

Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}, Anna Marta Banaś¹,
Magdalena Joanna Grzeszczuk¹

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w styczniu 2017 r.
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Analizy funkcjonowania białek Dsb *in vivo*. 2.1. Wyznaczanie stanu redoks białek. 2.2. Analiza fenotypowa zmutowanych szczepów. 3. Analizy funkcjonalne białek Dsb *in vitro*. 3.1. Test redukcji insuliny. 3.2. Określanie potencjału redoks. 3.3. Analiza aktywności oksydacyjnej i izomeryzacyjnej. 3.4. Określanie wartości pKa nukleofilowej cysteiny motywu CXXC. 3.5. Analizy oddziaływań pomiędzy DsbA a DsbB. 3.6. Struktury białek. 3.7. Identyfikacja substratów białek Dsb. 4. Podsumowanie

Strategies for the analysis of thioloxidoreductases

Abstract: Bacterial Dsb (disulfide bond) enzymes are involved in the oxidative folding of many proteins, through the formation of disulfide bonds between thiol groups of cysteine residues. This process is critical for the correct folding and structural stability of many secreted and membrane proteins. The rapidly expanding number of sequenced bacterial genomes has revealed the enormous diversity among bacterial Dsb systems. While the *Escherichia coli* oxidative protein folding has been studied in great details, the mechanism of the Dsb systems functioning in other bacteria are rather poorly understood. Herein, we present the current methodology, both *in vivo* and *in vitro* experimental techniques, which allow us to understand the functioning of the Dsb proteins and has broaden our knowledge in the field of biochemistry and microbiology of this posttranslational protein modification. Many bacterial virulence factors are extracytoplasmic Dsb-dependent proteins. Thus, this system plays an important role in bacterial pathogenesis and the proteins of the Dsb network represent possible targets for new drugs.

1. Introduction. 2. Analysis of the Dsb functioning *in vivo*. 2.1. Determination of the *in vivo* redox state. 2.2. Phenotypic assay of the mutated strains. 3. Analysis of the Dsb functioning *in vitro*. 3.1. Insulin reduction assay. 3.2. Determination of the redox potential. 3.3. Assay of the oxidative and isomerase activity. 3.4. Determination of the pKa value of the cysteine residue. 3.5. Determination of the interaction between DsbA and DsbB. 3.6. Protein structures. 3.7. Searching for Dsb protein substrates. 4. Conclusions

Słowa kluczowe: białka Dsb, cechy biochemiczne, EcDsbA, mostki disiarczkowe, struktura

Key words: Dsb proteins, EcDsbA, disulfide bonds, protein structure, biochemical attributes

1. Wprowadzenie

Potranslacyjne modyfikacje białek są istotnym procesem biologicznym, decydującym o strukturze i stabilności, a w konsekwencji o funkcjonalności wielu protein. Jedną z najpospolitszych modyfikacji jest wprowadzanie mostków disiarczkowych, polegające na utlenianiu grup tiolowych cystein, z jednoczesnym uwolnieniem dwóch elektronów. W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces ten zachodzi w utleniających warunkach panujących w przestrzeni peryplazmatycznej. Generowanie mostków disiarczkowych jest etapem ograniczającym szybkość fałdowania białek. Choć *in vitro* zachodzi on spontanicznie, *in vivo* katalizowany jest przez zespół białek Dsb (*disulfide bond*). Badania prowadzone od ponad 20 lat zaowocowały szczegółową charakterystyką systemu Dsb modelowego mikroorganizmu, *Escherichia coli* K-12. W komórkach *E. coli* K-12 białka Dsb działają w dwóch szlakach: utleniania (EcDsbA, EcDsbB) i izomeryzacji/redukcji (EcDsbC i EcDsbD). W szlaku utleniania pomiędzy resztami cystein w białkach tworzone są wiązania disiarczkowe, natomiast w szlaku izomeryzacji/redukcji – naprawiane są błędy szlaku

utleniania. Monomeryczne, peryplazmatyczne białko EcDsbA, którego struktura zawiera charakterystyczną dla oksydoreduktaz tiolowosiarczkowych domenę tioredoksyny (TRX), katalizuje powstanie wiązania pomiędzy grupami tiolowymi cystein innych białek, zaraz po, lub czasami w trakcie, ich transportu przez błonę cytoplazmatyczną do peryplazmy. Kluczowe znaczenie dla funkcji tego enzymu ma zlokalizowany w domenie TRX motyw aktywny CXXC oraz aminokwasowa reszta cis-proliny, odległa w strukturze pierwszorzędowej, lecz sąsiadująca z motywem CXXC w strukturze trzeciorzędowej. Cysteiny motywu katalitycznego DsbA ulegają jednocześnie redukcji. Aby białko DsbA mogło przeprowadzić kolejny cykl reakcji, musi ono zostać ponownie utlenione. Za reoksydację enzymu EcDsbA odpowiedzialne jest EcDsbB (20 kDa), integralne białko błony cytoplazmatycznej, które zawiera cztery transbłonowe α -helisy (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne (P1, P2). W każdej z pętli tworzony jest mostek disiarczkowy. Z DsbB elektrony przekazywane są na ostateczne receptory przez kompleksy białkowe wchodzące w skład łańcucha oddechowego. W białkach, które w sekwencji aminokwasowej posiadają więcej niż

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

dwie cysteiny istnieje możliwość błędnego wprowadzenia wiązań disiarczkowych, szczególnie w przypadku kiedy do prawidłowego funkcjonowania białka wymagane jest połączenie mostkiem reszt tiolowych cystein niesąsiadujących ze sobą. W komórkach *E. coli* K-12 nieprawidłowo wprowadzone wiązania są naprawiane przy udziale EcDsbC – izomerazy mostków disiarczkowych. Monomer EcDsbC (23 kDa) posiada C-końcową domenę tioredoksyny z motywem CXXC oraz N-końcową domenę dimeryzacyjną, warunkującą przyjęcie przez ten enzym struktury V-kształtnego homodimeru. Niezbędnych do przeprowadzenia reakcji izomeryzacji elektronów dostarcza zakotwiczone w błonie wewnętrznej, trójdomenowe białko EcDsbD, które transportuje je z cytoplazmatycznej tioredoksyny. Funkcjonowanie tych procesów zostało dokładnie opisane w kilku pracach przeglądowych [3, 10, 45, 57].

W ostatnich latach udokumentowano, że systemy Dsb, funkcjonujące w komórkach prokariota, charakteryzują się olbrzymią różnorodnością zarówno pod względem liczby białek Dsb, ich struktur, jak i wzajemnych interakcji. Wiele bakteryjnych genomów koduje kilka białek DsbA o różnej specyficzności substratowej, współpracujących z jednym lub kilkoma homologami EcDsbB [22]. W komórkach innych brak jest DsbB, a jego funkcję pełni homolog eukariotycznego białka – reduktazy epitlenku witaminy K (*VKOR-vitamin K epoxide reductase*) lub paralog DsbB, białko DsbI o nietypowej strukturze. N-końcowy fragment DsbI, zawierający pięć domen transbłonowych, przypomina klasyczne DsbB, podczas gdy C-końcowa domena zlokalizowana w peryplazmie przybiera strukturę β -propelera [16, 39, 63]. Chociaż większość opisanych jak dotąd homologów EcDsbA to białka monomeryczne, funkcję generowania mostków disiarczkowych w proteomach niektórych gatunków mikroorganizmów pełnią białka dimeryczne, o strukturach podobnych do izomerazy EcDsbC [9, 35, 52]. Wyjątkowo rozbudowany system Dsb występuje w komórkach *Legionella pneumophila*, gdzie funkcjonują dwa białka DsbA, dwa DsbB, dwa DsbD przy jednoczesnym braku DsbC [34–35]. Z drugiej strony, w komórkach *Helicobacter pylori* brak jest klasycznych białek DsbA/DsbB oraz DsbC/DsbD, a ich funkcję przejmują dwie nietypowe oksydoreduktazy HP0231 i HP0377 [4, 53]. Obserwowana różnorodność dotyczy też białek z nadrodziny DsbD transportujących elektrony niezbędne do procesu redukcji niektórych białek Dsb, między innymi DsbC. Opisano, jak dotąd, trzy membranowe białka zaangażowane w ten proces: DsbD, ScsB i CcdA [6–7, 32, 60]. Wiele przykładów różnorodności systemów Dsb podano w pracach przeglądowych do których odsyłamy czytelnika [20, 22, 38].

Stale rosnąca liczba szczepów bakterii patogennych, opornych na stosowane w terapiach ludzi antybiotyki, stanowi poważne zagrożenie dla ludzkości. Skuteczna

walka z chorobami zakaźnymi wymaga opracowania i wprowadzenia na rynek nowych klas leków, o odmiennych od antybiotyków mechanizmach działania. Na szeroką skalę prowadzone są aktualnie badania nad opracowywaniem leków blokujących procesy wirulencji. Wiele czynników wirulencji licznych bakterii patogennych to białka pozacytoplazmatyczne, zawierające więcej niż jedną resztę cysteinową. Dla osiągnięcia właściwej struktury wymagają wprowadzania mostków disiarczkowych pomiędzy grupami – SH reszt cysteinowych. Tak więc ta potranslacyjna modyfikacja często decyduje o patogenności drobnoustrojów, a białka Dsb można rozpatrywać jako cele nowych leków antybakteryjnych. Poznanie szczegółów mechanizmów ich działania oraz rozwiązanie struktur jest pierwszym krokiem prowadzącym do badań aplikacyjnych, umożliwiających planowanie inhibitorów. Praca przeglądowa przedstawia strategię stosowane w badaniach tiolowych oksydoreduktaz. Ich zastosowanie doprowadziło do pierwszych prób poszukiwania strategii blokowania procesów generowania mostków disiarczkowych.

2. Analizy funkcjonowania białek Dsb *in vivo*

2.1. Wyznaczanie stanu redoks

Tiolowe oksydoreduktazy występują w komórkach w formie zredukowanej (cysteiny z grupami tiolowymi – SH) oraz w formie utlenionej (wytworzony mostek disiarczkowy pomiędzy grupami – SH cystein). Białka Dsb będące oksydazami odpowiedzialne za wprowadzanie mostków disiarczkowych obecne są w komórce w formie utlenionej, podczas gdy izomerazy w formie zredukowanej. Obie formy konkretnego białka migrują w żelach SDS poliakrylamidowych z taką samą prędkością. Aby określić stan redoks białka stosuje się najczęściej związek alkilujący wolne grupy tiolowe: AMS (4-acetamido-49-maleimidylstilbene-2,2-disulfonic acid). Kowalencyjne dołączenie odczynnika do wolnych grup tiolowych skutkuje zwiększeniem masy cząsteczkowej białka o 490 Da na każdą wolną grupę – SH i zmianą jego mobilności, wykrywaną metodą SDS PAGE z zastosowaniem odpowiednich surowic. Metoda ta nosi nazwę „ASM trapping” [12]. W niektórych eksperymentach zamiast AMS stosowany jest odczynnik MalPEG5000 (polyethyleneglycol (PEG)-conjugated-maleimide), którego połączenie z grupą – SH skutkuje zwiększeniem masy cząsteczkowej białka o 5 kDa [35].

2.2. Analiza fenotypowa zmutowanych szczepów

Unieczynnienie genów kodujących białka odpowiedzialne za generowanie mostków disiarczkowych przeważnie, choć nie zawsze, wywołuje efekt plejotropowy.

Komórki pozbawione tych białek charakteryzują się podwyższoną wrażliwością na DTT, brakiem ruchliwości czy zwiększoną wrażliwością na działanie jonów metali ciężkich takich jak kadm czy miedź. Ponieważ podwyższone stężenie jonów miedzi skutkuje niewłaściwym zwijaniem białek, unieczynnienie białek Dsb o aktywności izomeryzacyjnej prowadzi do ich, podwyższonej w stosunku do komórek typu dzikiego, wrażliwości na ten pierwiastek. Tak więc strategią dostarczającą informacji o funkcjonowaniu badanego białka jest skonstruowanie odpowiednich mutantów i ich analiza fenotypowa [2, 35, 52, 59]. Należy jednak zaznaczyć, że niektóre białka Dsb charakteryzują się niską specyficznością substratową i wprowadzają mostki disiarczkowe tylko do jednego lub kilku substratów, a dla niektórych jak dotąd wszystkie analizy fenotypowe nie dały pozytywnych rezultatów [2, 19, 29, 62].

Efekty fenotypowe, będące konsekwencją delekcji genu *dsbA* lub *dsbC* w komórkach *E. coli*, zostały już dokładnie poznane. Są to wyżej opisana wrażliwość na DTT, utrata ruchliwości (brak funkcjonalnego białka FlgI), podwyższona wrażliwość na jony kadmu czy dodatkowo obniżenie aktywności alkalicznej fosfatazy w wypadku inaktywacji genu *dsbA* [30, 48]. Delekcja genu *dsbC* skutkuje wzrostem wrażliwości na jony miedzi i utratą mukoidalnego charakteru kolonii mutantów w genie *mdoG*. Warunki stresowe, będące efektem mutacji *mdoG*, aktywują układ dwuskładnikowy Rcs, w sposób zależny od błonowej lipoproteiny RcsF, zawierającej dwa mostki disiarczkowe. Uszkodzenie systemu Dsb (EcDsbC) uniemożliwia aktywację układu. Tak więc, mutanty *E. coli* w genie *mdoG* charakteryzują się mukoidalnym wzrostem, podczas gdy ten fenotyp nie występuje w komórkach podwójnych mutantów *mdoGdsbC* [8, 25, 40]. Stosowaną często strategią, pozwalającą na zrozumienie funkcjonowania badanej tiolowej oksydoreduktazy, są eksperymenty komplementacji mutacji *dsbA* lub/i *dsbC* w komórkach *E. coli*. Badane geny są klonowane w wektorach wahadłowych lub pod kontrolą indukcyjnych promotorów charakterystycznych dla komórek *E. coli* np. promotora genu arabinozowego [17, 35].

Ciekawych danych wyjaśniających mechanizmy funkcjonowania tiolowych oksydoreduktaz dostarczają też eksperymenty mutagenety specyficznej co do miejsca, dotyczące ich motywów katalitycznych lub analizujące funkcjonowanie hybrydowych białek, będących połączeniem różnych domen białek Dsb [4, 26, 48, 51, 56].

3. Analizy funkcjonalne białek Dsb *in vitro*

Białka stosowane do analiz biochemicznych oczyszczane są standardowymi metodami z zastosowaniem układów ekspresyjnych funkcjonujących w komórkach

E. coli. Najczęściej odpowiednie geny klonowane są w plazmidach z serii pET z pominięciem fragmentu 5' kodującego sekwencję sygnałną, a następnie nadproduktowane i oczyszczane z cytoplazmy komórek gospodarza z zastosowaniem chromatografii powinowactwa.

3.1. Test redukcji insuliny

Test ten jest powszechnie stosowany do określenia czy badane białko należy do rodziny oksydoreduktaz, niezależnie od tego, czy uczestniczy w szlaku utleniania czy redukcji wiązań disiarczkowych *in vivo*. Czwartorzędowa struktura insuliny składa się z dwóch łańcuchów: A i B połączonych ze sobą dwoma mostkami disiarczkowymi. Redukcja wiązań disiarczkowych skutkuje precypitacją łańcucha B insuliny. Kinetyka procesu jest monitorowana spektrofotometrycznie [37]. Ponieważ test mierzy właściwości redukujące białek, te o aktywnościach izomeraż wykazują zdecydowanie wyższą aktywność niż tiolowe oksydazy. I tak np. EcDsbA charakteryzuje tylko 10% aktywności EcDsbC. Niektóre homologi EcDsbA (MtDsbA czy SaDsbA) nie są zdolne do redukcji insuliny, co wskazuje na ich lekko odmienną strukturę oraz wąską specyficzność substratową [23, 47]. W celu zwiększenia czułości testu możliwe jest zastosowanie rekombinowanej insuliny, do której dołączono peptyd fluorescencyjny (FITC-insuline). Wzbudzenie fluorescencji światłem o określonej długości umożliwia precyzyjną detekcję zmian zachodzących podczas eksperymentu. Inną modyfikacją metody jest powiązanie redukcji insuliny przez badaną tiolową oksydazę z utlenieniem GSH do GSSG i wykorzystaniem przy pomiarze NADPH [64].

3.2. Określanie potencjału redoks

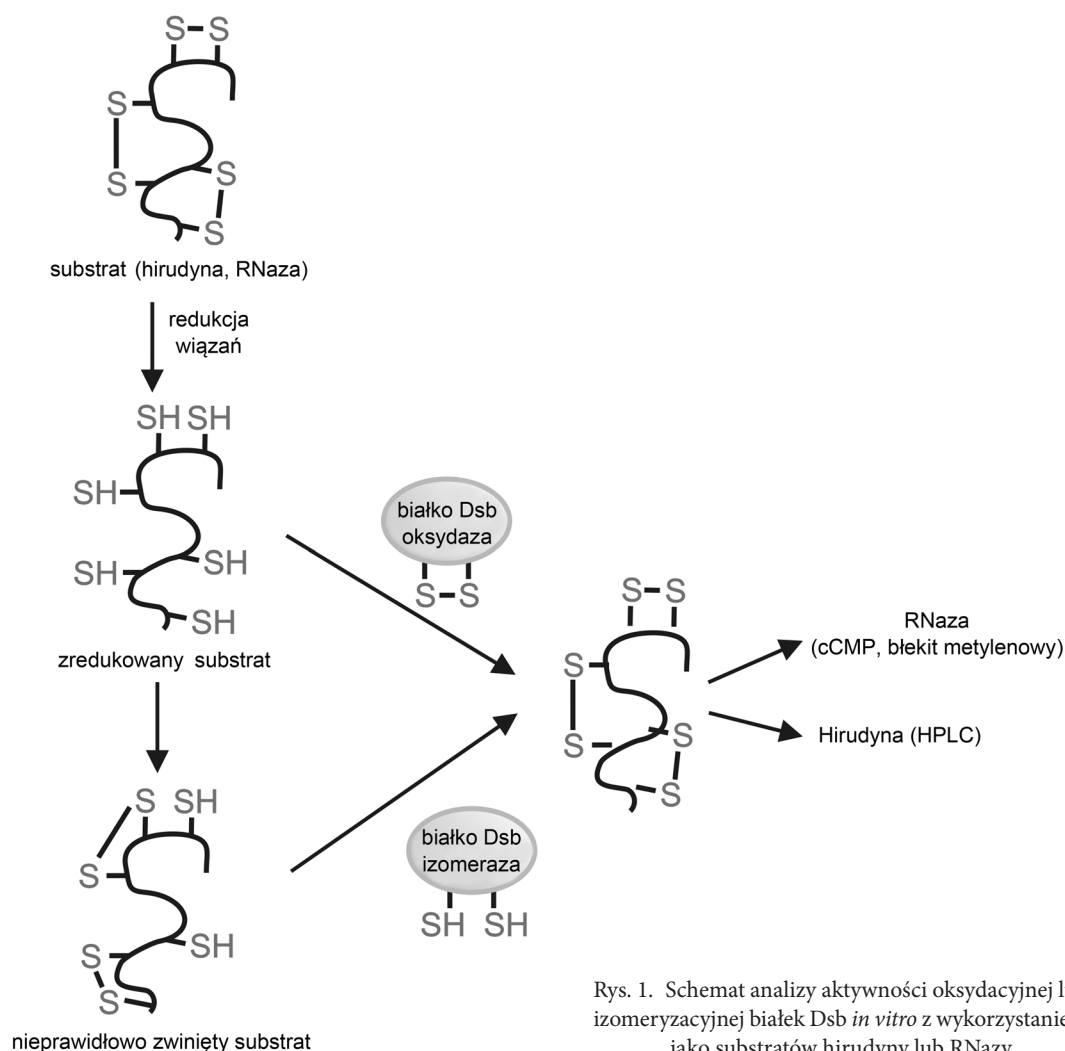
Tiolowo-disulfidowe oksydoreduktazy, w zależności od pełnionych funkcji, występują w komórce głównie w jednym z dwóch stanów: utlenionym bądź zredukowanym. Tendencja białka do występowania w bardziej uprzywilejowanej formie wyrażana jest ilościowo jako jego potencjał redoks. Potencjał redoks jest określany eksperymentalnie przez pomiar względnych ilości frakcji białka w formie utlenionej i zredukowanej w stanie równowagi ze związkiem o znanym potencjale redoks, np. glutationem (parą redoks glutationu zredukowanego – GSH i utlenionego – GSSG). Pomiar dokonywany jest z wykorzystaniem dwóch strategii, w zależności od obecności reszty tryptofanowej w sekwencji aminokwasowej białka: metodą fluorymetryczną lub analizując zmiany stanu redoks białka z zastosowaniem odczynnika alkilującego AMS. Metoda fluorymetryczna polega na monitorowaniu zmian fluorescencji tryptofanu, uzależnionych od występowania białka w formie utlenionej lub zredukowanej. Potencjał redoks

białka wyznaczany jest zgodnie z równaniem Nernsta [37, 52, 66]. Oksydazy charakteryzuje potencjał redoks znacznie wyższy od potencjału redoks izomeraz. Najniższym potencjałem redoks charakteryzują się cytoplazmatyczne tioredoksyny utrzymujące białka w tym przedziale komórkowym w stanie zredukowanym.

3.3. Analiza aktywności oksydacyjnej i izomeryzacyjnej

W celu weryfikacji zdolności badanej tiolowej oksydoreduktazy do generowania mostków disiarczkowych lub rearanżacji nieprawidłowo wprowadzonych mostków, stosowane są testy *in vitro* z oczyszczonymi białkami, z zastosowaniem dwóch substratów: RNazy lub hirudyny. RNazaA jest polipeptydem składającym się ze 124 aminokwasów, które w strukturze drugorzędowej tworzą cztery anty-równoległe β -kartki i trzy α -helisy. Białko stabilizowane jest przez cztery mostki disiarczkowe (trzy wiązania -S-S- pomiędzy niesąsiadującymi cysteinami 26–84; 40–95; 58–110 i jedno między sąsiadującymi cysteinami w pozycjach 65–72). Prawidłowa lokalizacja mostków disiarczkowych jest kluczowa dla

zachowania funkcji biochemicznych białka [49, 55]. Hirudyna, inhibitor trombiny, jest polipeptydem składającym się z 65 aminokwasów, które zorganizowane są w domenę N-terminalną, zawierającą trzy mostki disiarczkowe i domenę C-terminalną, która nie wykazuje uporządkowanej organizacji bez stworzenia kompleksu z trombiną. Oba substraty stosowane są w dwóch formach: jako białka o zredukowanych mostkach (cysteiny z grupami -SH) lub niepoprawnie zwinięte białka tzw. scrambled (sc) formy białek. Dla określenia aktywności RNazy stosowane są najczęściej dwa testy: test z zastosowaniem błękitu metylenowego MBAS (Methylene Blue Assay), w którym poprzez pomiar absorbancji oceniana jest interkalacja cząsteczek barwnika do RNazy lub pomiar monitorujący zdolność RNazy do rozkładu cyklicznego związku cCMP. Gdy jako substrat stosowana jest hirudyna, powstające kompleksy hirudyny z substratem rozdzielane są z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), a kinetyka reakcji może być także, w niektórych przypadkach, monitorowana fluorometrycznie [4–5, 18, 26, 36, 46, 48, 51]. Rysunek 1



Rys. 1. Schemat analizy aktywności oksydacyjnej lub izomeryzacyjnej białek Dsb *in vitro* z wykorzystaniem jako substratów hirudyny lub RNazy

przedstawia zasady analizy aktywności oksydacyjnej lub izomeryzacyjnej białek Dsb.

3.4. Określenie wartości pK_a nukleofilowej cysteiny motywu CXXC

Wartość pK_a cysteiny pozwala określić w jakim pH cysteina występuje w równowadze w formie uprotowanej i w formie anionu tiolowego. Oksydoreduktazy są aktywne w reakcjach wprowadzania mostków disiarczkowych, gdy pierwsza cysteina motywu CXXC występuje w formie anionu tiolowego. Poziom jonizacji tej cysteiny określa wartość pK_a . Anion tiolowy charakteryzuje się wyższą absorpcją niż grupa tiolowa przy długości fali = 240 nm. Umożliwia to określenie wartości pK_a kontrolując absorpcję przy tej długości fali, przy stopniowym obniżaniu pH [23]. Występuje ścisły związek pomiędzy wartością pK_a a potencjałem redukcyjnym białka – im niższa wartość pK_a N-terminalnej cysteiny motywu CXXC tym wyższy potencjał redukcyjny.

3.5. Analizy oddziaływań pomiędzy DsbA a DsbB

EcDsbB, białko błony wewnętrznej o czterech domenach transbłonowych, zawiera w sekwencji aminokwasowej cztery cysteiny tworzące dwa mostki disiarczkowe. Pierwszy zlokalizowany w pierwszej pętli peryplazmatycznej (Cys41-Cys44) i drugi pomiędzy Cys104 i Cys130 w drugiej pętli peryplazmatycznej. Oba są niezbędne w procesie reutlenia EcDsbA, przekazywania elektronów z DsbA na łańcuch oddechowy. W pierwszym etapie tej reakcji następuje atak zlokalizowanej na powierzchni białka DsbA Cys30 na mostek Cys104-Cys130, co doprowadza do powstania międzycząsteczkowego wiązania pomiędzy DsbA i DsbB (Cys30-Cys104). Zredukowana Cys130 atakuje mostek disiarczkowy w pierwszej pętli peryplazmatycznej (Cys41-Cys44), dochodzi do powstania przejściowego wiązania między Cys41 a Cys130. W następnym etapie następuje związanie ubichinonu, co doprowadza do dalszego transportu elektronów i odtworzenia struktury zarówno EcDsbA jak i EcDsbB. Proces przekazywania elektronów podczas reutlenia białka EcDsbA prezentuje rysunek 2. Badania strukturalne pozwoliły na identyfikację krótkiego peptydu EcDsbB odpowiedzialnego za wiązanie EcDsbA z EcDsbB, jest to peptyd w obrębie którego, występuje Cys104 (98PSPFATCDFM107) [27–28, 68]. Struktura EcDsbA, w powiązaniu z lekko zmienionym, ze względów metodycznych peptydem, pochodnym EcDsbB, też została rozwiązana [15]. W celu potwierdzenia reutlenia DsbA przez DsbB *in vivo* analizowany jest stan redoks tiolowej oksydazy w mutantach w genach homologach *dsbB* (AMS trapping) lub zdolność białka do komplementacji mutantów *E. coli dsbA dsbB*. Opracowano

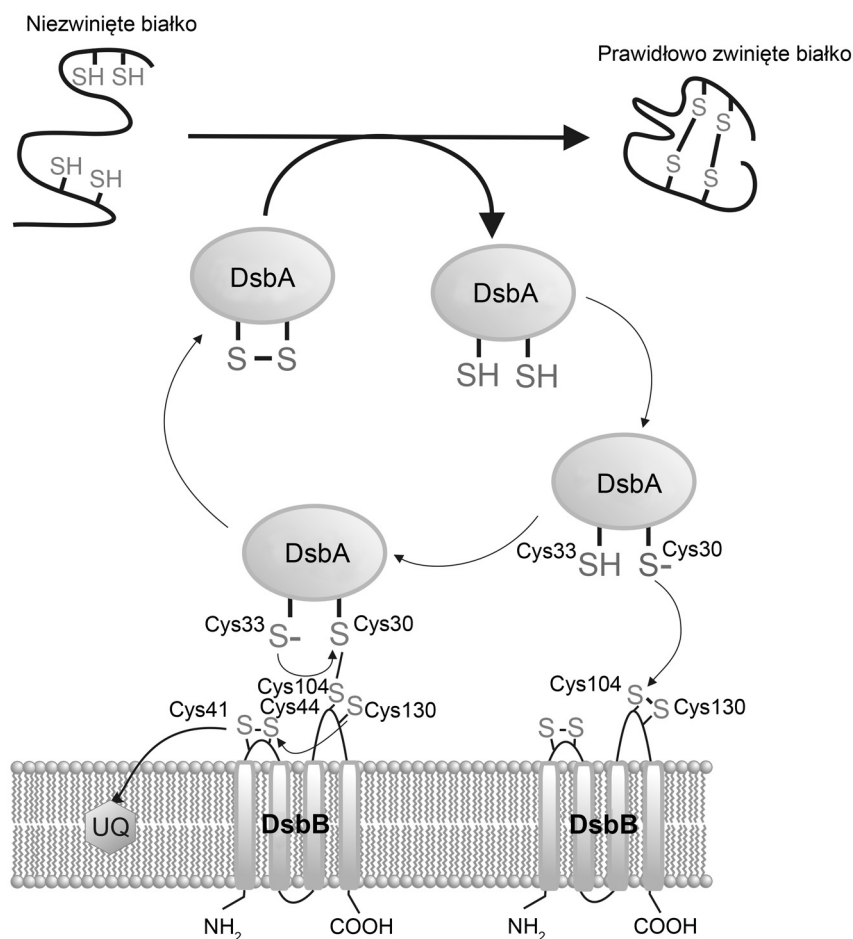
też testy *in vitro* weryfikujące oddziaływania DsbB lub pochodnych od niego peptydów z DsbA. Można przy ich użyciu monitorować proces utleniania DsbA przez DsbB lub zdolność DsbA do utleniania naturalnych lub syntetycznych substratów w obecności DsbB [2, 14–15].

3.6. Struktury białek Dsb

Rozwiązywane struktury białek Dsb (pojedynczo lub w kompleksach z ich partnerami) pozwalają wnikać głęboko w mechanizmy ich wzajemnych interakcji i zrozumieć jak stosunkowo niewielkie różnice w sekwencjach aminokwasowych mogą być odpowiedzialne za istotne zmiany w ich funkcjonowaniu. Jak dotąd, głównie na drodze krystalografii, rozwiązano wiele struktur monomerycznych białek DsbA. Ich porównanie, w połączeniu z analizami cech biochemicznych, pozwoliło na podział białek na dwie klasy i kilka podklas [44]. Rozwiązane zostały także struktury dimerycznych białek Dsb o różnych funkcjach [21, 43, 67] oraz białek biorących udział w przekazywaniu elektronów zarówno z peryplazmy na kompleksy białkowe łańcucha oddechowego, jak i z cytoplazmatycznej tioredoksyny do peryplazmy [28, 60–61, 65, 68].

3.7. Identyfikacja substratów białek Dsb

Istotnym elementem prowadzącym do zrozumienia funkcjonowania sieci Dsb jest identyfikacja substratów białek Dsb, celów działania zarówno tiolowych izomeryzacji jak i oksydazy. Wstępnym etapem badań są przeważnie analizy *in silico*, zidentyfikowanie w proteomach bakteryjnych białek zawierających cysteiny, określenie liczby cystein oraz potencjalnej lokalizacji białka. Udokumentowano, że reszty cysteinowe występują zdecydowanie częściej w białkach cytoplazmatycznych niż pozacytoplazmatycznych. Dodatkowo zdecydowana większość białek pozacytoplazmatycznych posiada parzystą liczbę reszt cysteinowych. Ten trend nazwany został „up and down” co oznacza, że na przykład, liczba białek posiadających dwie reszty cysteinowe zdecydowanie przewyższa liczbę tych posiadających trzy reszty cysteinowe. Tak więc pozacytoplazmatyczna lokalizacja białka z parzystą liczbą cystein wskazuje z dużym prawdopodobieństwem, że w jego strukturze obecne są mostki disiarczkowe [9, 16]. Informacyjne są też analizy modelowania struktur białek, które pozwalają na przewidywanie ułożenia mostków disiarczkowych, odpowiedzi na pytanie czy są tworzone pomiędzy sąsiadującymi czy niesąsiadującymi cysteinami. Dodatkowo w ostatnich latach opracowano kilka metod *in silico*, które z zastosowaniem odpowiednich algorytmów stosowane są do poszukiwań białek zawierających mostki disiarczkowe [41–42, 58]. Pierwsze analizy identyfikacji



Rys. 2. Proces przekazywania elektronów podczas reutlenia białka EcDsbA przez EcDsbB

W pierwszym etapie reakcji następuje atak zlokalizowanej na powierzchni białka DsbA Cys30 na mostek Cys104-Cys130 EcDsbB, co doprowadza do powstania międzycząsteczkowego wiązania pomiędzy DsbA i DsbB (Cys30-Cys104). Zredukowana Cys130 atakuje mostek disiarczkowy w pierwszej pętli peryplazmatycznej (Cys41-Cys44), dochodzi do powstania przejściowego wiązania między Cys41 a Cys130. W następnym etapie następuje związanie ubichinonu (UQ), co doprowadza do dalszego transportu elektronów i odtworzenia struktury zarówno EcDsbA jak i EcDsbB.

jące substraty białek Dsb obejmowały porównawcze badania subproteomów peryplazmatycznych szczepów *Salmonella enterica* i *E. coli* typu dzikiego z odpowiednimi izogenicznymi mutantami w genach *dsb* [1, 24]. Prowadzone w następnych latach badania innych przedziałów komórkowych niż peryplazma wykazały, że wiele białek posiadających mostki disiarczkowe to białka o strukturze beta-baryłek, zlokalizowane w błonie zewnętrznej [33, 40, 54]. W badaniach porównawczej proteomiki szczepów *Pseudomonas aeruginosa* typu dzikiego i mutantu w genie *PadsbA1* użyto preparatu białek peryplazmatycznych wzbogaconych o białka osłon komórkowych, co zaowocowało identyfikacją ponad dwudziestu uprzednio nieopisanych substratów PaDsbA1 [2]. Kompleksy tworzone pomiędzy białkami Dsb a ich substratami są przejściowe i trudne do wykrycia. Zastosowanie odpowiednich mutacji punktowych opóźniających rozwiązanie kompleksów pozwala na identyfikację substratów białek Dsb. Jedną ze stosowanych mutacji jest zamiana C-terminalnej

cysteiny motywu CXXC na serynę (CXXC na CXXS). Wiadomo, że redukcja mostka disiarczkowego rozpoczyna się od ataku nukleofilowego N-terminalnej cysteiny motywu CXXC na jej cel działania (mostek disiarczkowy). Powstałe międzycząsteczkowe wiązanie jest następnie szybko redukowane przez C-terminalną cysteinę. Zamiana tej cysteiny na serynę umożliwia utrwalenie i izolację kompleksów białkowych [11, 13, 40, 50]. Także zamiana proliny (element tzw. pętli cis pro, biorącej udział w wiązaniu zarówno substratu jak i partnera redoks czyli DsbB) na serynę lub treoninę – skutkuje nagromadzeniem kompleksów pomiędzy białkami Dsb a ich partnerem redoks lub substratami. Tę metodykę zastosowano po raz pierwszy do identyfikacji substratów EcDsbA, a ostatnio do identyfikacji substratów nietypowego białka DsbA2 *Legionella pneumophila* o aktywności zarówno oksydazy jak i izomery [29, 31]. Kompleksy białek Dsb z substratami, otrzymane z komórek badanych mikroorganizmów, są oczyszczane metodą chromatografii powinowactwa

i analizowane metodą SDS PAGE (z i bez DTT). Białka uwolnione z kompleksów są najczęściej identyfikowane na drodze spektrometrii mas.

4. Podsumowanie

Opisane w prezentowanym artykule eksperymentalne metody stosowane w analizie białek Dsb przyczyniły się do zrozumienia funkcjonowania potranslacyjnej modyfikacji protein w komórkach wielu gatunków patogennych bakterii oraz wyjaśnienia ich wpływu na procesy wirulencji. Uzyskane dane pozwoliły na zapoczątkowanie badań mających na celu opracowanie metod blokowania tych procesów. Wyniki pierwszych przeprowadzonych eksperymentów wskazują, że białka Dsb będą w przyszłości wykorzystane jako cele działania nowych leków antybakteryjnych.

Podziękowania

Praca była finansowana z funduszy grantu NCN (Opus) 2015/17/B/NZ1/00230.

5. Piśmiennictwo

- Agudo D., Mendoza M.T., Castanares C., Nombela C., Rotger R.: A proteomic approach to study *Salmonella typhi* periplasmic proteins altered by a lack of the DsbA thiol: disulfide isomerase. *Proteomics*, **4**, 355–363 (2004)
- Arts I.S., Ball G., Leverrier P., Garvis S., Nicolaes V., Vertommen D., Ize B., Tamu Dufe V., Messens J., Voulhoux R., Collet J.F.: Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, **4**, e00912–00913 (2013)
- Berkmen M.: Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **82**, 240–251 (2012)
- Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Banaś A.M., Jastrząb K., Pisarczyk K., Kolarzyk A., Łasica A.M., Collet J.-F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Engineering of *Helicobacter pylori* Dimeric Oxidoreductase DsbK (HP0231). *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1158 (2016)
- Chim N., Harmston C.A., Guzman D.J., Goulding C.W.: Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Struct. Biol.* **13**, 23 (2013)
- Cho S.H., Collet J.F.: Many roles of the bacterial envelope reducing pathways. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1690–1698 (2013)
- Cho S.H., Parsonage D., Thurston C., Dutton R.J., Poole L.B., Collet J.F., Beckwith J.: A new family of membrane electron transporters and its substrates, including a new cell envelope peroxiredoxin, reveal a broadened reductive capacity of the oxidative bacterial cell envelope. *mBio*, **3**, e00291–11. (2012)
- Cho S.H., Szewczyk J., Pesavento C., Zietek M., Banzhaf M., Roszczenko P., Asmar A., Laloux G., Hov A.K., Leverrier P., Van der Henst C., Vertommen D., Typas A., Collet J.F.: Detecting envelope stress by monitoring beta-barrel assembly. *Cell*, **159**, 1652–1664 (2014)
- Daniels R., Mellroth P., Bernsel A., Neiers F., Normark S., von Heijne G., Henriques-Normark B.: Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **285**, 3300–3309 (2010)
- Denoncin K., Collet J.F.: Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 63–71 (2013)
- Denoncin K., Vertommen D., Paek E., Collet J.F.: The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential beta-barrel protein LptD. *J. Biol. Chem.* **285**, 29425–29433 (2010)
- Denoncin K., Nicolaes V., Cho S.H., Leverrier P., Collet J.F.: Protein disulfide bond formation in the periplasm: determination of the *in vivo* redox state of cysteine residues. *Methods Mol. Biol.* **966**, 325–336 (2013)
- Depuydt M., Leonard S.E., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K.S., Collet J.F.: A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, **326**, 1109–1111 (2009)
- Duprez W., Bachu P., Stoermer M.J., Tay S., McMahon R.M., Fairlie D.P., Martin J.L.: Virtual Screening of Peptide and Peptidomimetic Fragments Targeted to Inhibit Bacterial Dithiol Oxidase DsbA. *PLoS ONE*, **10**, e0133805 (2015)
- Duprez W., Premkumar L., Halili M.A., Lindahl F., Reid R.C., Fairlie D.P., Martin J.L.: Peptide Inhibitors of the *Escherichia coli* DsbA Oxidative Machinery Essential for Bacterial Virulence. *J. Med. Chem.* **58**, 577–587 (2015)
- Dutton R.J., Boyd D., Berkmen M., Beckwith J.: Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11933–11938 (2008)
- Grabowska A.D., Wywiał E., Dunin-Horkawicz S., Łasica A.M., Wosten M.M., Nagy-Staron A., Godlewska R., Bocian-Ostrzycka K., Pienkowska K., Laniewski P., Bujnicki J.M., van Putten J.P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Functional and bioinformatics analysis of two *Campylobacter jejuni* homologs of the thiol-disulfide oxidoreductase, DsbA. *PLoS ONE*, **9**, e106247 (2014)
- Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U.: A general ribonuclease assay using methylene blue. *Anal. Biochem.* **240**, 24–28 (1996)
- Grimshaw J.P., Stirnimann C.U., Brozzo M.S., Malojcic G., Grutter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **380**, 667–680 (2008)
- Hatahet F., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1402–1414 (2014)
- Heras B., Edeling M.A., Schirra H.J., Raina S., Martin J.L.: Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8876–8881 (2004)
- Heras B., Shouldice S.R., Totsika M., Scanlon M.J., Schembri M.A., Martin J.L.: DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 215–225 (2009)
- Heras B., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Frei P., Robin G., Cemazar M., Thony-Meyer L., Glockshuber R., Martin J.L.: *Staphylococcus aureus* DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding. *J. Biol. Chem.* **283**, 4261–4271 (2008)
- Hiniker A., Bardwell J.C.: *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **279**, 12967–12973 (2004)
- Hiniker A., Collet J.F., Bardwell J.C.: Copper stress causes an *in vivo* requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **280**, 33785–33791 (2005)

26. Hiniker A., Ren G., Heras B., Zheng Y., Laurinec S., Jobson R.W., Stuckey J.A., Martin J.L., Bardwell J.C.: Laboratory evolution of one disulfide isomerase to resemble another. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11670–11675 (2007)
27. Inaba K., Ito K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 520–529 (2008)
28. Inaba K., Murakami S., Suzuki M., Nakagawa A., Yamashita E., Okada K., Ito K.: Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789–801 (2006)
29. Jameson-Lee M., Garduno R.A., Hoffman P.S.: DsbA2 (27 kDa Com1-like protein) of *Legionella pneumophila* catalyses extra-cytoplasmic disulphide-bond formation in proteins including the Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **80**, 835–852 (2011)
30. Kadokura H., Katzen F., Beckwith J.: Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 111–135 (2003)
31. Kadokura H., Tian H., Zander T., Bardwell J.C., Beckwith J.: Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*, **303**, 534–537 (2004)
32. Katzen F., Deshmukh M., Daldal F., Beckwith J.: Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the trans-membrane electron transporter DsbD. *EMBO J.* **21**, 3960–3969 (2002)
33. Koniger V., Holsten L., Harrison U., Busch B., Loell E., Zhao Q., Bonsor D.A., Roth A., Kengmo-Tchoupa A., Smith S.I., Mueller S., Sundberg E.J., Zimmermann W., Fischer W., Hauck C.R., Haas R.: *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat. Microbiol.* **2**, 16188 (2016)
34. Kpadeh Z.Z., Day S.R., Mills B.W., Hoffman P.S.: *Legionella pneumophila* utilizes a single-player disulfide-bond oxidoreductase system to manage disulfide bond formation and isomerization. *Mol. Microbiol.* **95**, 1054–1069 (2015)
35. Kpadeh Z.Z., Jameson-Lee M., Yeh A.J., Chertihin O., Shumilin I.A., Dey R., Day S.R., Hoffman P.S.: Disulfide bond oxidoreductase DsbA2 of *Legionella pneumophila* exhibits protein disulfide isomerase activity. *J. Bacteriol.* **195**, 1825–1833 (2013)
36. Kurz M., Iturbe-Ormaetxe I., Jarrott R., Cowieson N., Robin G., Jones A., King G.J., Frei P., Glockshuber R., O'Neill S.L., Heras B., Martin J.L.: Cloning, expression, purification and characterization of a DsbA-like protein from *Wolbachia pipientis*. *Protein Expr. Purif.* **59**, 266–273 (2008)
37. Lafaye C., Iwema T., Carpentier P., Jullian-Binard C., Kroll J.S., Collet J.F., Serre L.: Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **392**, 952–966 (2009)
38. Lasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 626–636 (2007)
39. Lasica A.M., Wyszynska A., Szymanek K., Majewski P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Campylobacter* protein oxidation influences epithelial cell invasion or intracellular survival as well as intestinal tract colonization in chickens. *J. Appl. Genet.* **51**, 383–393 (2010)
40. Leverrier P., Declercq J.P., Denoncin K., Vertommen D., Hiniker A., Cho S.H., Collet J.F.: Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **286**, 16734–16742 (2011)
41. Lin H.H., Tseng L.Y.: DBCP: a web server for disulfide bonding connectivity pattern prediction without the prior knowledge of the bonding state of cysteines. *Nucleic Acids Res.* **38**, W503–507 (2010)
42. Marquez-Chamorro A.E., Aguilar-Ruiz J.S.: Soft Computing Methods for Disulfide Connectivity Prediction. *Evol. Bioinform. Online*, **11**, 223–229 (2015)
43. McCarthy A.A., Haebel P.W., Torronen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P.: Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 196–199 (2000)
44. McMahon R.M., Premkumar L., Martin J.L.: Four structural subclasses of the antivirulence drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*. **1844**, 1391–1401 (2014)
45. Messens J., Collet J.F.: Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1050–1062 (2006)
46. Messens J., Collet J.F., Van Belle K., Brosens E., Loris R., Wyns L.: The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J. Biol. Chem.* **282**, 31302–31307 (2007)
47. Premkumar L., Heras B., Duprez W., Walden P., Halili M., Kurth F., Fairlie D.P., Martin J.L.: Rv2969c, essential for optimal growth in *Mycobacterium tuberculosis*, is a DsbA-like enzyme that interacts with VKOR-derived peptides and has atypical features of DsbA-like disulfide oxidases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1981–1994 (2013)
48. Quan S., Schneider I., Pan J., Von Hacht A., Bardwell J.C.: The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem.* **282**, 28823–28833 (2007)
49. Raines R.T.: Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**, 1045–1066 (1998)
50. Ren G., Champion M.M., Huntley J.F.: Identification of disulfide bond isomerase substrates reveals bacterial virulence factors. *Mol. Microbiol.* **94**, 926–944 (2014)
51. Ren G., Stephan D., Xu Z., Zheng Y., Tang D., Harrison R.S., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Hiniker A., Martin J.L., Heras B., Bardwell J.C.: Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* **284**, 10150–10159 (2009)
52. Roszczenko P., Radomska K.A., Wywiał E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: A novel insight into the oxidoreductase activity of *Helicobacter pylori* HP0231 protein. *PLoS ONE*, **7**, e46563 (2012)
53. Roszczenko P., Grzeszczuk M., Kobierecka P., Wywiał E., Urbanowicz P., Wincek P., Nowak E., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* HP0377, a member of the Dsb family, is an untypical multifunctional CcmG that cooperates with dimeric thioldisulfide oxidase HP0231. *BMC Microbiol.* **15**, 135 (2015)
54. Ruiz N., Chng S.S., Hiniker A., Kahne D., Silhavy T.J.: Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12245–12250 (2010)
55. Ruoppolo M., Torella C., Kanda F., Panico M., Pucci P., Marino G., Morris H.R.: Identification of disulphide bonds in the refolding of bovine pancreatic RNase A. *Fold. Des.* **1**, 381–390 (1996)
56. Segatori L., Paukstelis P.J., Gilbert H.F., Georgiou G.: Engineered DsbC chimeras catalyze both protein oxidation and disulfide-bond isomerization in *Escherichia coli*: Reconciling two competing pathways. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10018–10023 (2004)
57. Shouldice S.R., Heras B., Walden P.M., Totsika M., Schembri M.A., Martin J.L.: Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1729–1760 (2011)
58. Singh R.: A review of algorithmic techniques for disulfide-bond determination. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **7**, 157–172 (2008)
59. Sinha S., Langford P.R., Kroll J.S.: Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000 (2004)

60. Stirnimann C.U., Grutter M.G., Glockshuber R., Capitani G.: nDsbD: a redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1642–1648 (2006)
61. Stirnimann C.U., Rozhkova A., Grauschopf U., Bockmann R.A., Glockshuber R., Capitani G., Grutter M.G.: High-resolution structures of *Escherichia coli* cDsbD in different redox states: A combined crystallographic, biochemical and computational study. *J. Mol. Biol.* **358**, 829–845 (2006)
62. Tinsley C.R., Voulhoux R., Beretti J.L., Tommassen J., Nassif X.: Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J. Biol. Chem.* **279**, 27078–27087 (2004)
63. Wang X., Dutton R.J., Beckwith J., Boyd D.: Membrane topology and mutational analysis of *Mycobacterium tuberculosis* VKOR, a protein involved in disulfide bond formation and a homologue of human vitamin K epoxide reductase. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1413–1420 (2011)
64. Watanabe M.M., Laurindo F.R., Fernandes D.C.: Methods of measuring protein disulfide isomerase activity: a critical overview. *Frontiers in chemistry.* **2**, 73 (2014)
65. Williamson J.A., Cho S.H., Ye J., Collet J.F., Beckwith J.R., Chou J.J.: Structure and multistate function of the transmembrane electron transporter CcdA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 809–814 (2015)
66. Wunderlich M., Glockshuber R.: Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**, 717–726 (1993)
67. Yoon J.Y., Kim J., Lee S.J., Kim H.S., Im H.N., Yoon H.J., Kim K.H., Kim S.J., Han B.W., Suh S.W.: Structural and functional characterization of *Helicobacter pylori* DsbG. *FEBS Lett.* **585**, 3862–3867 (2011)
68. Zhou Y., Cierpicki T., Jimenez R.H., Lukasik S.M., Ellena J.F., Cafiso D.S., Kadokura H., Beckwith J., Bushweller J.H.: NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation. *Mol. Cell.* **31**, 896–908 (2008)