren S.J. Chaperone-assisted self-assembly of pili independent of cellular energy. *J Biol Chem.* **1994**; 269: 12447-12455.
  19. Jędrzejczak R., Dauter Z., Dauter M., Piątek R., Zalewska B., Mróz M., Bury K., Nowicki B., Kur J. Structure of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli*: a dimer with swapped beta-tails. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**; 62: 157-164.
  20. Kłyszajko-Stefanowicz W. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **1999**.
  21. Krogfelt K.A. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* **1991**; 13: 721-735.
  22. Kur M., Piątek R., Kur J. A two plasmid *Escherichia coli* system for expression of Dr adhesins. *Protein Expr Purif.* **2007**; 55: 361-367.
  23. Laemmli U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970**; 227: 680-685.
  24. Li H., Qian L., Chen Z., Thibault D., Liu G., Liu T., Thanassi D.G. The Outer Membrane Usher Forms a Twin-pore Secretion Complex. *J. Mol. Biol.* **2004**; 344: 1397-1407.

25. Munera D., Hultgren S., Fernández L.A. Recognition of the N-terminal lectin domain of FimH adhesin by the usher FimD is required for type 1 pilus biogenesis. *Mol Microbiol.* **2007**; 64: 333-346.
26. Munera D., Palomino C., Fernández L.A. Specific residues in the N-terminal domain of FimH stimulate type 1 fimbriae assembly in *Escherichia coli* following the initial binding of the adhesin to FimD usher. *Mol Microbiol.* **2008**; 69: 911-925.
27. Ng T., Akman L., Osisami M., Thanassi D.G. The usher N Terminus is the Initial targeting site for Chaperone-Subunit Complexes and participates in subsequent pilus biogenesis events. *J Bacteriol* **2004**; 186: 5321-5331.
28. Nishiyama M., Vetsch M., Puorger C., Jelesarov I., Glockshuber R. Identification and Characterization of the Chaperone-Subunit Complex-binding Domain from the Type 1 Pilus Assembly Platform FimD. *J. Mol. Biol.* **2003**; 330: 513–525.
29. Nishiyama M., Horst R., Eidam O., Herrmann T., Ignatow O., Vetsch M., Bettendorff P., Jelesarov I., Grutter M. G., Wuthrich K., Glockshuber R., Capitani G. Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *EMBO J.* **2005**; 24: 2075-2086.
30. Nishiyama M., Ishikawa T., Rechsteiner H., Glockshuber R. Reconstitution of pilus assembly reveals a bacterial outer membrane catalyst. *Science.* **2008**; 320: 376-379.
31. Nowicki B., Selvarangan R., Nowicki S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J. Infect. Des.* **2001**; 183: 24-27.
32. Orłowski T. Choroby nerek. PZWL, 1998.
33. Piątek R., Zalewska B., Kolaj O., Ferens M., Nowicki B., Kur J. Molecular aspects of biogenesis of *Escherichia coli* Dr fimbriae: characterization of DraB-DraE complexes. *Infect. Immun.* **2005**; 73: 135-145.
34. Pinkner J.S., Remaut H., Buelens F., Miller E., Aberg V., Pemberton N., Hedenström M., Larsson A., Seed P., Waksman G., Hultgren S.J., Almqvist F. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**; 103: 17897–17902.
35. Remaut H., Chunyan T., Henderson N.S., Pinkner J.S., Wang T., Hultgren S.J., Thanassi D.G., Waksman G., Li H. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell.* **2008**; 133: 640-652.

36. Sambrook J., Manniatis T., Fritsch E.F. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Manniatis T and Sambrook Editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press Edit Second Edition. New York: **1989**.
37. Stanton S.L. and Dwyer P.L. *Urinary Tract Infection in the Female.*, MartinDunitz, London, 2000.
38. Sauer F.G., Futterer K., Pinkner J.S., Dodson K.W., Hultgren S.J., Waksman G. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science*. **1999**; 285: 1058-1061.
39. Saulino E.T., Thanassi D.G., Pinkner J.S., Hultgren S. Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis. *J. EMBO J.* **1998**; 17: 2177–2185.
40. Selzer G., Som T., Itoh T., Tomizawa J. The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. *Cell*. **1983**; 32: 119-129.
41. So S. and Thanassi D.G. Analysis of the requirements for pilus biogenesis at the outer membrane usher and the function of the usher C-terminus. *Mol. Microbiol.* **2006**; 60: 364-375.
42. Striker R., Nilson U., Stoneeipher A., Magnusson G. and Hultgren S.J. Structural requirements for the glycolipid receptor of human uropathogenic *Escherichia coli.*, *Mol. Microbiol.* **1995**; 16: 1021-1029.
43. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **1990**; 185: 60-89.
44. Schulz G., Beta – barrel membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology.* **2000**; 10: 443–447.
45. Thanassi D.G., Saulino E.T., Lombardo M.J., Roth R., Heuser J., Hultgren S.J. The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**; 95: 3146-3151.
46. Thanassi D.G., Stathopoulos C., Dodson K., Geiger D., Hultgren S.J. Bacterial outer membrane ushers contain distinct targeting and assembly domains for pilus biogenesis. *J Bacteriol.* **2002**; 184: 6260-6269.
47. Westerlund B., Kuusela P., Risteli J., Risteli L., Vartio T., Rauvala H., Virkola R., Korhonen T. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collage-binding protein. *Mol. Microbiol.* **1989**; 3: 329-337.
48. Yu X., Visweswaran G.R., Duck Z., Marupakula S., MacIntyre S., Knight S.D., Zavialov A.V. Caf1A usher possesses a Caf1 subunit-like domain that is crucial for Caf1 fibre secretion. *Biochem J.* **2009**; 418: 541-551.



49. Zalewska B., Piątek R., Konopa G., Nowicki B., Nowicki S., Kur J. Chimeric Dr fimbriae with a *Herpes simplex* virus type 1 epitope as a model for a recombinant vaccine. *Infect. Immun.* **2003**; 71: 5505-5513.
50. Zalewska-Piątek B., Bury K., Piątek R., Bruździak P., Kur J. Type II secretory pathway for surface secretion of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strain. *J. Bacteriol.* **2008**; 190: 5044-5056.
51. Zavialov A.V., Berglund J., Pudney A.F., Fooks L.J., Ibrahim T.M., MacIntyre S., Knight S.D. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell.* **2003**; 113: 587-596.

## 9. OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ang.	z angielskiego
ATP	adenozynotrifosforan

# PIŚMIENNICTWO

---

<b>Da</b>	Dalton
<b>DAB</b>	3,3' diaminobenzzydina
<b>DAF</b>	<i>ang.</i> <u>D</u> ecay- <u>A</u> ccelerating <u>E</u> actor
<b>DNA</b>	kwask deoksyrybonukleinowy
<b>EDTA</b>	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
<b>FITC</b>	izotiocyanian fluoresceiny ( <i>ang.</i> <u>F</u> luorescein <u>I</u> so <u>T</u> hio <u>C</u> yanate, Isomer I)
<b>FUP</b>	<i>ang.</i> <u>F</u> imbrial <u>U</u> sher <u>P</u> roteins
<b>Ig</b>	immunoglobulina
<b>IPTG</b>	izopropylo- $\beta$ -D-tiogalaktozyd
<b>M</b>	stężenie molowe [mol/dm <sup>3</sup> ]
<b>MCS</b>	miejsce wielokrotnego klonowania ( <i>ang.</i> <u>M</u> ultiply <u>C</u> loning <u>S</u> ite)
<b>PBS</b>	<i>ang.</i> <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
<b>PCR</b>	łańcuchowa reakcja polimerazy ( <i>ang.</i> <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
<b>pz</b>	par zasad
<b>SDS</b>	sól sodowa siarczanu dodecyłu
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z użyciem SDS ( <i>ang.</i> SDS- <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
<b>RNA</b>	kwask rybonukleinowy
<b>Tris</b>	tris[hydroksymetylo]aminometan
<b>UPEC</b>	uropatogenne szczepy <i>Escherichia coli</i> ( <i>ang.</i> <u>U</u> ro <u>P</u> athogenic <u>E</u> sch <u>E</u> richia <u>C</u> oli)
<b>UTI</b>	zakażenia dróg moczowych ( <i>ang.</i> <u>U</u> rinary <u>T</u> ract <u>I</u> nfections)

## 10. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje:

- 1) Jedrzejczak R., Dauter Z., Dauter M., Piątek R., Zalewska B., **Mróz M.**, Bury K., Nowicki B., Kur J. Structure of DraD invasin from uropathogenic *Escherichia coli*: a dimer with swapped beta-tails. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**; 62: 157-164.
- 2) **Kur M.**, Piątek R., Kur J. A two plasmid *Escherichia coli* system for expression of Dr adhesins. *Protein Expr Purif.* **2007**; 55: 361-367.

### Doniesienia zjazdowe

- 1) **Mróz M.**, Piątek R., Zalewska B., Bury K., Holec L., Gašior A., Kur J. Fimbriae biogenesis – study of interaction between DraE adhesin, DraD invasin and usher DraC. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 20. ISBN 83-922424-1-6.
- 2) Bury K., Zalewska B., Piątek R., **Mróz M.**, Holec L., Gašior A., Kur J. Construction and analysis of DraE-AfaE-III hybrids – identification of amino acids responsible for different morphological structures. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 33. ISBN 83-922424-1-6.
- 3) Zalewska B., Piątek R., Bury K., **Mróz M.**, Holec L., Gašior A., Kur J. Display of Pk epitope of Simian Virus 5 by chimeric Dr fimbriae – construction of a potential vaccine. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 26. SBN 83-922424-1-6.
- 4) Zalewska B., Piątek R., Bury K., **Mróz M.**, Kur J. Molekularne aspekty zjadliwości uropatogennych szczepów *Escherichia coli* DR+. (I Konferencja Naukowa Komitetu Mikrobiologii PAN pt. W.J.H. Kunicki-Goldfinger mikrobiolog – filozof – mistrz, 22 X 2005). 2005: 80.
- 5) Piątek R., Zalewska B., Bury K., **Mróz M.**, Holec L., Gašior A., Kur J. Analysis of interaction between DraD invasin and DraE adhesin encoded by a *dra* gene cluster of uropathogenic *E. coli* Dr<sup>+</sup> strain. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 21. ISBN 83-922424-1-6.
- 6) Gašior A., Holec L., Piątek R., Zalewska B., Bury K., **Mróz M.**, Kur J. Chimeric Dr fimbriae with a GRA1 *Toxoplasma gondii* epitope – construction of a potential vaccine. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk 14-15 X 2005). 2005: 13. ISBN 83-922424-1-6.

## PIŚMIENNICTWO

---

- 7) Holec L, Gąsior A, Zalewska B, Piątek R, Bury K, **Mróz M**, Kur J. Construction of expression systems and production of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (MIC3, GRA4, GRA9) for the serodiagnosis of toxoplasmosis. (II Ogólnopolska Konferencja pt. Biotechnologia Molekularna; Gdańsk, 14-15 X 2005). 2005: 40. ISBN 83-922424-1-6.

### Wnioski grantowe

Opisywane badania były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu grantowego promotorskiego pt. „Identyfikacja reszt aminokwasowych kanałotwórczego białka DraC oddziałujących z kompleksem białko opiekuńcze DraB/adhezyna DraE – wyznaczenie celu molekularnego dla potencjalnych leków przeciw uropatogennym szczepom *Escherichia coli* Dr<sup>+</sup> ” (nr GW 017209).

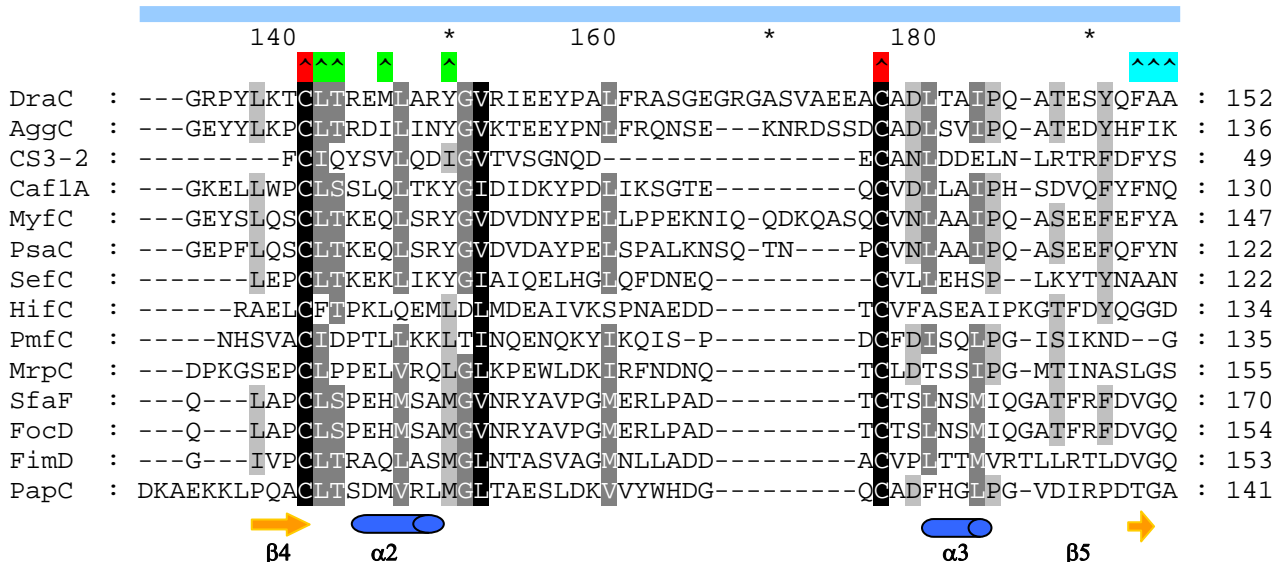
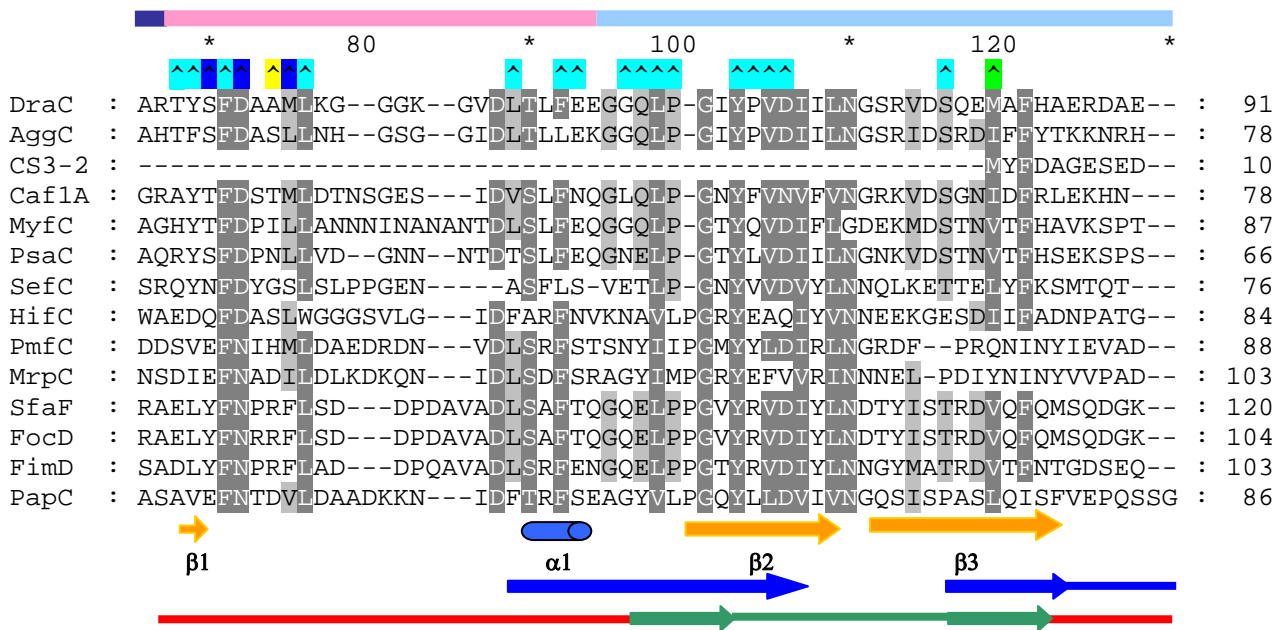
### Załącznik nr 1. Analiza sekwencyjna białek rodziny FUP.

```

          *           20           *           40           *           60
DraC : -----MRDTSSGRMRTGVTGLALAVMVACVMFRAES-----GI : 33
AggC : -----MKTSS-----FIIVILLCFRIEN-----VI : 20
```

# PIŚMIENNICTWO

CS3-2 : ----- : -  
 Caf1A : -----MRYSK-----LFLCAGLTLATLP-----CW : 20  
 MyfC : -----MFFSLKN-----SVAKLIAFWAICLVLP-----VW : 25  
 PsaC : -----MSTSFL-----VG : 8  
 SefC : -----MKKTT-----ITLFLVLTSVFHSNG-----VF : 21  
 HifC : -----MKTKN-----FPLNKIAFACTLLLANP-----VA : 24  
 PmfC : -----MLIPYSPHTI-----WKTICATLLLSLAFFSQAE-----Q : 30  
 MrpC : -----MVRSFKTVCLEKREKRK-----HAIRPVAILIYLIVTGASSLSNSALA : 44  
 SfaF : MCLAADFIFSLSVGADMFSGDGGQLLSDKSLTGSAGGGNRMKFNLPLAFFIGIIVS-----PA : 60  
 FocD : -----MFFGDGGQLLSDKSLTGSAGGGNRMKFNLPLAFFIGIIVS-----PA : 44  
 FimD : -----MSYLNLRLYQRNTQCLHIRKHRLAGFFVRLVVACAFAAQAP-----LS : 43  
 PapC : -----MKDRIP-----FAVNNITCVILLSLFCN-----A : 24

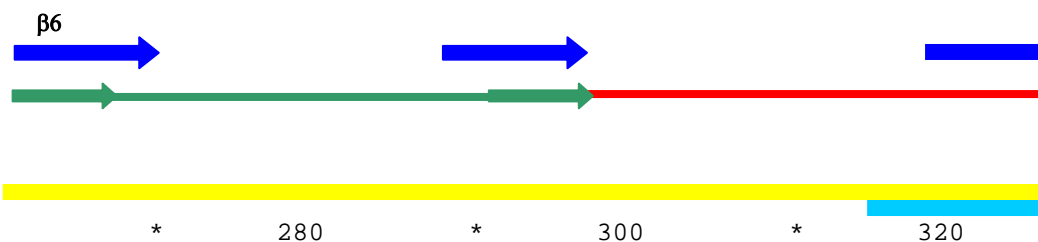


200 220 240 260

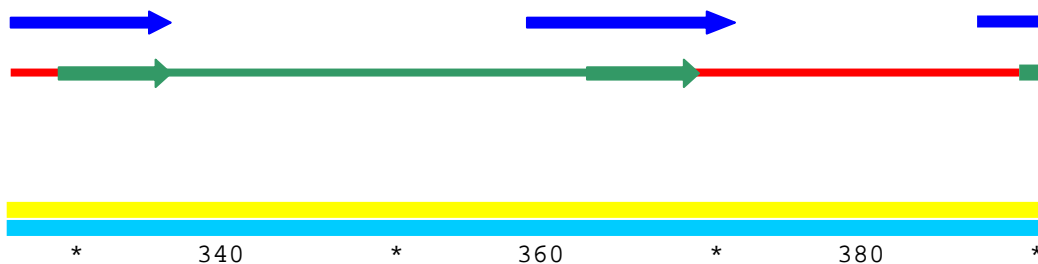
DraC : QQLVLGLIPQVAP-SAAEGDWPEALWDDGIPAFLLNWQANAGRSEYRGYKRVTDSYWVSLQPGIN : 216  
 AggC : QQLILGLIPQVAIRPPLTGIAHETMWDGISAFLLNWQVEGSHWEYRSNTRNSSDNFASLEPGIN : 201  
 CS3-2 : KRMDLIFVSPKFVPRKKNGLAPIKLWDEGENALFTSYNFSEDYHFKGDAR-DSYSQYANIQPRLN : 113

# ZAŁĄCZNIKI

Caf1A : QKLSLIVPQVALPRFDGIMPMQLWDDGIPALFMNYNTNMQTRKFREGGKSLD-SYYAQLQPGLN : 194  
 MyfC : MRLVLNLPQVALRP--KDEIPVERWDDGITAFLLNYMANSSTTTYRQTGEQQS-SHYVQLYPGFN : 209  
 PsaC : MQLVLSLPQAAALRP--EGEVPIERWDDGITAFLLNYMANISETQFRQNGGYRR-SQYIQLYPGLN : 184  
 SefC : QSLLLNAPSKILSPIDSEIADENIWDDGINAFLLNYRANYLHRSKVGGED-----SYFGQIQPGFN : 182  
 HifC : MKLKLLELPQALTIRRPRGYIAPSRWQTGTNAASANYDINYRSGNPEVK---SKSLYVGLRGGVN : 196  
 PmfC : GVLDTITLERSIMKYEESDWTPELWDSGVSGLIFDYTLTGTSTRPNKGNN--NNTLTGYGQAGLN : 198  
 MrpC : GNLLLTIPQAYLEYSAPNWDPPSRWDDGISGILFDYNNVANVTDPKKGKQ--RQVVTGLGTLGAN : 218  
 SfaF : QRLYLITVPQLYMSNQARGYIAPFYWDNGITAAALNLYDFSGNRVRDSYGGT--SDYAYLNLKTGLN : 233  
 FocD : QRLYLITVPQLYMSNQARGYIAPFYWDNGITAAALNLYDFSGNRVRDITYGGT--SDYAYLNLKTGLN : 217  
 FimD : QRLNLTIPQAFMSNRARGYIPPELWDPGINAGLLNLYDFSGNSVQNRIGGN--SHYAYLNLQSGLN : 216  
 PapC : GVLRLINMPQAWLEYSDATWLPSPRWDDGIPGLMLDYNLNGTVSRNYQGGD--SHQFSYNGTVCGN : 204



DraC : IGPWRVRNLTWNRSSGQ--SGK-----WESSYIRAERGLNGIKSRLTLGEDYTPSDIFDSVP : 272  
 AggC : IGSWRIRNLTWTKSSGQ--SGK-----WESSYIRVERGLNNIKSRITFCDDYTPSDIFDSVP : 257  
 CS3-2 : IGPWRIRRTQAIWKNKNNNT-----KGEWSNNYLAERGLGNIKSRLYIGDGYFPLKNFNSFK : 169  
 Caf1A : IGAWRFRSSTSWWKQQG-----WORSYIYAERGLNTIKSRLTLGETYSDSSIFDSIP : 246  
 MyfC : IGAWRIRNATSWNQSNGS--AGK-----WQSSYIYATRGLYRLKSRVTLGQSYTPGDFDSVP : 265  
 PsaC : IGAWRVRNATSWSQSGDR--AGK-----WQSAYTYATRGTYRLKSRVTLGESYTPGDFDSIP : 240  
 SefC : FCPWRIRNLSWQNLSSSE--K-K-----FESAYIYAERGLKKIKSKLTVGDKYTSADLFDSVP : 237  
 HifC : ICNWALRHNGSESRFENHSSSGFTDKGKNHYERGDYLRQDFALLRGNVTVGDFDFSTARIGESFG : 261  
 PmfC : IGEWRLRAEYQGNYS----SEYSS--NRFWDNQIYAYKPLPDLAAKLTVGETYLNLSQIFDSFR : 256  
 MrpC : IGAWRFRADWQASYQHTTGIPQSTE--N-SWKWNQYLYRAIPQWEARFVMGETYSRSDIFDSFR : 280  
 SfaF : IGSWRLRDNTSWSYSAGK--GYS----QNNWQHINTWLERDIVPLRSRLTMGDSYTRGDI FDGVN : 292  
 FocD : IGSWRLRDNTSWSYSAGK--GYS----QNNWQHINTWLERDIVSPLRSRLTMGDSYTRGDI FDGVN : 276  
 FimD : IGAWRLRDNTTWSYNSSD--RSSGS--KNKWQHINTWLERDIIPLRSRLTLGDGYTQGDIFDGIN : 277  
 PapC : IGPWRLRADYQGSQEQRVNGEKT--NRNFTWSRFYLFRAIPRWRANLTLGENNINSDFRSWS : 267

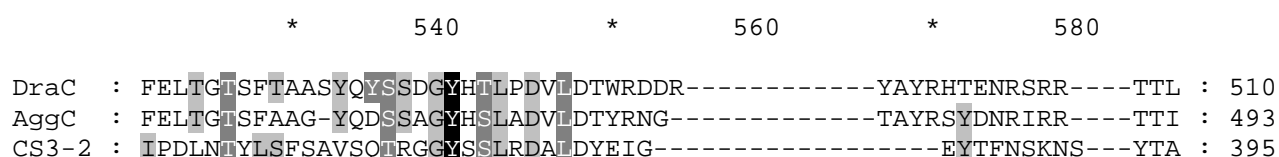
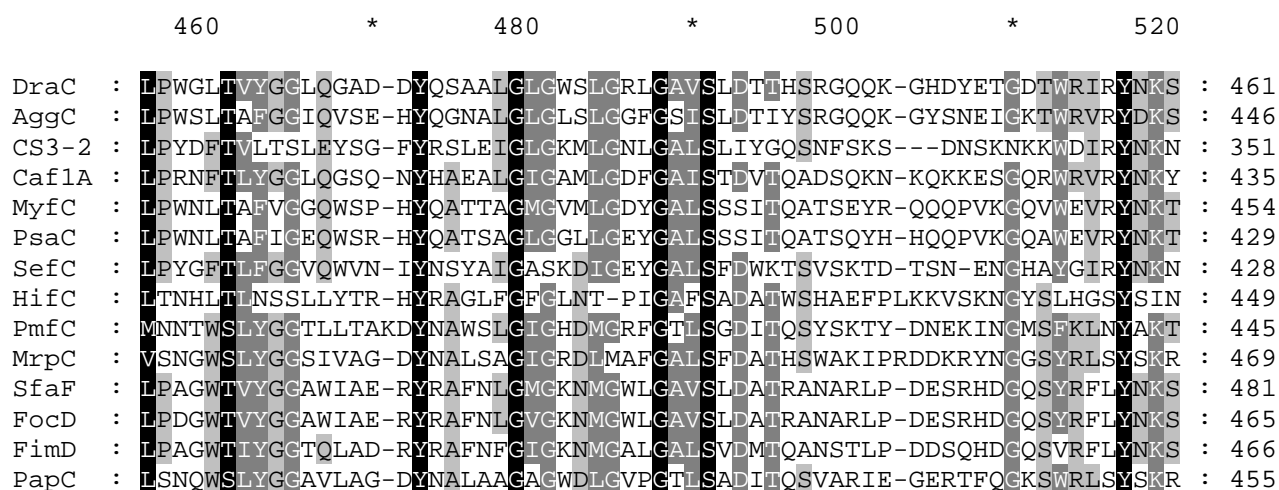
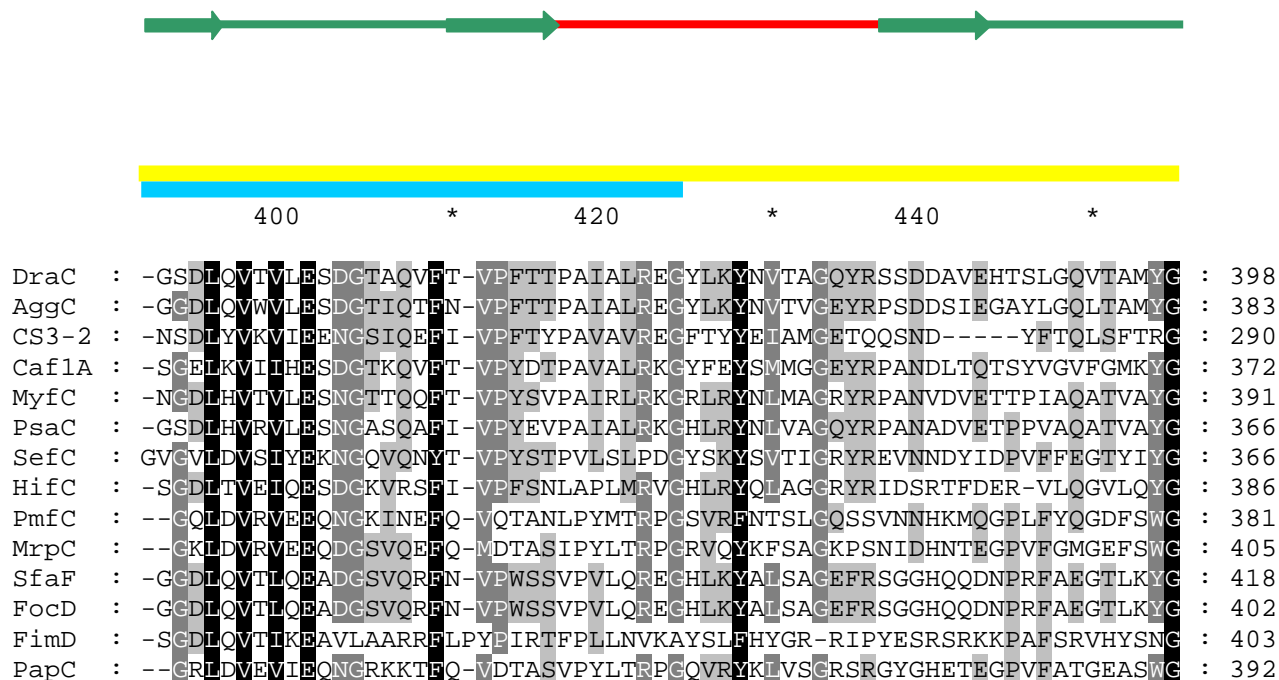


DraC : FRGAMSSDESMPVYNLREFAPVVRGIARTQARIEVRQNGYLIQSQTIVAPGAFALTDLPVTGS-- : 335  
 AggC : FRGMLGSDENMVPYNQREFAPVVRGIARTQARIEVRQNGYLIQSRIVSPGAFALTDLPVTGN-- : 320  
 CS3-2 : FKGGVLKTDENMYPYSEKTYSPITVKGSAKTQAKVEFFQDGVKIYSSIVPPGDFSSISDYILSGS-- : 232  
 Caf1A : IKGIKIASDESMPVYQWNEFAPVVRGIARTQARVEVLRDGYTVSNELVPSGPFELANLPLGGG-- : 309  
 MyfC : FRCVMLGDDDMLEPSSQDFIPVVRGIARSQAQVEVRQNGYLLYSTVSPGPFELTDILPSHS-- : 328  
 PsaC : FRCVMLGDDPNMQPSNORDFIPVVRGIARSQAQVEVRQNGYLLYSTVSPGPFELSDVIPSKS-- : 303  
 SefC : FRGFSLNKDESMLPFSQRTYYPITIRGIAKINAVEVRQNGYLLYSTVSPGQFETIGREQIADLGV : 302  
 HifC : LRCLRITASDDRMAPSQRGFAPVVRGVANINAKVSIKQNGYTIYQITVPAGPFVINDLYASGY-- : 324  
 PmfC : FTCANLQSDERMLPESLQGYAPETHGIANINAKVITVTQNGRLIYETTVPAGPFVINHLQNTVQ-- : 319

MrpC : FTCVHLATDDNMLEPNLRCYAPFVITGVAKINAKVITISQQRVVIYETQVAPGPFRIQDINDAVS-- : 343  
 SfaF : FRGIQLASDDNMPDSQRGYAPTIIHGISRGTSRISIRQNGYEIYQSTLPPGPFETINDIYPAGS-- : 355  
 FocD : FRGIQLASDDNMPDSQRGYAPTIIHGISRGTSRISIRQNGYEIYQSTLPPGPFETINDIYPAGS-- : 339  
 FimD : FRGAQLASDDNMLEPDSQRGFAPVIHGIAARGTAQVITKQNGYDIYNSTVPPGPFETINDIYAAGN-- : 340  
 PapC : YTCASLESDDRMLEPRLRCYAPQITGIAEINARVVVSQQRVLYDSMVPAGPFESIQLDSSVR-- : 330



# ZAŁĄCZNIKI



# ZAŁĄCZNIKI

Caf1A : LQS-GTSLNIASEEYATEGFNKLADTNTYCKPN-----T-----RNDCRFDYAKPKNK--VQF : 486  
 MyfC : LQASDTSFVSVNSQYSTADFNLSVDLQSYRR-----HD-----YSRRDWHNSNLRNQ--THV : 505  
 PsaC : LQASDTSFVSVNSQYSTNGFSLSDVLSQYRQSGSGDNRD-----KIDENSRSDLRNQ--ISA : 486  
 SefC : IAQTNTLTVSLASHYYSKKNYRIFSEALHSSEHD-----EFYDKNKKST--TSM : 474  
 HifC : FNEIGTNTLTAAYRYSSRDFYTLSDTGLNRTFK-----QFSGAYLPEIYRPKNQFQV : 502  
 PmfC : FDEYHSTITFAGYRFSEKTFERSFSQYLDERYNG-----INNNGYEKEMYTITGNKT : 496  
 MrpC : FEAINSQVTFAGYRFSEKTFERMMDQYLERRYR-----DGNADNNKELYTIMFSKQ : 519  
 SfaF : LTETGNIQLIGYRYSTRGYFADFATAWKKMSGYSVLTQDGVIIQPKYTDYYNLAYNKRGRVQV : 546  
 FocD : LTETGNIQLIGYRYSTRGYFADFATAWKKMSGYSVLTQDGVIIQPKYTDYYNLAYNKR-EGAG : 529  
 FimD : LNESGNIQLVGYRYSTRGYFADFATWYKMSGYNIETQDGVIIQPKYTDYYNLAYNKRGLQL : 531  
 PapC : FDNADADITFAGYRFSEKTFERNYMLMEQYLNARYR-----NDYSSREKEMYTVTLNKN : 505



\*            600                    \*            620                    \*            640                    \*

DraC : SLSQSLGQWGYVGLNGSRDEYR-DRPHRDYFGASYSTSWNN-ISLSVNWSRNRNSGGYYGGWSRT : 573  
 AggC : NISQALGEWGSVALNGGRDEYR-DKVKQDYIGASYSNSWKG-ITFVNWNRNNNIGDYYSNLR : 556  
 CS3-2 : SINHSLGELGSLNFSGTWRNYWENKNQTRSYNLSYSTQIFNGKAYLSGSLIRSELMNFN---NKI : 457  
 Caf1A : NLSQSIPGSGTLNFSGYRKNYWRDSRSTTSFVGYNHFFRNGMSLTLNLSKTQNINKYG---EKT : 548  
 MyfC : VVGQPLGQFYLNLNWSRQNYR-DAPASSWGVQYSFNIGN-LYCSLDWTQONQYRG-----NQ : 561  
 PsaC : VVGQSLGKFGYLNLNWSRQVYRGPPIPAKNSLGIHYNLNVGN-SFWALSWVQANEN-----KN : 543  
 SefC : LLSQALGSLGSVNLNYSYNDKYW-KHEGKKSIIASYGKNLNG-VSLSLSYTKSTSKIS-----EEN : 532  
 HifC : SLSQSLGNWGNLYLGGQTYNWEKRGNTQYQLAYANRFHI-LNYSINLSQSIDKET-----GK : 560  
 PmfC : FWADDAEKSTTLNYSYRHQNYW-DKNTQEYQYVTVSRNFSIMGIEQINTNLSAFRTQ----YKGN : 556  
 MrpC : F----PDWGLSTYLNYSHQTYW-NKPTNDNYNLSLAKSADIGRFKNINFSLSAFRNK----FNGT : 575  
 SfaF : SLSQQTGESSTLYLGGSHQSYWGTDRDTRQLNAGFNSSVND-ISWSLNYSLSRNAWQ----HET : 605  
 FocD : EYQPADGESSTLYLGGSHQSYWGTDRDTRQLNAGFNSSVND-ISWSLNYSLSRNAWQ----HET : 588  
 FimD : TVTQQLGRTSTLYLGGSHQTYWGTNSVDEQFQAGLNTAFED-INWTLNYSYSLTKNAWQ----KGR : 590  
 PapC : V----ADWNTSFNLQYSRQTYW-DIRKTDYITVSVNRYFNVFGLQGVAVGLSASRSK----YLGR : 561



660                    \*            680                    \*            700                    \*

DraC : EDSVS-MWMSVPLGRWFGG----ADNDISTTAQMQRSTGQDTRYEAGLNCRAFD-RRLYWDVREQ : 632  
 AggC : ENNLN-LWMSIPMKRWLGG----DDKGVTTATAQIQRITGQNTLYETGLNCRAGF-QKLYWDIREQ : 615  
 CS3-2 : SDTILNIGVNIPLFG-----LSRGIQSVSYNTSSVKGGRSTHQLGISGSEFDN-KLYWHVNQG : 513  
 Caf1A : SELLSNIWLSFPLSRWLG-----NNSINSNYQMTSDSHGNTTHEVGVYGEAFD-RQLYWDVRER : 606  
 MyfC : DRLLS-LSVSMPLG-----RERDTYAAVYRMTSSDNSKD-HEMSLYCHAFD-NRLSWNVRQT : 614  
 PsaC : DRILS-LSVSIPLG-----GHHDYASVYRMTSSNGSND-HEIGMYGQAFD-SRLSWSVRQA : 596  
 SefC : EDLFS-FLSVPLQKLT-----NHMYATYQNSSSSKHDMNHDLGITGVAFN-SQLTWQARGQ : 588  
 HifC : RDNSIYLSLSPLG-----DNHSADSSYSRSGNDINQRLGVNGSFGERHQWSYGINAS : 613  
 PmfC : TDDTLNLSLPLGS-----GRNIGYLNQDNNQKVT--QMASYADNRDY--NNLWRIRAG : 607  
 MrpC : NDNGVYMNVSMPWGD-----RATISYNTVINKSGNS--HNVSYYDRIDD-NSSYRVGAG : 626

SfaF : DRILS-FDVSIPFSHWMRSDSTSARWNASARVYQTLAEGQAASTAGLYGTS LGDNNLGYSIQSG : 669  
 FocD : DRILS-FDVSIPFSHWMRSDSTSARWNASARVYQTLAEGQAASTAGLYGTS LLGDNNLGYSIQSG : 652  
 FimD : DQMLA-LNVNIPFHWLRSDSKQWRHASASVSMSHDLNGRMTNLAGVYGTLLLEDNNLSYSVQTG : 654  
 PapC : DNDSAYLRISVPLG-----TGTASVSGSMSNDRYV--NMAGYTDTFNDGLDSYSLNAG : 612





# ZAŁĄCZNIKI

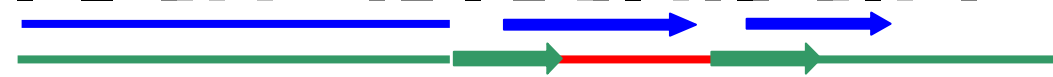
720 \* 740 \* 760 \* 780

DraC : MVPGS-ESHADTSRLNLTWYGTYGELTGMYSYS-STMRLNAGMSGSMVAHSEG--VTFGQRTGD : 693  
 AggC : IVPGS-KYDADTSLNLRWSSGGYGELTGMYSYN-RNTRQMNVTSGSMIAHSGG--IAFGQKTDD : 676  
 CS3-2 : YSDN-----YSNTSMYGYKAKVAQVNAGYSVS-ERYNHAYGGIEGGILVYDGG--IILGRNLGD : 570  
 Caf1A : FNEKG--RKYTSNALNLYRGTYGELISGNYSD-QTQSQLGIGVINGNMVITQYG--ITAGQKTGD : 666  
 MyfC : ERYAQFHSGENSGSLGLDWQGSYGDIGNYYT-PTIRQFSANVSGGAVIHRHG--LTLGPQING : 676  
 PsaC : EHYGQPNSGHNSGSLRLGWQGSYGNIAGNYYT-PSIRQLSADVSGGAIHRHG--LTLGPQING : 658  
 SefC : IEDKS--KNQKATFLNASWRGTYGELIGANYSHN-EINRDIGMNVSGGVIAHSSG--ITFGQSISD : 648  
 HifC : RNNQG---YRSYDANLAHNNSIGSYRASYSRDSLKNRSTSLGASGAVVAHKYG--ITLSQPVGGE : 672  
 PmfC : LSSDK---KANTDGYQHRSQVAEINANASYQQDNYLAVGATIKGGFTATRYGAALHSSSMTSS : 668  
 MrpC : VSSNG---KPSADAYFMHYADAALVTASASHINGEYTSATLSLQGGATLTPKGGALHRVSRGTGS : 687  
 SfaF : YTRGGYEGSSKTGYASLNYRGGYGNASAGYSHS-GGYRQLYYGLSGGILAHANG--LTLSQPLGD : 731  
 FocD : YTRGGYEGSSKTGYASLNYRGGYGNASAGYSHS-GGYRQLYYGLSGGILAHANG--LTLSQPLGD : 714  
 FimD : YAGEAMEIAEVQATP-LNYRGGYGNANIGYSHS-DDIKQLYYGVSGGVLAHANG--VTLGQPLND : 715  
 PapC : LNSGGGLTSQRQINAYYSHRSPLANLSANIASLQKGYTSFGVSASCGATITGKCAALHAGGMSGG : 677



\* 800 \* 820 \* 840

DraC : T-VALIAAPCVSGASVGG-WPGVRTDFRGYTLAGYASPYQENVLTLDPTTFPEDAEVPQTDSRVV : 756  
 AggC : T-MALIAAPCIAGASVGG-WPGVSTDFRGYTLVGHVSPYQENIITLDPTTFPDNTEVSQTDRRVI : 739  
 CS3-2 : T-MSIIEAPCAENTKIRG-WGSEETDWRGRAFIGYLSPYQNNDISLDPSSLPLDSSLDITNSVI : 633  
 Caf1A : T-IALVQAPDISGASVGY-WPGMKTDFRGYTNYGYLTPYREYKVEINPVTLPNDAEITNNIVSVI : 729  
 MyfC : T-AALVEVPVSGVSTSE-DHRLKTDFRGYSIVPNIFPYEEHDILLETDDLPPDAEVTKTDAKVL : 739  
 PsaC : T-SVLVEVPVGGVITTE-DRRLKTDFRGYSIVSGLSPYQEHDIIVLETADLPPDAEVAKTDTKVL : 721  
 SefC : T-AALVEAKCVSGAKVLG-LPGVRTDFRGYTISSYLTPYMNFISIDPTTLPINTDIRQTDIQVV : 711  
 HifC : S-FALIHAKDAAGAKVES-GANVSLDYFGNAVVPYTSPEINYIIGINPSDAEANVEFEATERQII : 735  
 PmfC : TARIMVDTDCVAGVPFN--GQSTTINRFGIGVLTDLTSYNNVDARIDVDMQDQDIETRKAIASTT : 731  
 MrpC : T-RLIIDTDCIANIPVKNFGAISHNMFCKAVLPDINDYRSSASIDLNRLPENVEALRSIQQLT : 751  
 SfaF : T-LILVRAPCASDRIEN-QTGVS TDWRGYAVLPYATDYRENVALDTNTLADNVDIENTVVSVV : 794  
 FocD : T-LILVRAPCASDRIEN-QTGVS TDWRGYAVLPYATDYRENVALDTNTLADNVDIENTVVSVV : 777  
 FimD : T-VVLVKRLAQKMQKSKT-RRGAYR-LAGYAVLPYATEYRENVALDTNTLADNVDLNAVANV : 777  
 PapC : T-RLIVDTDCVGGVPVD--GGQVVTNRWGTGVVTDISSYRNTISVDLKRLPDDVEATRVSVES : 739



\* 860 \* 880 \* 900 \*

DraC : PTKGAVVRAGFRTRVGGRALVSLARQDGPLPFGAVVTVVEGEAGQAAGSAGVVGDRGEVYLSGLK : 821  
 AggC : PTKGALVQAEFKTRVCNRAVLTLTRKDGTLVPGFTVTLERKTGEAFESAGVVDDKCKVYLSGLS : 804  
 CS3-2 : PTIGAVKTTYNVKKCKKVMLLTKKSNGDVPPFGAIVTVMDG----QNTSIVGDNGQLYLGSSM : 694  
 Caf1A : PTKGAVVLAKENARICGRFLHLKRSNDKVPFGSIVTIEGQS----SSSGIVGDNSGVYLTGLP : 790  
 MyfC : PTEGAVVRASESPQICARALMTITRNNGETIPFGAMASLVNQP----ANAAIVDEGGKAYLTGLP : 800  
 PsaC : PTEGAVVRASESPQICAKALMTITRANGQTIPTFGAMASLVNQS----ANAAIVDEGGKAYLTGLP : 782  
 SefC : PTEGAVKAVYKTSVCTNALIRITRNGKPLALGTVLSLKNNNG-VIQSTSIVGEDGQAYVSGLS : 775  
 HifC : PRANSISLVDERTGKNTMVLFNLTLPNGEVPMASTAQDSEGA----FVGDVQGGVLFANKLT : 795  
 PmfC : LTEGALIGYYQEPVROGERLMAVLTQTDNKYPPFGAEVVTNQKGE----SIGMVMEELVYIAGVN : 791

# ZAŁĄCZNIKI

```

MrpC : LTEGALGYRRFDVIEGQKAMAVIRLKDGTFFPPFGASVTTEKGR-----ELGIINDGGENVYLTGIN : 811
SfaF : PTHGAVVRADYKTRVGVKVLMTLMR-NGKAVPFGSVVTARNGG-----SS-IAGENCQVYLSGMP : 852
FocD : PTHGAVVRADYKTRVGVKVLMTLMR-NGKAVPFGSVVTARNGG-----SS-IAGENCQVYLSGMP : 835
FimD : PTRGAVVRAEFKARVGIKLLMTLTH-NNKLPFGAMVTSESSQ-----SSGIVADNGQVYLSGMP : 836
PapC : LTEGALGYRKFVSVLKCKRRLFAILRLADGSQLPFGASVTSEKGR-----ELGMVADEGLAWLSGVT : 799

```



```

          920          *          940          *          960          *
DraC : E-SGKILKAQWCENS--LCHADYRIP-EKGPAGIFLTRTVCM----- : 859
AggC : E-AGKILKAQWCENS--QCYADYKIP-LKKGMSGIFLTRAVCM----- : 842
CS3-2 : D-TGRIKVIWNGEDKKCVVDYIVG-DNKNIAGIYIGSAEHVFSMMLLYGKKISFLSASVWXVIG : 757
Caf1A : K-KSKILVWVGRDKNQSCSSNVVLP-EKTDISGAYRLSTTCILNN----- : 833
MyfC : E-TGQILLVQWCRGASQQCRVDYQLANAKKGDAGIYMLSGVCH----- : 841
PsaC : E-TGQILLVQWCKDAGQQCRVDYQLSPAEEKGDTGIYMLSGVCH----- : 823
SefC : G-VQKLIASWENKPSDTCTVFYSIP--DKNKGQISFLNGVCK----- : 814
HifC : QPKGELIVWVGERESEQCRFHYQVLDNAQIQNHDIQCKTAE----- : 837
PmfC : L-NESLNVIVWNGKT--QCSITIPAEITDPLK-HQSLVCQDR----- : 828
MrpC : T-GDVLSVVRWSGKE--QCKVLIPTLVENVQISSILLTCSDDGTATSTFNQREVSLPKTKFLSR-- : 871
SfaF : L-SGQVSVKWCQSQTDDQCTADYKIP-KESAGQIISHVTVSCR----- : 892
FocD : L-SGQVSVKWCQSQTDDQCTADYKIP-KESAGQIISHVTVSCR----- : 875
FimD : L-AGKVQVWVGEENAHCVANYQLP-PESQQQLITQLSAEQR----- : 876
PapC : P-GETLSVNVWDGKI--QCQVNVPEITAISDQQ--ILLPCTPQK----- : 836

```



```

          980          *          1000          *          1020          *          1040
DraC : ----- : -
AggC : ----- : -
CS3-2 : VVKAFLTTLQSNNEWTRHSEKNDFSIDFDVGVGRSFAAVGPTKDMSLGANLTSEPTLAIDFTPIE : 822
Caf1A : ----- : -
MyfC : ----- : -
PsaC : ----- : -
SefC : ----- : -
HifC : ----- : -
PmfC : ----- : -
MrpC : ----- : -
SfaF : ----- : -
FocD : ----- : -
FimD : ----- : -
PapC : ----- : -

```

```

          *          1060          *          1080          *          1100
DraC : ----- : -
AggC : ----- : -
CS3-2 : NIYVGANYGKDIGTLVFTTNDLTDITLMSSRSVVDGRQTGF'FTFMDSSATYKISTKLGSSNDVNI : 887
Caf1A : ----- : -
MyfC : ----- : -
PsaC : ----- : -
SefC : ----- : -
HifC : ----- : -
PmfC : ----- : -

```

## ZAŁĄCZNIKI

MrpC : ----- : -  
 SfaF : ----- : -  
 FocD : ----- : -  
 FimD : ----- : -  
 PapC : ----- : -

\*            1120            \*            1140            \*

DraC : ----- : -  
 AggC : ----- : -  
 CS3-2 : QEITQGAKITPVSGEKTLPKKF<sup>A</sup>TLKLHAHRSSSTVPDTYTVGLNVTSNVI : 937  
 Caf1A : ----- : -  
 MyfC : ----- : -  
 PsaC : ----- : -  
 SefC : ----- : -  
 HifC : ----- : -  
 PmfC : ----- : -  
 MrpC : ----- : -  
 SfaF : ----- : -  
 FocD : ----- : -  
 FimD : ----- : -  
 PapC : ----- : -


### Oznaczenia:


**A** – reszty aminokwasowe wykazujące 100% identyczności


**A** – reszty aminokwasowe wykazujące od 80 do 90% podobieństwa


**A** – reszty aminokwasowe wykazujące od 60 do 79% podobieństwa

 - obszar sekwencji sygnałnej


 - obszar N-terminalnego peptydu o długości od 1 do 24 reszty aminokwasowej periplazmatycznej domeny N-terminalnej białka FimD (na podstawie danych z analizy strukturalnej FimD<sub>N</sub>, [Nishiyama i wsp., 2005])


 - obszar rdzenia domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub> o długości od 25 do 125 reszty aminokwasowej (na podstawie danych z analizy strukturalnej FimD<sub>N</sub>, [Nishiyama i wsp., 2005])


 - obszar regionu zawiasowego N-terminalnej domeny FimD<sub>N</sub> o długości od 126 do 139 reszty aminokwasowej (na podstawie danych z analizy strukturalnej FimD<sub>N</sub>, [Nishiyama i wsp., 2005])

 - obszar domeny transmembranowej, (na podstawie analizy topologicznej białka FimD, [Capitani i wsp., 2006])

 - obszar środkowej domeny periplazmatycznej PMD (na podstawie analizy topologicznej białka Fimf, [Capitani i wsp., 2006])

 - obszar periplazmatycznej domeny C-terminalnej (na podstawie analizy topologicznej białka FimD, [Capitani i wsp., 2006])

 - struktury α-helis w obrębie domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub> (na podstawie danych z analizy strukturalnej FimD<sub>N</sub>, [Nishiyama i wsp., 2005])

 - struktury β-nici w obrębie domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub> (na podstawie danych z analizy strukturalnej FimD<sub>N</sub>, [Nishiyama i wsp., 2005])

## ZAŁĄCZNIKI

---

- ➡ - **struktury  $\beta$ -nici w obrębie białka kanałotwórczego** (analiza topologii białka PapC, [Thanassi i wsp., 2002])
- - **struktury pętlowe w obrębie białka kanałotwórczego** (analiza topologii białka PapC, [Thanassi i wsp., 2002])
- ➡ - **struktury  $\beta$ -nici w obrębie domeny transmembranowej i perioplazmatycznej domeny C-terminalnej** (analiza topologii białka PapC, [Henderson i wsp., 2004])
- - **perioplazmatyczne struktury pętlowe** (analiza topologii białka PapC, [Henderson i wsp., 2004])
- - **powierzchniowe struktury pętlowe** (analiza topologii białka PapC, [Henderson i wsp., 2004])
- ▲ - **reszty aminokwasowe domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub> oddziałujące z białkiem opiekuńczym FimC** (na podstawie analizy struktury potrójnego FimD<sub>N</sub>-FimC-FimH, [Nishiyama i wsp., 2005])
- - **reszty aminokwasowe domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub> oddziałujące zarówno z białkiem opiekuńczym FimC jak i z białkiem podjednostkowym FimH** (na podstawie analizy struktury potrójnego kompleksu FimD<sub>N</sub>-FimC-FimH [Nishiyama i wsp., 2005])
- ▲ - **reszty aminokwasowe domeny N-terminalnej FimD<sub>N</sub> oddziałujące z białkiem podjednostkowym FimH** (na podstawie analizy struktury potrójnego kompleksu FimD<sub>N</sub>-FimC-FimH, [Nishiyama i wsp., 2005])
- - **zakonserwowane w N- i C-terminalnych domenach perioplazmatycznych reszty cysteiny**
- ▲ - **reszty aminokwasowe hydrofobowej kieszeni rdzenia N-terminalnej domeny FimD<sub>N</sub> oddziałujące z Trp 133** (na podstawie analizy struktury potrójnego kompleksu FimD<sub>N</sub>-FimC-FimH [Nishiyama i wsp., 2005])
- - **zakonserwowana reszta tryptofanu w obrębie regionu zawiasowego domeny N-terminalnej**

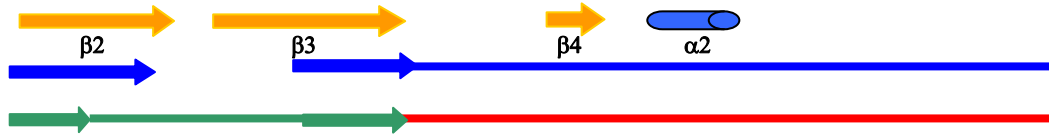
**Załącznik nr 2.** Porównawcza analiza sekwencyjna białek FUP biorących udział w biogenezie struktur adhezyjnych typu FGL. Oznaczenia jak w załączniku nr 1.



# ZAŁĄCZNIKI

DraC : MRDTSSGRMRTGVTGLALAVMVACVMFRAESGIARTYSFDAAMLKG--GGK--GVDLTLFEEGGQ : 61  
 AggC : MKTSS-----FIIIVILLCFRIENVIAHTFSFDASLNH--GSG--GIDLTLLEKGGQ : 48  
 CS3-2 : ----- : -  
 MyfC : MFFSLKN-----SVAKLIAFWAICLVLPVWAGHYTFDPILLANNINANANTDLSLFEQGGQ : 57  
 PsaC : -----MSTSFVLGAQRYSFDPNLLVD--GNN--NTDTSLFEQGN : 36  
 Caf1A : MRYSK-----LFLCAGLTLATLPCWGRAYTFDSTMIDTNSGES---IDVSLFNQGLQ : 49  
 SefC : MKKTT-----ITLFLVLTSVFHSNGVFSRQYNFDYGSLSLPPGEN----ASFSL-VET : 47

DraC : LPGIYIPVDIILNGSRVDSQEMAFHAERDAEGRPYLKTCLTREMLARYGVRIEEYPALFRASGEGR : 126  
 AggC : LPGIYIPVDIILNGSRIDSRDIFFYTKKNRHRGEYYLKPCLTRDILINYGVKTEEYPNLFQNSE-- : 111  
 CS3-2 : -----MYFDAGESE-----DFCIQYSVLQDIGVTVSGN-----QDE--- : 31  
 MyfC : LPGIYQVDIFILGDEKMDSTNVTFHFAVKSPTGEYSLQSCLTKEQLSRYGVDVDNYPELLPPEKNIQ : 122  
 PsaC : LPGIYLVDIILNGNKVDSSTNVTFHSEKSPSGEPFLQSCLTKEQLSRYGVDVDAYPELSPALKNSQ : 101  
 Caf1A : LPGNYFVNVFVNGRQKVDSGNIDFRLEKHNGKELLPCLSSSLQITKYGIDIDKYPDLIKSGTE-- : 111  
 SefC : LPGNYVVDVYLNQQLKELTELYFKSMTQT-----LEPCLTKEKLIKYGIAIQELHGLQFDNEQ-- : 105



DraC : GASVAEEACADLTALPQATESYQFAAQQLVLGIPQVAP-SAAEGDWPEALWDDGIPAFLLNQAN : 190  
 AggC : -KNRDSDCADLSVIPQATEDYHFVFKQQLILGIPQVARIPLTGLIAHETMWDDGISAFLLNQVE : 175  
 CS3-2 : -----CANLDELNLRTRDFEYSKRMDIFVSPKFWPRKKNGLAPIKLWDEGENALFTSYNFS : 88  
 MyfC : -QDKQASQCVNLAALPQASEEYFYAMRLVNLNIPQVALRP--KDEIPVERWDDGITAFLNLYMAN : 184  
 PsaC : -TN---PCVNLAALPQASEEYFYNMQLVLSIPQAAALRP--EGEVPIERWDDGITAFLNLYMAN : 159  
 Caf1A : -----QCVDLLAIPHSDVQFYFNQQLSLIVPPQALLPRFDGIMPMQLWDDGIPALFMNYNTN : 169  
 SefC : -----CVLLEHSP-LKYTYNAANQSLILNAPSKIILSPIDSEIADENIWDGGINAFLNLYRAN : 161



DraC : AGRSEYRGGYKRVTDSYWVSLQPGINIGPWRVRNLTTWNRSSGQSGKWESSYIRAERGLNGIKSR : 255  
 AggC : GSHWEYRSNTRNSSDNFASLEPGINIGSWRIRNLTTWNKSSGQSGKWESSYIRVERGLNNIKSR : 240  
 CS3-2 : EDYYHFKGDAR-DSYSQYANIQPRINIGPWRIRTQAIWNKNNNTKGEWSNNYLYAERGLGNIKSR : 152  
 MyfC : SSTTTYRQTGEQQS-SHYVQLYPCFNIGAWRVRNATSNQSGNSAGKWQSSYIYATRGLYRLKSR : 248  
 PsaC : ISETQFRONGGYRR-SQYIQLYPCFNIGAWRVRNAINWSQSGDRGKWSAYTYATRGIYRLKSR : 223  
 Caf1A : MQTRKFRREGKSLD-SYQAQLQPGINIGAWRFRSSTSWWKQGG---WORSYIYAERGLNTIKSR : 229  
 SefC : YLHSGVGGED-----SYFGQIQPCFNIFGPWRLRNLSSWQNLSSSEK-KFESAYIYAERGLKIKSK : 220

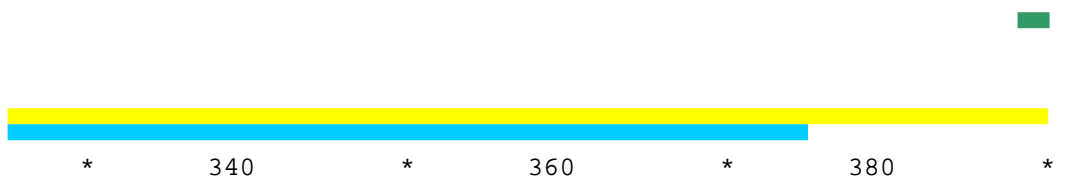


DraC : LTLIGEDYTPSDIFDSVPFRGAMSSDESMPYNLREFAPVVRGIARTQARIEVRONGYLIQSQTV : 320  
 AggC : LTLFGDDYTPSDIFDSVPFRGMLGSDENMYPYNQREFAPVVRGIARTQARIEVRONGYLIQSRIV : 305  
 CS3-2 : LYLIGDGYFPLKFNFSFKFKGGVLTDENMYPYSEKTYSPIVKGS AKTQAKVEFFQDGVKVIYSSIV : 217

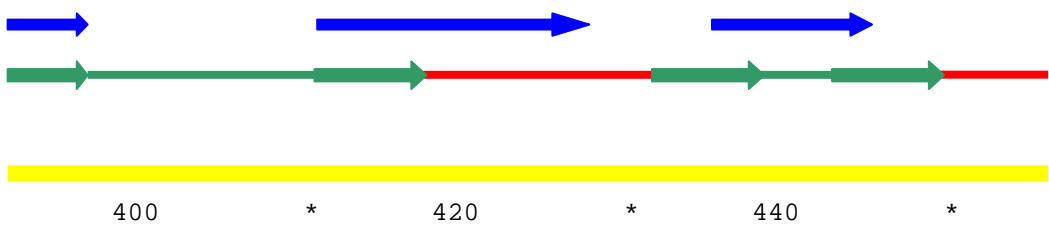


# ZAŁĄCZNIKI

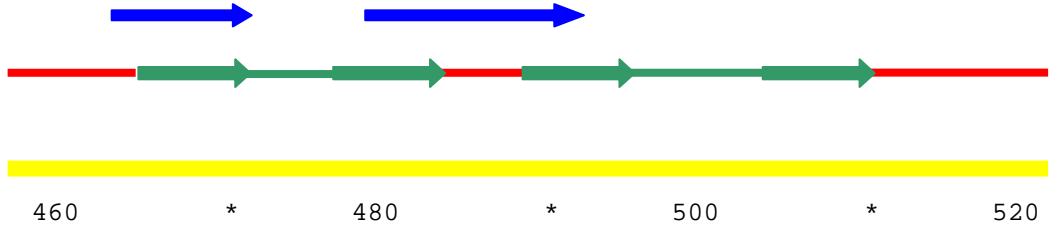
MyfC : VTLGQSYTPGDFDFDSVPFSGVMLGDDDNMLPSSQRDFIPVVRGIARSOARVEVRONGYLLYSTVV : 313  
PsaC : VTLGESYTPGDFDFDSIPFRGVMLGDDPNMQPSNQRDFIPVVRGIARSOAQVEIRONGYLLIYSTVV : 288  
Caf1A : LTLGETYSDDSI FDSIPFKGKIASDESMVPYYQWNFAPVVRGIARTOARVEVLRDGYITVSNELV : 294  
SefC : LTVGDKYTSADLFDSPVFRGFSLNKDESMIPFSQRITYPTIRGLAKTNATVEVRONGYLLIYSTVS : 285



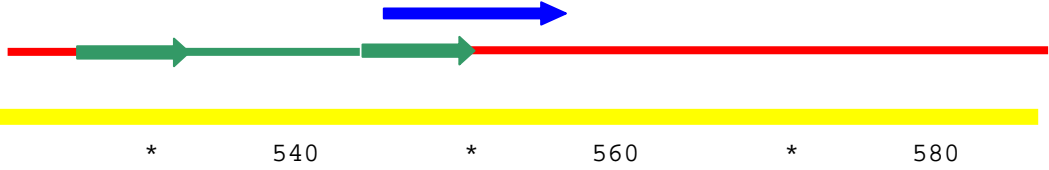
DraC : AFGAFALTDLPVTGS---GSDLQVTVLES DGT AQVFTVPF TTPAIALREGYLKYNVTAGQYRSSD : 382  
AggC : SFGAFALTDLPVTGN---GGDLQVWVLES DGT I QTFNVPFT TTPAIALREGYLKYNVTVGEYRPSD : 367  
CS3-2 : PPGDFSIDSYILSGS---NSDLVYKVI EENGSIQEFIVPFTYPAVAVREGFTYYEIAMGETQQSN : 279  
MyfC : SPGPFELTDILPSHS---NGDLHVIVLESNGT TQOFTVPYSVPAIRLRKRLRYNLMAGRYRPA : 375  
PsaC : PPGPFELSDVIPSKS---GSDLHVRVLESNGASQAFIVPYEVP AIALRKGH LRYN LVAGQYRPA : 350  
Caf1A : PSCPFELANLPLGGG---SGELKVI ITHESDGT KQVFTVPYDTPAVALRKGYFEYSMMGGEYRPA : 356  
SefC : PPGQFELIGREQIADLGVGVGLDVSITYEKNGQVQNYTVPYSTPVLISLPDGYSKYSVTICRYREVN : 350



DraC : DAVEHTSLGQVITAMYGLPWGLTVYGGIQGADDDYQSAALGLGWSLGR LGAVSLDTTHSRGQQKGHD : 447  
AggC : DSIEGAYLGLQLTAMYGLPWSLTAFGGIQVSEHYQGNALGLGLSLGGFGSISLDTIYSRGQQKGYS : 432  
CS3-2 : D-----YFTQLSFRGLPYDFIVLTSLEYSGFYRSLEIGLGKMLGNL GALS LIYGQSNF SKSDNS : 339  
MyfC : VDVE TTPIAQATVAYGLPWNLTAFVGGQWSPHYQATTAGMGVMLGDY GALSSSITQATSEYRQQQ : 440  
PsaC : ADVETPPVAQATVAYGLPWNLTAFVIGEQRHRYQATSAGLGLLGEY GALSSSITQATSQYHHQQ : 415  
Caf1A : DLTQTSYVGVFGMKYGLPRNFTLYGGIQGSONYHAEALGIGAMLGDFGAISTDVTQADSQKNKQK : 421  
SefC : NDYIDPVFFEGTYIYGLPYGFTLFGGVQVWNIYNSYAIGASKDIGEY GALS FDKWTSVSKTDTSN : 415



DraC : YETCDTWRIRYNKSFELTGT SFTAASYQYSSDGYHTT PDVLD TWRD-----DRYAYRHTENRS : 505  
AggC : NEICKTWRVRYDKSFELTGT SFAAG-YQDSSAGYHSLADVLD TYRN-----G-TAYRSYDNRI : 488  
CS3-2 : --KNKKWDIRYNKNIPDLNTYLSFSAVSQTRGGYSSLRDALDYEIG-----EYTFNS : 389  
MyfC : PVKQVWEVRYNKT LQASDT SFSV VNSQYS TADFSNLS DV LQSYRR-----HDYSRRDWHNSNL : 499  
PsaC : PVKQAWWEVRYNKT LQASDT SFSL VNSQYS INGFS T L S D V L Q S Y R Q S G D N R D K I D E N S R S R D L : 480  
Caf1A : KESCQRWRVRYNKYLQS-GTSLNIASEEYATEGFNKLA DTLNTYCKP-----NTRNDCRFDYAKP : 480  
SefC : -ENCHAYGLRYNKNIAQTNT E V S L A S H Y Y Y S K N Y R T F S E A I H S S E H -----DEFYDKNK : 468

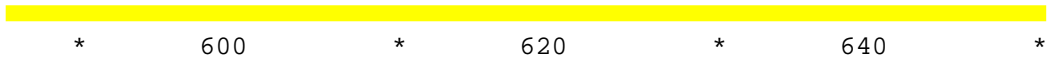


DraC : R-RTTLSLSQSILCQWGYVGLNGSRDEYR-DRPHRDYFGASYSYTSWNN--ISLSVNWSRNRNNGGY : 566  
AggC : R-RTTINISQALGEWGSVALNGGRDEYR-DKVKQDYIGASYSNSWKG--ITFAVNWSRNNNIGDY : 549



# ZAŁĄCZNIKI

CS3-2 : KNSY~~TAS~~IN~~HS~~LC~~EL~~GS~~LN~~FS~~GT~~WR~~NY~~WEN~~KN~~Q~~TR~~SY~~NL~~SY~~ST~~Q~~IF~~NG~~KAY~~LS~~GS~~LIR~~SEL~~M~~NFN~~ : 454  
 MyfC : RNQ~~TH~~V~~V~~G~~Q~~PL~~CQ~~F~~YL~~N~~LN~~W~~SR~~Q~~NY~~R-DAPASS~~SS~~W~~GV~~Q~~YS~~FN~~IGN~~--LY~~CS~~L~~D~~W~~TQ~~N~~Q~~Y~~RG~~-- : 559  
 PsaC : RNQ~~I~~SA~~V~~IG~~Q~~SL~~CK~~F~~YL~~N~~LN~~W~~SR~~Q~~Y~~RGP~~I~~PA~~KN~~SL~~G~~I~~H~~Y~~N~~LN~~V~~GN--SF~~WA~~L~~SW~~V~~Q~~NANEN-- : 541  
 Caf1A : KN~~K~~V~~Q~~F~~N~~L~~S~~Q~~S~~I~~P~~G~~S~~T~~L~~N~~F~~S~~G~~Y~~R~~K~~N~~Y~~W~~R~~D~~S~~R~~S~~T~~T~~S~~F~~S~~V~~G~~Y~~N~~H~~F~~F~~R~~NG-MS~~L~~T~~L~~N~~L~~S~~K~~T~~Q~~N~~I~~N~~K~~Y : 544  
 SefC : K~~S~~T~~T~~S~~M~~L~~L~~S~~C~~A~~L~~C~~S~~L~~G~~S~~V~~N~~L~~S~~Y~~N~~Y~~D~~K~~Y~~W~~-KHEG~~K~~S~~I~~I~~A~~S~~Y~~G~~K~~N~~L~~NG--V~~S~~L~~S~~L~~S~~Y~~T~~K~~S~~T~~S~~K~~I~~S- : 529



DraC : YG~~W~~S~~R~~T~~E~~D~~S~~V~~S~~-M~~W~~M~~S~~V~~P~~L~~G~~R~~W~~F~~G~~G~~A~~D~~N~~D~~I~~S~~T~~T~~A~~Q~~M~~Q~~R~~S~~T~~G~~Q~~D~~T~~R~~Y~~E~~A~~G~~L~~N~~G~~R~~A~~F~~D~~R~~R~~L~~Y~~W~~D~~V~~R~~ : 630  
 AggC : Y~~S~~N~~S~~L~~R~~T~~E~~N~~N~~L~~N~~-L~~W~~M~~S~~I~~P~~M~~K~~R~~W~~L~~G~~G~~D~~D~~K~~G~~V~~T~~A~~T~~A~~Q~~I~~Q~~R~~I~~T~~G~~O~~N~~T~~L~~Y~~E~~T~~G~~L~~N~~G~~R~~A~~F~~G~~Q~~K~~L~~Y~~W~~D~~I~~R~~ : 613  
 CS3-2 : ----N~~K~~I~~S~~D~~T~~I~~L~~N~~I~~G~~V~~N~~I~~P~~F~~G----L~~S~~R~~G~~I~~Q~~S~~V~~S~~Y~~N~~T~~S~~S~~V~~K~~G~~G~~R~~S~~T~~H~~Q~~L~~G~~I~~S~~G~~S~~E~~F~~D~~N~~K~~L~~Y~~W~~H~~V~~N~~ : 511  
 MyfC : ----N~~Q~~D~~R~~L~~L~~S-L~~S~~V~~S~~M~~P~~L~~G~~----R~~E~~R~~D~~T~~Y~~A~~A~~Y~~R~~M~~T~~S~~S~~D~~N~~S~~K~~D-H~~E~~M~~S~~L~~Y~~G~~H~~A~~F~~D~~N~~R~~L~~S~~W~~N~~V~~R : 612  
 PsaC : ----K~~N~~D~~R~~I~~L~~S-L~~S~~V~~S~~I~~P~~L~~G~~----G~~H~~H~~D~~T~~Y~~A~~S~~Y~~R~~M~~T~~S~~S~~N~~G~~S~~N~~D-H~~E~~I~~G~~M~~Y~~G~~Q~~A~~F~~D~~S~~R~~L~~S~~W~~S~~V~~R : 594  
 Caf1A : G---E~~K~~T~~S~~E~~L~~L~~S~~N~~I~~W~~L~~S~~F~~P~~L~~S~~R~~W~~L~~G--N~~N~~S~~I~~N~~S~~N~~Y~~Q~~M~~T~~S~~D~~S~~H~~G~~N~~T~~T~~H~~E~~V~~G~~V~~Y~~G~~E~~A~~F~~D~~R~~Q~~L~~Y~~W~~D~~V~~R~~ : 604  
 SefC : ----E~~E~~N~~E~~D~~L~~F~~S~~-F~~L~~L~~S~~V~~P~~L~~Q~~K~~L~~T---N~~H~~E~~M~~Y~~A~~T~~Y~~Q~~N~~S~~S~~S~~S~~K~~H~~D~~M~~N~~H~~D~~L~~G~~I~~T~~G~~V~~A~~F~~N~~S~~Q~~L~~T~~W~~Q~~A~~R~~ : 586



DraC : E~~Q~~M~~V~~P~~G~~S~~E~~S~~H~~A~~D~~T~~S~~-R~~L~~N~~L~~T~~W~~Y~~G~~T~~Y~~G~~E~~L~~T~~G~~M~~Y~~S~~S~~S~~T~~M~~R~~Q~~L~~N~~A~~G~~M~~S~~G~~S~~M~~V~~A~~H~~S~~E~~G~~V~~T~~F~~G~~Q~~R~~T~~G~~D~~T : 694  
 AggC : E~~Q~~I~~V~~P~~G~~S~~K~~Y~~D~~A~~D~~T~~S~~-L~~L~~N~~L~~R~~W~~S~~E~~G~~Y~~E~~L~~T~~G~~M~~Y~~S~~N~~R~~N~~T~~R~~Q~~M~~N~~V~~G~~T~~S~~G~~S~~M~~A~~I~~H~~S~~G~~G~~I~~A~~F~~G~~Q~~K~~T~~D~~D~~T~~ : 677  
 CS3-2 : Q~~G~~Y~~S~~---DN-~~Y~~S~~N~~T~~S~~M~~Y~~G~~Y~~K~~A~~K~~Y~~A~~O~~V~~N~~A~~G~~Y~~S~~V~~S~~E~~R~~Y~~N~~H~~A~~Y~~G~~G~~I~~E~~G~~G~~I~~L~~V~~Y~~D~~G~~G~~I~~L~~G~~R~~N~~L~~G~~D~~T : 571  
 MyfC : Q~~T~~E~~R~~Y~~A~~Q~~F~~H~~S~~G~~E~~N~~S~~G~~S~~L~~G~~L~~D~~W~~Q~~S~~Y~~G~~D~~I~~G~~G~~N~~Y~~Y~~T~~P~~T~~I~~R~~Q~~F~~S~~A~~N~~V~~S~~G~~G~~A~~V~~I~~H~~R~~H~~G~~L~~T~~L~~G~~P~~Q~~I~~N~~G~~T : 677  
 PsaC : Q~~A~~E~~H~~Y~~Q~~P~~N~~S~~G~~H~~N~~S~~G~~S~~L~~R~~L~~G~~W~~Q~~S~~Y~~G~~N~~I~~A~~G~~N~~Y~~Y~~T~~P~~S~~I~~R~~Q~~L~~S~~A~~D~~V~~S~~G~~G~~A~~I~~I~~H~~R~~H~~G~~L~~T~~L~~G~~P~~Q~~I~~N~~G~~T~~ : 659  
 Caf1A : E~~R~~F~~N~~--E~~K~~G~~R~~K~~Y~~T~~S~~N~~A~~L~~N~~L~~N~~Y~~R~~G~~T~~Y~~G~~E~~I~~S~~G~~N~~Y~~S~~D~~Q~~T~~Q~~S~~Q~~L~~G~~I~~G~~V~~N~~G~~N~~M~~V~~I~~T~~Q~~Y~~G~~I~~T~~A~~G~~Q~~K~~T~~G~~D~~T~~ : 667  
 SefC : G~~Q~~I~~E~~--D~~K~~S~~K~~N~~Q~~K~~A~~T~~F~~L~~N~~A~~S~~W~~R~~G~~T~~Y~~G~~E~~I~~G~~A~~N~~Y~~S~~H~~N~~E~~I~~N~~R~~D~~I~~G~~M~~N~~V~~S~~G~~G~~V~~I~~A~~H~~S~~S~~G~~I~~T~~F~~G~~Q~~S~~I~~S~~D~~T : 649



DraC : V~~A~~L~~I~~A~~A~~P~~G~~V~~S~~C~~A~~S~~V~~G~~G~~W~~P~~G~~V~~R~~T~~D~~F~~R~~G~~Y~~T~~L~~A~~G~~Y~~A~~S~~P~~Y~~Q~~E~~N~~V~~L~~T~~D~~P~~T~~T~~F~~P~~E~~D~~A~~E~~V~~P~~Q~~T~~D~~S~~R~~V~~V~~P~~T~~K~~ : 759  
 AggC : M~~A~~L~~I~~A~~A~~P~~G~~I~~A~~C~~A~~S~~V~~G~~G~~W~~P~~G~~V~~S~~T~~D~~F~~R~~G~~Y~~T~~L~~V~~G~~H~~V~~S~~P~~Y~~Q~~E~~N~~I~~I~~T~~D~~P~~T~~T~~F~~P~~D~~N~~T~~E~~V~~S~~Q~~T~~D~~R~~R~~V~~I~~P~~T~~K~~ : 742  
 CS3-2 : M~~S~~I~~I~~E~~A~~P~~C~~A~~E~~N~~T~~K~~I~~R~~G~~W~~G~~S~~I~~E~~T~~D~~W~~R~~G~~R~~A~~F~~I~~G~~Y~~L~~S~~P~~Y~~Q~~N~~D~~I~~S~~L~~D~~P~~S~~S~~L~~P~~L~~D~~S~~S~~L~~D~~I~~T~~T~~N~~S~~V~~I~~P~~T~~T~~ : 636  
 MyfC : A~~A~~L~~V~~E~~V~~P~~G~~V~~S~~C~~V~~S~~T~~S~~E~~D~~H~~R~~L~~K~~T~~D~~F~~R~~G~~Y~~S~~I~~V~~P~~N~~I~~F~~P~~Y~~E~~E~~H~~D~~I~~L~~L~~E~~T~~T~~D~~L~~P~~P~~D~~A~~E~~V~~T~~K~~T~~D~~A~~K~~V~~L~~P~~T~~E : 742  
 PsaC : S~~V~~L~~V~~E~~V~~P~~G~~V~~G~~E~~V~~T~~T~~T~~E~~D~~R~~R~~L~~K~~T~~D~~F~~R~~G~~Y~~S~~I~~V~~S~~G~~L~~S~~P~~Y~~Q~~E~~H~~D~~I~~V~~L~~E~~T~~A~~D~~L~~P~~P~~D~~A~~E~~V~~A~~K~~T~~D~~T~~K~~V~~L~~P~~T~~E : 724  
 Caf1A : I~~A~~L~~V~~Q~~A~~E~~D~~I~~S~~C~~A~~S~~V~~G~~Y~~W~~P~~C~~M~~K~~T~~D~~F~~R~~G~~Y~~T~~N~~Y~~G~~Y~~L~~T~~P~~Y~~R~~E~~Y~~K~~V~~E~~I~~N~~P~~V~~T~~L~~P~~N~~D~~A~~E~~I~~T~~T~~N~~N~~I~~V~~S~~V~~I~~P~~T~~K~~ : 732  
 SefC : A~~A~~L~~V~~E~~A~~K~~G~~V~~S~~C~~A~~K~~V~~L~~G~~L~~P~~G~~V~~R~~T~~D~~F~~R~~G~~Y~~T~~I~~S~~S~~Y~~L~~T~~P~~Y~~M~~N~~N~~F~~I~~S~~I~~D~~P~~T~~T~~L~~P~~I~~N~~T~~D~~I~~R~~Q~~T~~D~~I~~Q~~V~~V~~P~~T~~E : 714



DraC : G~~A~~V~~V~~R~~A~~G~~E~~R~~T~~R~~V~~C~~G~~R~~A~~V~~S~~L~~A~~R~~Q~~D~~G~~T~~P~~L~~P~~F~~G~~A~~V~~V~~T~~V~~E~~G~~E~~A~~G~~Q~~A~~A~~G~~S~~A~~G~~V~~V~~G~~D~~R~~G~~E~~V~~Y~~L~~S~~G~~L~~K~~E~~S~~G~~ : 824  
 AggC : G~~A~~L~~V~~Q~~A~~E~~F~~K~~T~~R~~V~~C~~N~~R~~A~~L~~V~~L~~I~~R~~K~~D~~G~~T~~L~~L~~P~~F~~G~~T~~V~~V~~T~~L~~E~~R~~K~~T~~G~~E~~A~~F~~E~~S~~A~~G~~V~~V~~D~~D~~K~~G~~K~~V~~Y~~L~~S~~G~~L~~S~~E~~A~~G~~ : 807



## ZAŁĄCZNIKI

```

CS3-2 : GAIVKTTYNVKKGKKVMLTLKKSNGDAVPFGAIVTVMDGD----QNTSIVGDNGQLYLGSSMDTG : 697
MyfC   : GAIVRASEFSPQIGARALMTITRNNGETIPFGAMASLVNQP----ANAAIVDEGCKAYLTGLPETG : 803
PsaC   : GAIVRASEFSPQIGAKALMTITRANGQTIIPFGAMASLVNQS----ANAAIVDEGCKAYLTGLPETG : 785
Caf1A  : GAVVLAKFNARICGRLEFLHLKRS DNKPVVFGSIVTIEGQS----SSSGIVGDNSGVYLTGLPKKS : 793
SefC   : GAIVKAVYKTSVGTNALIRITRTNGKPLALGTVLSLKNNDG-VIQSTSIVGEDGQAYVSGLSGVQ : 778
    
```

```

          *      860      *      880      *      900      *
DraC   : KLKAQWGENS--LCHADYRLP-EEKGPAGIFLTRTVCM----- : 859
AggC   : KLKAQWGTNS--QCYADYKLP-LKKGMSGIFLTRA VCM----- : 842
CS3-2  : RLKVIWNGEDKKCVVDYIVG-DNKNIAGIYIGSAEHVFSM LLYGKKISFLSASVWXVIGVVKA : 761
MyfC   : QLLVQWGRGASQQCRVDYQLANAKGDAGLYMLSGVCH----- : 841
PsaC   : QLLVQWCKDAGQQCRVDYQLSPA EKGD TGLYMLSGVCH----- : 823
Caf1A  : KILVKWGRDKNQSCSSNVVLP-EKTDISGAYRLSTTCILNN----- : 833
SefC   : KLIASWGNKPSDTCITVFSLP--DNKKGQTSFLNGVCK----- : 814
    
```

```

          920      *      940      *      960      *
DraC   : ----- : -
AggC   : ----- : -
CS3-2  : FLTTLQSNNEWRTHSEKND FSIDFDVGVGRSFAAVGPTKDM S LGANLTSEPTLAIDFTPIENIYV : 826
MyfC   : ----- : -
PsaC   : ----- : -
Caf1A  : ----- : -
SefC   : ----- : -
    
```

```

          980      *      1000      *      1020      *      1040
DraC   : ----- : -
AggC   : ----- : -
CS3-2  : GANYGKDIGTLVFTTNDLTDITLMSRSVVDGRQTGF FTFMDSSATYKISTKLGSSNDVNIQEIT : 891
MyfC   : ----- : -
PsaC   : ----- : -
Caf1A  : ----- : -
SefC   : ----- : -
    
```

```

          *      1060      *      1080
DraC   : ----- : -
AggC   : ----- : -
CS3-2  : QGAKITPVSGEKTLPKKFTLKLHAHRSSSTVPD TYTVGLNVTSNVI : 937
MyfC   : ----- : -
PsaC   : ----- : -
Caf1A  : ----- : -
SefC   : ----- : -
    
```

**Załącznik nr 3.** Porównawcza analiza sekwencyjna białek FUP biorących udział w biogenezie struktur adhezyjnych typu FGS. Oznaczenia jak w załączniku nr 1.





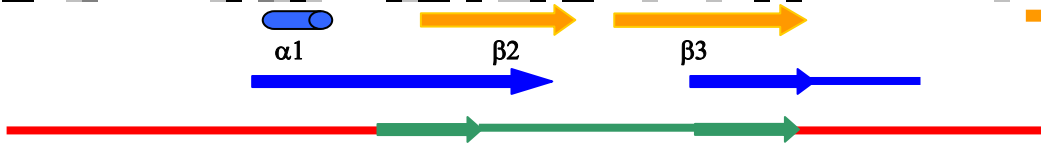
# ZAŁĄCZNIKI

HifC : -----MKTKNFPLNKIAFACTLLANP-----VAWAEDQ : 29  
 MrpC : -----MVRSFKTVCLEKREKRKKHAIRPVAILLIYLIVTGASSLSNSALANSDIET : 49  
 PmfC : -----MLIPYSPHTIWKTCATLLLSLAFFSQAE-----QDDSVET : 35  
 FocD : -----MFFGDGGQLLSDKSLTGSAGGGNNRMKFNILPLAFFIGIIVSPARAELEY : 49  
 SfaF : MCLAADFIFSLSVGADMFSGDGGQLLSDKSLTGSAGGGNNRMKFNILPLAFFIGIIVSPARAELEY : 65  
 FimD : -----MSYLNLRLYQRNTQCLHIRKHRLAGFFVRLVVACAFAAQAPLSSADLY : 48  
 PapC : -----MKDRIPFAVNNITCVILSLFCN-----AASAVE : 29

**β1**

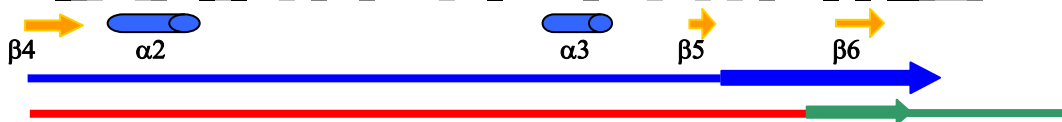
80 100 120 \*

HifC : FDASLWGGGSLVGLIDFAFENVKNAVLPGRYEAOIYVNNEEK--GESDIIIFADNPATG-----RA : 86  
 MrpC : FNADIIDLKDQKQIDLSDFSRAGYIMPGRYEFVVRINNNEL-PDIYNINIVVPAD-----DPKGS : 108  
 PmfC : FNIHMDAEDRDNDVLSRFSTSNYIIPGMYLDIRLNGRDF--PRQININIEVAD-----NHS : 91  
 FocD : FNRRFLSDDPDAVADLSAFTQGQELPPGVYRVDIYLNPTYI--STRDVQFQMSQD-----GKQL : 106  
 SfaF : FNPRFLSDDPDAVADLSAFTQGQELPPGVYRVDIYLNPTYI--STRDVQFQMSQD-----GKQL : 122  
 FimD : FNPRFLADDPQAVADLSRFENGQELPPGTYRVDIYLNNGYM--ATRDVTFENTGDS-----EQGI : 105  
 PapC : FNTDVLDAADKKNIDFTRFSEAGYVLPQOYLDDVIVNGQSI SPASLQISFVEPQSSGDKAEKCLP : 94



140 160 180 \*

HifC : ELCFTPKLQEMLDIMDEALVKSPNAEDDTCVFASEAIPKGTFDYQGGDMKIKLELPQALTIRRP : 151  
 MrpC : EPCLPPELVRQLGLKPEWLDKIRFNDNQTCLDTSSIPG-MTINASLCSGNLLLTIPQAYLEYSAP : 172  
 PmfC : VACLDPDLLKRLTINQENQKYIKQLSP-DCFDISQLPG-ISIKNDG--GVLDITLPRSLMKYEES : 152  
 FocD : APCLSPEHMSAMGVNRYAVPGMERLPADTCTSLNSMIQGATFRFDVGGQRLYLTVPOLYMSNQAR : 171  
 SfaF : APCLSPEHMSAMGVNRYAVPGMERLPADTCTSLNSMIQGATFRFDVGGQRLYLTVPOLYMSNQAR : 187  
 FimD : VPCLTRAQLASMGINTASVAGMNLADACVPLTTMVRTLLRRLDVGQQRNLNLTIPQAFMSNRAR : 170  
 PapC : QACLTSDMVRMLGLTAESLDKVVYWHDGQCADFHGLPG-VDIRPDTGAGVLRINMPQAWLEYSDA : 158



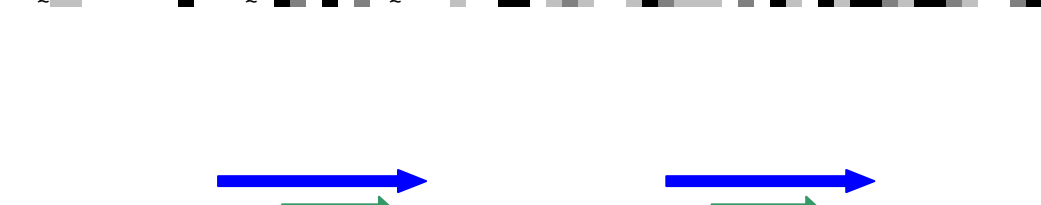
200 220 240 260 \*

HifC : GYLAPSRWQTGTNAASANYDINYRSGNPE-VKSKSLYVGLRGGVNLGNWALRHNGSFSRFENHS : 215  
 MrpC : NWDPPSRWDDGISGILFDYNNVANVTDPAKCKQRQVVTGLGTLGANLGAWRFRADWQASYQHTTG : 237  
 PmfC : DWTPPELWDSGVSGLIFDYTLTGTSTRPNKGNNTLTGYGQAGNLGEWRLRAEYQGNYS---- : 213  
 FocD : GYLAPFYWDNGITAAALNLYDFSGNRVRDITYGGTSDYAYLNLK'TGLNIGSWRLRDNTSWSYSAGK- : 235  
 SfaF : GYLAPFYWDNGITAAALNLYDFSGNRVRDITYGGTSDYAYLNLK'TGLNIGSWRLRDNTSWSYSAGK- : 251  
 FimD : GYLPPPELWDPGINAGLLNLYNFSGNVSQNRIGNSHYAYLNLQSGLNIGAWRLRDNTTWSYNSSD- : 234  
 PapC : TWLPPSRWDDGIPGLMLDYNLNGTVSRNYQGGDSHQFSYNGTVGGNLGPWRLRADYQGSQEQSRY : 223



280 300 320 \*

HifC : SSGFTDKGKNHYERGDYIQRDFALLRGNVTVGDFDFSTARIGESFGLRGLRTASDDRMLAPSQRG : 280  
 MrpC : IPQSTEE--N-SWKWNQYLYRAIPQWEARFVMGETYSRSDIFDSFRFTGVHLATDDNMLPPNLRG : 299



# ZAŁĄCZNIKI

PmfC : -SEYSS--NNRFDWNQIYAYKPIPDLAALKLTVGETYLNLSQIFDSFRFTGANLQSDERMLPPSLQG : 275  
 FocD : -GYS----QNNWQHINTWLERDITVSLRSRLTMGDSYTRGDI FDGVNFRGIQLASDDNMVPDSQRG : 295  
 SfaF : -GYS----QNNWQHINTWLERDITVPLRSRLTMGDSYTRGDI FDGVNFRGIQLASDDNMVPDSQRG : 311  
 FimD : -RSSGS--KNKWQHINTWLERDITVPLRSRLTLGDGYTQGDIFDGINFRGAQLASDDNMLPDSQRG : 296  
 PapC : NGEKTT--NRNETWSRFYLFRAIPRWRANLTLGENNINSDFRSWSYTGASLESDDRMLPPRLRG : 286

HifC : FAPVVRGVANTNAKVSIKQNGYTIYQITVPAGPFVINDLYASGYSGDLTIVEIQESDGKVRFSFI-V : 344  
 MrpC : YAPEVTGVAKTNAKVTISQQGRVITYETQVAPGPFRIQDINDAVS-GKLDVRVEEQDGSVQEFQ-M : 362  
 PmfC : YAPEIHGIANTNAKVTITQNGRLIYETITVPAGPFVINHLQNTVQ-GOLDVRVEEQNGKINEFQ-V : 338  
 FocD : YAPTIHGISRGTSRISIRONGYEIYQSILPPGPFEINDIYPAGSGGDLOVTLQEADGSVQRFN-V : 359  
 SfaF : YAPTIHGISRGTSRISIRONGYEIYQSILPPGPFEINDIYPAGSGGDLOVTLQEADGSVQRFN-V : 375  
 FimD : FAPVIHGIARGTAQVILKQNGYDIYNSTVPPGPFTINDIYAAGNSGDLOVTTIKEAVLAARRFLPY : 361  
 PapC : YAPQITGLAETNARVWVSQQGRVLYDSMVPAGPFSIQDLDSVSR-GRLDVEVIEQNGRKKTFQ-V : 349



HifC : BFSNLAPLMRVCHLRVQLAGCRYRIDSRTFDER-VLQGVLYQGLTNHLTLNSSLLYTR-HYRAGL : 407  
 MrpC : DTASIPYLTRPCRVQYKFSACKPSNIDHNTEGVVFGMEFSWGVSNQWSLYGGSIIVAG-DYNALS : 426  
 PmfC : QTANLPEYMTRPCSVRENTSLCQSSVNNHKMQGPLFYQDFSWGMNNTWSLYGGTLLITAKDYNAWS : 403  
 FocD : PWSSVEVLQRECHLKVALSACEFRSGGHQQDNPRFAEGLTKYGLPDGWTVYGCWIAE-RYRAFN : 423  
 SfaF : PWSSVEVLQRECHLKVALSACEFRSGGHQQDNPRFAEGLTKYGLPAGWTVYGCWIAE-RYRAFN : 439  
 FimD : PIRTFPELLNVKAYSLEHYGR-RIPYESRSRKKPAE-SRVHYSNGLPAGWTIYGGTQLAD-RYRAFN : 424  
 PapC : DTASVPEYLTRPCQVRVYKLVSCRSRGYGHETEGVVEATGEASWGLSNQWSLYGGAVLAG-DYNALA : 413



HifC : FGFCLNT-PIGAFSADATWSHAEFPLKKVSKNGYSLHGSYSINFNEIGTNLTLAARYSSRDFYT : 471  
 MrpC : ACIGRDLMAFGALSFDAHSHWAKIPRDDKRYNGGSYRLSYSKRFEAINSQVTFAGYRFSEDFMT : 491  
 PmfC : LCICHDMGRFCTLSDITQSYSKTY-DNEKINGMSFKLNYAKTFDEYHSTITIFAGYRFSEKTFRS : 467  
 FocD : LCVCKNMGWLCAVSLDATRANARLP-DESRHDGQSVRFLYKSLTETGTNIQLIGYRYSTRGYFT : 487  
 SfaF : LCMCKNMGWLCAVSLDATRANARLP-DESRHDGQSVRFLYKSLTETGTNIQLIGYRYSTRGYFS : 503  
 FimD : FGICKNMGALCALSVDMTQANSTLP-DDSQHDGQSVRFLYKSLNESGTNIQLVGYRYSTSGYFN : 488  
 PapC : AGAGWDLGVPCTLSDITQSVARIE-GERTFOGKSWRLSYSKRFDNADADITIFAGYRFSENYMT : 477



HifC : LSDTIIGLNRTFKQFSGAYLPEIYRP--KNQFQVLSLSQS-----LGNWGNLYLSGQTYNYW : 524  
 MrpC : MDQYLERRYR-DGNADNN-----KELYTIMFSKQ-----F-----PDWGLSTYLNYSHTYW : 537  
 PmfC : FSQYIDERNGINNGYE-----KEMYTITGNKT-----FWADDAEKSTTLYLSYRHQNYW : 518  
 FocD : FADTAWKMSGYSVLTQDGVIIQPKYTYNLAYNKR-EGAGEYQPADGESSTLYLSGSHQSYW : 551



# ZAŁĄCZNIKI

SfaF : FADTAWKRMMSGYSVLTQDGVIIQIQPKYTDYINLAYNKRGRVQVSISQQTGESSTLYLSGSHQSYW : 568  
 FimD : FADTTYSRMNGYNLETQDGVIIQVKPKFTDYINLAYNKRGLQLTQQLGRTSTLYLSGSHQTYW : 553  
 PapC : MEQYLNAFYR-NDYSSRE-----KEMVTVTLNKN-----V-----ADWNTSFNLQYSRQTYW : 523

\*            600            \*            620            \*            640            \*

HifC : EKRGTTNTQYQLAYANRFHILNYS---INLSQSIDKETGKRDNSTYLSLSLPLGDN-----H : 577  
 MrpC : NKP-TNDNYNLSLAKSADIGRFKNINFSLSAFRNKFNGTNDNGVYMNVSMPWGD----- : 590  
 PmfC : DKN-TQEQQYGVTVSRNFSIMGIEQINTNLSAFRTQYKGNDDTLFSFNISLPLGS----- : 571  
 FocD : GTDRTDRQLNAGFNSSVNDISWS---LNYSLSRNAWQHETDRILSFDVSIPIFSHWMRSDSTSAWR : 613  
 SfaF : GTDRTDRQLNAGFNSSVNDISWS---LNYSLSRNAWQHETDRILSFDVSIPIFSHWMRSDSTSAWR : 630  
 FimD : GTSNVDEQFQAGLNTAFEDINWT---LSYSLTKNAWQKGRDQMLALNVNIPFSHWLRSKSKSQRW : 615  
 PapC : DIR-KTDYYTVSVNRYFNVFGLQGVAVGLSASRSKYLGRDNDSAYLRISVPLG----- : 575



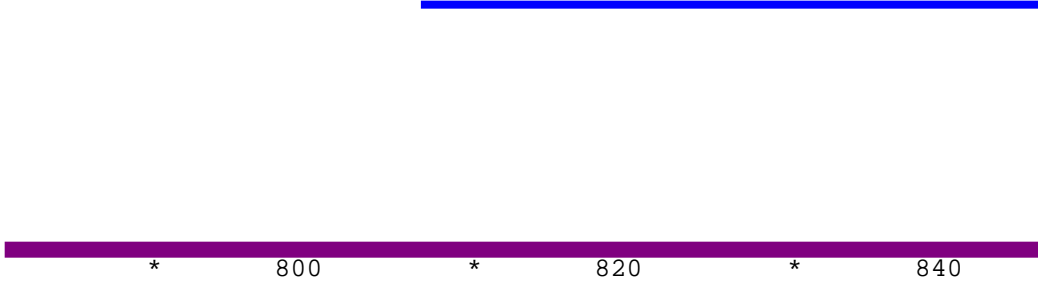
660            \*            680            \*            700            \*

HifC : SADSSYSRSGNDINQRLGVN---GSFGERHQSISYGINASRNNQ-----YRSYDANLAHNNSIGSY : 635  
 MrpC : RATISYNTVINKSGNSHNVS--YDRIDD-NSSYRVGAGVSSNG-----KPSADAYFMHYADAALV : 648  
 PmfC : GRNIGYNLQDNNGKVTQMAS--YADNRDY--NNLWRIRACLSSDK-----KANTDGYQHRSQYAEI : 629  
 FocD : NASARYSQTLEAHGQAASHTAGLYGTLTLDNNGLGYSTIQSGYTRGGYEGSSKTGYASLNRYGGYGNA : 678  
 SfaF : NASARYSQTLEAHGQAASHTAGLYGTLTLDNNGLGYSTIQSGYTRGGYEGSSKTGYASLNRYGGYGNA : 695  
 FimD : HASASYSMSHDLNGRMTNLAGVYGTLLDNNLSYSVQTGYAGEAMEIAEVQATP-LNRYGGYGNA : 679  
 PapC : TGTASYSGSMNDRYVNMAG--YTDTFNDGLDSYSLNACLNSGGGLTSQRQINAYYSHRSPLANL : 638



720            \*            740            \*            760            \*            780

HifC : RASYSRDSLKNRSTSLGASGAVVAHKYGITLTSQP--VGES-FATTHAKDAAGAKVES-GANVSLD : 696  
 MrpC : TASASHINGEYTSATLSLQGCATLTPKCGALHRVSRVTGST-RLLIDTDGIANIPVKNFGAISHTN : 712  
 PmfC : NANASYQQDNYLAVGATIKGFTATRYCAALHSSSMTSSTARIMVDTDGVAGVPFN--GQSTTTN : 692  
 FocD : SAGYSHS-GGYRQLYYGLSGGILAHANGLTSLQP--LGDT-LILVRAPGASDTRIEEN-QTGVSTD : 738  
 SfaF : SAGYSHS-GGYRQLYYGLSGGILAHANGLTSLQP--LGDT-LILVRAPGASDTRIEEN-QTGVSTD : 755  
 FimD : NIGYSHS-DDIKQLYYGVSGEVLAHANGVTLGQP--LNDT-VVLVKRLAQMOKSKT-RRGAYR- : 738  
 PapC : SANIASLQKGYTSFGVSASGCAITITGKCAALHAGGMSGGT-RLLVDTDGVGGVVPD--GGQVVTN : 700



\*            800            \*            820            \*            840

HifC : YFCNAVVPYTSPEIINYIGINPSDAEANVEFEATERQIIPRANSTISLVDLFRGTGKNTMVLFNLTLP : 761  
 MrpC : MFCKAVLPDINDYRSSASIDLNRIPENVEALRSIQQLTLTEGAIGYRRFDVIEGOKAMAVIRLK : 777  
 PmfC : RFGIGVLTDLISYNNVDARLDVDMQDIETRKALASTTLTEGAIGYYQFPVRQGERLMAVLQTT : 757



# ZAŁĄCZNIKI

FocD : WRGYAVLPYATDYRENRVALLDNTLADNVDIENTVVSVPVTHGAVVRADYKTRVGVKVLMTLMRN : 803  
 SfaF : WRGYAVLPYATDYRENRVALLDNTLADNVDIENTVVSVPVTHGAVVRADYKTRVGVKVLMTLMRN : 820  
 FimD : LACYAVLPYATDYRENRVALLDNTLADNVDLDNAVANVVPTRGATVRAEFKARVGIKLLIMTLTHN : 803  
 PapC : RWCTGVVTDLSSYRNTLSVDLKRIPDDVEATRSVVESALTEGAI GYRKF SVLKCKRIFAILRLA : 765



\*                    860                    \*                    880                    \*                    900                    \*

HifC : NGEPVPMASTAQDSECAFVGDVVQGGVLFANKLTQPKGELIVKNGERERESEQCRFHYQVLDLNAQI : 826  
 MrpC : DGTFFPPFCASVTTEKCRELGIINDGQNVYLTGIN-TGDVLSVRWSGKEQCKVLIPTLVENVQISS : 841  
 PmfC : DNKYPFFCAEVTINQKCESIGVMEEGLVYIAGVN-LNESLNVIIWNGKTQCSITIPAEITDPLK-H : 820  
 FocD : -GKAVPFCSSVTIARNCGSS-IAGENGQVYLSGMP-LSGQVSVKWGSQTTDQCTADYKLPKESAGQ : 865  
 SfaF : -GKAVPFCSSVTIARNCGSS-IAGENGQVYLSGMP-LSGQVSVKWGSQTTDQCTADYKLPKESAGQ : 882  
 FimD : -NKPLPFCAMVTSESSQSSGLVADNGQVYLSGMP-LAGKVQVKWGEENAHCVANYQLPPESQQQ : 866  
 PapC : DGSQPPFCASVTSEKCRELGVVADEGLAWLSGVT-PGETLSVNWDGKIQCQVNPETAISDQQ-- : 827



920                    \*                    940

HifC : QNHDIQCKTAE----- : 837  
 MrpC : LLLTCSDDGTATSTFNQREVSLPKTKFLSR : 871  
 PmfC : QSLVCQDR----- : 828  
 FocD : ILSHVTASCR----- : 875  
 SfaF : ILSHVTVSCR----- : 892  
 FimD : LLTQLSAEQR----- : 876  
 PapC : LLLPCTPQK----- : 836

