

Katarzyna Golec^{1*}, Radosław Stachowiak¹, Katarzyna Jopek¹, Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii,
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 00-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w grudniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Systemy sekrecyjne bakterii Gram-dodatnich. 3. Ogólna charakterystyka transportu białek u *B. subtilis*. 4. System sekrecji Sec. 4.1. Peptydy sygnałowe. 4.2. Wewnątrzkomórkowe chaperony. 4.3. Kompleks sekrecyjny Sec. 5. System sekrecji Tat. 6. System sekrecji Com. 7. System sekrecji ABC. 8. Czynniki wspomagające zwijanie transportowanych białek. 9. Proteazy kontrolne. 10. Sekrecja białek heterologicznych w *B. subtilis*. 11. Podsumowanie

Secretin systems in *Bacillus subtilis*

Abstract: *B. subtilis* is a Gram-positive bacterium which has an enormous ability to effectively secrete extracellular proteins directly to the culture medium. Given its physiological and genetic characteristics, it has been used as a model organism to study secretion pathways. Most of the proteins targeted outside the bacterial cell are exported via Sec pathway. Consequently, Tat, Com and ABC systems play a minor role in the protein export. In most cases the presence of a signal peptide in the target protein is obligatory to allow transport and its structure influences protein sorting in a cell. Numerous approaches were taken to eliminate limiting factors such as control proteases or instability of some regions of the genome, resulting in the construction of strains heterologously producing industrial enzymes or acting as a delivery tool for many antigens.

1. Introduction. 2. Secretion systems in Gram-positive bacteria. 3. General characteristics of protein transport in *B. subtilis*. 4. Sec pathway. 4.1. Signal peptides. 4.2. Intracellular chaperones. 4.3. Sec secretion complex. 5. Tat pathway. 6. Com pathway. 7. ABC pathway. 8. Factors supporting the folding of transported proteins. 9. Control proteases. 10. Heterologous protein secretion in *B. subtilis*. 11. Summary

Słowa kluczowe: *Bacillus subtilis*, peptydy sygnałowe, sekrecja, systemy sekrecyjne

Key words: *Bacillus subtilis*, secretion, secretion systems, signal peptides

1. Wstęp

Bacillus subtilis, jeden z najdokładniej przebadanych mikroorganizmów, jest traktowany jako modelowy przedstawiciel bakterii Gram-dodatnich. Jest pałeczką izolowaną ze środowiska glebowego lub z wody, która dzięki zdolności do sporulacji może przeżyć w bardzo restrykcyjnych warunkach. Powszechnie wykorzystuje się ją w produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów, witamin oraz innych komponentów na skalę przemysłową, co przyczynia się do poszerzania wiedzy na temat zachodzących w niej procesów biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych.

B. subtilis jest historycznie zakwalifikowany jako bakteria obligatoryjnie tlenowa, jednak istnieją badania dowodzące, że jest zdolna do wzrostu także w warunkach anaerobowych, wykorzystując azotany lub azotyny jako końcowe akceptory elektronów [37]. Komórki *B. subtilis* mają zdolność ruchu po powierzchniach stałych określaną jako „swarming motility”, charakteryzującą się jednoczesnym przesuwanym się organizmów tworzących populację bakteryjną po powierzchniach [28].

Genom *B. subtilis* jest pierwszym w pełni zsekwencjonowanym genomem glebowej bakterii Gram-dodat-

niej [31]. Ma on wielkość 4,2 Mbp oraz niską zawartość par G+C. 53% genów kodujących białka to geny obecne w genomie w 1 kopii, natomiast 25% to geny należące do różnych rodzin, które rozprzestrzeniły się poprzez duplikację. Spośród 4100 genów kodowanych przez bakterię, tylko 192 są niezbędne do przeżycia – połowa z nich bierze udział w obróbce informacji, a reszta w syntezie osłon komórkowych, determinacji kształtu komórki, procesach podziałowych oraz energetycznych [30].

2. Systemy sekrecyjne bakterii Gram-dodatnich

Bakteryjne białka wydzielane na zewnątrz komórki pełnią wiele istotnych funkcji, do których można zaliczyć udział w pozyskiwaniu składników odżywczych, komunikację międzykomórkową, usuwanie związków toksycznych w środowisku czy też eliminację potencjalnych konkurentów [46]. W przypadku bakterii wirulentnych, wydzielane pozakomórkowo białka są głównymi determinantami wirulencji [43].

Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich determinuje odmienne sposoby transportu białek niż w przypadku bakterii Gram-ujemnych, które

* Autor korespondencyjny Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. (22) 5541 312; e-mail: kgolec@biol.uw.edu.pl

posiadają błonę zewnętrzną oraz cytoplazmatyczną. W tym aspekcie wyróżnia się 6 systemów sekrecyjnych:

- ścieżka Sec (Secretion),
- ścieżka Tat (Twin-arginine translocation),
- FEA (Flagella Export Apparatus),
- FPE (Fimbrin-Protein Exporter),
- holiny,
- ścieżka Wss.

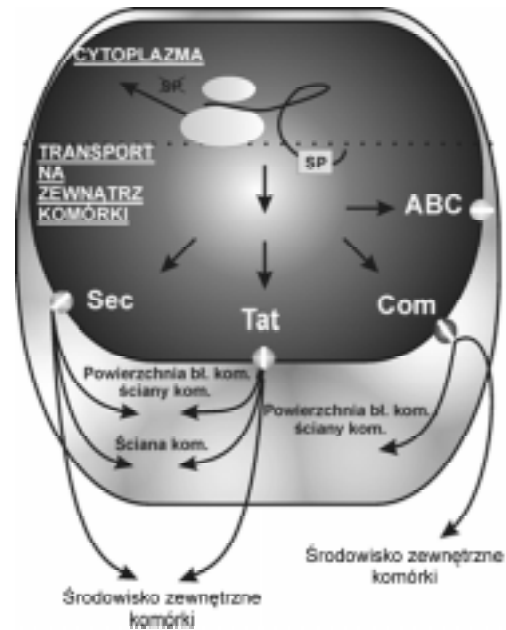
Do sposobów sekrecji można także zaliczyć rodzinę MscL (Large conductance Mechanosensitive ion channel) oraz aparat Tad (Tight adherence), pomimo że nie ma jeszcze dowodów eksperymentalnych potwierdzających ich występowanie [12].

Aby białka bakterii Gram-dodatnich mogły być przetransportowane na zewnątrz błony cytoplazmatycznej, są one zazwyczaj syntetyzowane jako prekursorzy posiadające peptyd sygnałowy (SP) rozpoznawany przez rozpuszczalne czynniki kierujące do kanału transportowego, odcinany w trakcie transportu [38]. Uwolnione białko związa się do swojej struktury natywnej, o ile nie ulega sekrecji w formie zwiniętej [46]. Środowisko po stronie zewnętrznej błony komórkowej zawiera duże stężenia jonów naładowanych ujemnie, neutralizowanych przez dwuwartościowe kationy tj. Ca^{2+} , Mg^{2+} czy Fe^{2+} , co wyzwała proces zwijania [5]. Ważnym czynnikiem warunkującym prawidłowy przebieg procesu transportu jest brak powstawania agregatów białkowych podczas zwijania, mogących blokować podziały komórkowe i prowadzących do śmierci komórki. Szybko następujące zwijanie, ułatwione przez obecność chaperonów i innych czynników wspomagających (propeptydów, izomeraz i jonów metali) chroni przed agregacją.

3. Ogólna charakterystyka transportu białek u *B. subtilis*

Większość informacji dotyczących transportu u bakterii Gram-dodatnich opiera się na badaniach *B. subtilis*. Dzieje się tak wskutek znajomości całkowitej sekwencji genomu tej bakterii i badań, które pozwoliły na określenie funkcji większości genów z wykorzystaniem prawie 3000 mutantów insercyjnych [30]. Bardzo istotna jest tutaj zdolność *B. subtilis* do produkcji enzymów wykorzystywanych w przemyśle, takich jak proteazy czy α -amylazy, które są bardzo wydajnie wydzielane bezpośrednio do podłoża hodowlanego [17]. Pomimo to, specyfika ścieżki sekrecyjnej, budowa osłon komórkowych oraz obecność proteaz kontrolnych uniemożliwiają uzyskanie produkcji białek heterologicznych na wysokim poziomie.

Białka powstające w wyniku translacji mRNA są sortowane do różnych rejonów komórki w zależności od obecności peptydu sygnałowego w aminokwasowej



Rys. 1. Ścieżki transportu białek u *B. subtilis*

sekwencji preproteiny. Niektóre z nich pozostają na powierzchni błony lub ściany komórkowej, co jest analogiczne do przetransportowywania białek do peryplazmy bakterii Gram-ujemnych. Elementami kotwiczącymi w błonie są segment transmembranowy (TM, transmembrane) lub modyfikacja lipidowa wprowadzana przez transferazę diacyloglicerolową Lgt, czyli tzw. „lipobox”. Natomiast białka kotwiczone w ścianie charakteryzują się obecnością C-końcowych powtórzeń wiążących o dużym powinowactwie do składników peptydoglikanu.

Transport białek odbywa się głównie na drodze Sec lub Tat. Specjalne klasy białek stanowią pseudopiliny uczestniczące w pobieraniu egzogenego DNA, eksportowane na drodze Com, a także bakteriocyny i feromony wydzielane dzięki transporterom ABC (Rys. 1) [47].

4. System sekrecji Sec

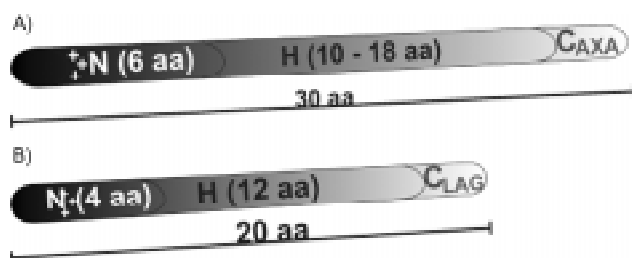
Większość białek przeznaczonych do sekrecji na zewnątrz komórki wydzielanych jest za pomocą systemu sekrecji Sec. Jest on niezbędny do przeżycia bakterii, a jego cechą charakterystyczną jest to, że białka transportowane są w formie niezwinętej. Analiza proteomiczna sekretomu *B. subtilis* dowiodła, że wśród 300 potencjalnych białek eksportowych 135 posiada sekwencje sygnałowe kierujące do transportu na ścieżce Sec [46].

4.1. Peptydy sygnałowe

System Sec bierze udział w transporcie substratów 2 typów: białek i lipoprotein. W obu przypadkach peptydy sygnałowe posiadają jednakową organizację struk-

turalną – dodatnio naładowany N-koniec (N), hydrofobowy rdzeń (H) oraz region cięcia (C) rozpoznawany przez peptydazy sygnałowe (SP-azy). Region N posiada z reguły 2 lub 3 reszty lizyny (L) lub argininy (R) i odpowiedzialny jest za oddziaływanie z aparatem sekrecyjnym (1) oraz z ujemnie naładowanymi fosfolipidami w dwuwarstwie lipidowej podczas przekraczania błony komórkowej [13]. Region H w większości białek zawiera resztę załamującą helisę (głównie glicynę lub prolinę), które umożliwiają utworzenie struktury spinki do włosów i w konsekwencji insercję do błony komórkowej. Domena C-końcowa niesie natomiast sekwencję, która jest nacinana przez peptydazę sygnałową. W zależności od typu działającego enzymu, różny jest konsensus rozpoznawanej sekwencji oraz długość peptydu. Peptydazy sygnałowe typu I, do których u *B. subtilis* zaliczamy 5 białek (SipS, T, U, V, W), rozpoznają sekwencje o długości ok. 30 aminokwasów z sekwencją konsensusową cięcia AXA [17]. Obecność kilku typów SP-az jest charakterystyczna dla *B. subtilis* i odróżnia go od innych bakterii, archeonów oraz retikulum endoplazmatycznego drożdży. SipS i T są głównymi SP-azami i obecność jednej z nich jest niezbędna do przeżycia. Pozostałe mają zachodzące i dające się zastępować funkcje [3]. Lipoproteiny posiadają krótsze regiony N i H oraz inny konsensus sekwencji „Lipobox” ciętej przez peptydazę [44] (Rys. 2). Lipoproteiny są przecinane przez SP-azę typu II, LspA, która rozpoznaje sekwencję o konsensusie LAG. Niezmienna w regionie „Lipobox” cysteina jest celem modyfikacji lipidowej i pierwszą resztą dojrzalej lipoproteiny po przecięciu przez SP-azę II.

Wewnątrzkomórkowe kierowanie białek do transportu i ich obróbka nie zależy jedynie od obecności sekwencji sygnałowej, ale również od tego, czy preproteina będzie utrzymana w stanie kompetencji sekrecyjnej, zależącej m.in. od tego, czy białko będzie posiadało konformację rozwiniętą. Białka, które w dużej mierze znajdują się w strukturze III-rzędowej nie ulegają wydzielaniu. Znane są 23 białka *B. subtilis* nie



Rys. 2. Organizacja strukturalna peptydów sygnałowych systemu Sec u *B. subtilis*.

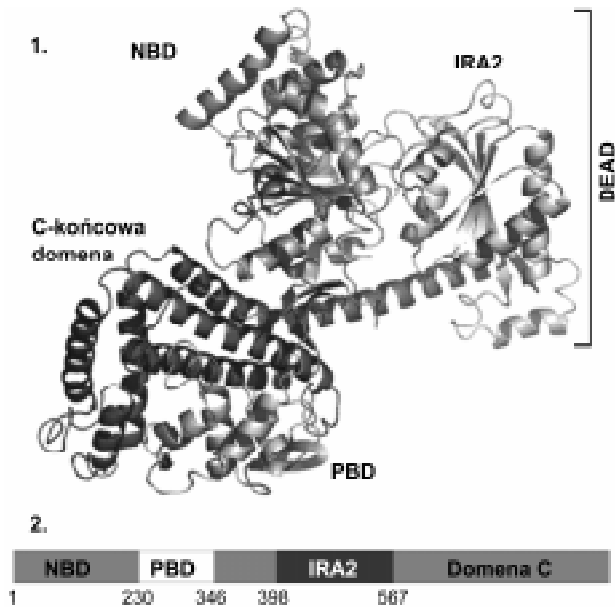
Regiony N, H i C wyróżnione są poprzez cieniowanie, a ich długości (liczba reszt aminokwasowych) podane są w nawiasach. A. Peptyd sygnałowy białka cięty przez peptydazę sygnałową typu I. B. Peptyd sygnałowy lipoproteiny odcinany przez peptydazę sygnałową typu II.

posiadające typowych peptydów sygnałowych, a które odnajdywane są w podłożu hodowlanym. Istnieją 3 potencjalne drogi ich eksportu: poprzez holiny kodowane przez profagi tworzące pory w błonie komórkowej, poprzez aparat biorący udział w tworzeniu rzęski (flagellina Hag oraz 2 białka związane z hakiem) oraz dzięki lizie komórkowej [46].

4.2. Wewnątrzkomórkowe chaperony

Za utrzymanie białek zależnych od ścieżki Sec w stanie kompetencji sekrecyjnej odpowiedzialne są wewnątrzkomórkowe chaperony. Podobnie jak inne bakterie Gram-dodatnie, *B. subtilis* posiada cząsteczkę SRP oraz białko SecA, które biorą udział w tym procesie. Brak jest tu homologa SecB, który uzupełnia funkcje SecA u *E. coli* [52]. SRP jest kompleksem rybonukleoproteinowym, który oddziałuje z hydrofobowymi regionami preproteiny i dostarcza je do kanału sekrecyjnego znajdującego się w błonie komórkowej. W skład cząsteczki wchodzi małe cytoplazmatyczne RNA (scRNA, small cytoplasmic RNA) stanowiące rdzeń oraz 2 białka: Ffh o aktywności GTP-azy i histonopodobne HBSu. SRP wiąże kotranslacyjnie preproteinę zawierającą peptyd sygnałowy i dostarcza ją do receptora SRP (SR) zakotwiczonego w błonie (białko FtsY). Obecność związanego GTP umożliwia oddziaływanie SRP-SR ze sobą poprzez motywy GTP-azowe oraz przekazanie łańcucha polipeptydowego do kanału, przez który odbywa się transport. Przekazanie to indukuje hydrolizę GTP, kompleks SRP-SR rozpada się, a jego uwolnione składowe mogą przystąpić do kolejnych rund kierowania białek do transportu. 4,5 S RNA wchodzące w skład SRP katalizuje reakcję oddziaływania między białkami Ffh i FtsY oraz wzmacnia aktywność GTP-azową kompleksu Ffh-FtsY. Moduluje ono aktywność białka Ffh dzięki zmianie konformacji w domenie M wiążącej sekwencję sygnałową oraz linkerze NG, który z kolei bierze udział w oddziaływaniu z cząsteczką SR [8]. Transport białek z różnymi sekwencjami sygnałowymi w różnym stopniu zależy od Ffh czy FtsY, a eliminacja jednego z nich powoduje zahamowanie sekrecji na różnych poziomach w zależności od typu białka [52]. Duża hydrofobowość peptydów sygnałowych preproteiny bakterii Gram-dodatnich, a także nieobecność homologa SecB sprawia, że SRP odgrywa kluczową rolę w sekrecji.

Funkcję chaperonu wewnątrzkomórkowego pełni również białko SecA o masie cząsteczkowej 204 kDa i długości łańcucha 801 aminokwasów. Jest ono składnikiem kompleksu sekrecyjnego i katalizuje transport preproteiny na zewnątrz komórki bakteryjnej. Jest to helikaza RNA z nadrodziny 2, w obrębie której znajduje się struktura DEAD o aktywności ATP-azowej stanowiącą rdzeń białka. Zawiera ona 9 motywów



Rys. 3. Budowa białka SecA. 1. Model przestrzenny białka SecA *B. subtilis* (1M6N.pdb).

Domeny NBD, IRA 2, PBD oraz C-końcowa zostały zróżnicowane kolorystycznie. 2. Schemat liniowy białka SecA z zaznaczonymi numerami pierwszych aminokwasów danej domeny.

charakterystycznych dla nadrodziny 2 i obejmuje 2 domeny – domenę NBD wiążącą nukleotydy, która ma strukturę nieciągłą (1–220 i 378–420 aa) oraz IRA2 regulującą aktywność domeny ATP-azowej (421–610 aa).

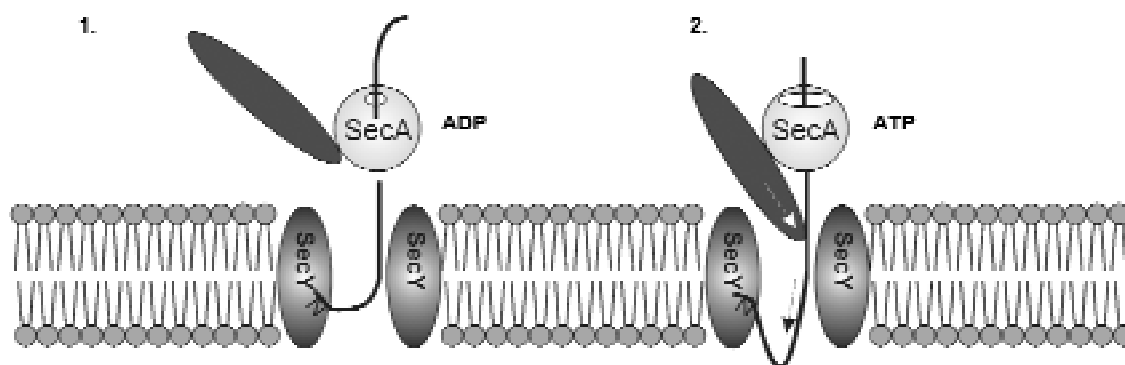
Motor DEAD nabiera specyficzności dla różnych procesów katalitycznych dzięki dodatkowym motywom strukturalnym obecnym w białku. Jeden z nich jest przyłączony do C-końca domeny IRA2 (611–832 aa) i reguluje jej mobilność poprzez jej spinanie z NBD. Drugi z motywów tworzy niezależną domenę strukturalną na odcinku od 221 do 377 aminokwasu. Ma on formę główki („bulb”) połączonej z NBD poprzez pętlę („stem”) uformowaną z 2 antyrównoległych β -katek (odpowiednio $\beta 1$ i $\beta 7$; Stem_{out} i Stem_{in}). Pętla jest fizycznie zakorzeniona w NBD bez naruszania jej integralności, a część wystająca na zewnątrz okala części domeny C-końcowej [40]. W skład domeny C-terminalnej wchodzi również mniejsze jednostki strukturalne, wśród których wyróżnia się długą α -helikalną domenę SD stanowiącą rusztowanie (scaffold domain, HSD), strukturę spinki do włosów IRA1, domenę WD (winged domain, HWD) oraz elastyczny region o nieznanym organizację krystalograficznej [15]. Strukturę białka SecA przedstawia Rys. 3.

Białko SecA umożliwia sekrecję preproteiny na zewnątrz komórki bakteryjnej dzięki cyklom hydrolizy ATP. Dostarczają one dużych porcji energii niezbędnych do znacznych zmian konformacyjnych, które umożliwiają otwieranie kanału sekrecyjnego i eksport białek. Rozpuszczalna forma cytoplazmatyczna białka SecA ma wysokie powinowactwo do ATP oraz bardzo

niskie tempo uwalniania ADP, przez co nie jest zdolna do wiązania preproteiny w miejscu PBD. Inhibitorem aktywności ATP-azowej są tu jony Mg^{2+} . Interakcja między białkiem SecA z błoną komórkową powoduje niskie powinowactwo do ATP, a ADP nadal jest uwalnianie w niewielkim stopniu, jednakże zachodząca na niskim poziomie hydroliza indukuje zmiany konformacyjne między SecA a białkami kompleksu SecYEG. Dopiero związanie preproteiny przez SecA wyzwała wielokrotne cykle hydrolizy ATP, co prowadzi do przetransportowania substratu białkowego do środowiska zewnątrzkomórkowego [42].

Specyficzna interakcja pomiędzy białkiem SecA a sekwencją sygnałową preproteiny jest czynnikiem umożliwiającym oddzielenie białek sekrecyjnych od tych, które pozostaną wewnątrz komórki bakteryjnej. Białko chaperonowe systemu Sec posiada zdolność rozróżniania setek różnych peptydów sygnałowych, dla których nie można wyodrębnić sekwencji zgodnej z konsensusem. Badania z użyciem znakowania izotopami oraz wykorzystanie metody NMR dowiodło, że propeptydy formują strukturę α -helikalną, która wiąże się z elastyczną i wydłużoną bruzdą białka SecA za pomocą regionów o charakterze hydrofobowym oraz naładowanym [15]. Odmienne sekwencje sygnałowe powodują bardzo podobne zmiany w organizacji chemicznej aminokwasów wchodzących w skład bruzdy SecA, co sugeruje, że struktura ta jest odpowiedzialna za rozpoznawanie substratów transportowych. Rowek ten tworzony jest na powierzchni powstającej na powierzchni 2 domen: PBD i IRA1. Rejon wiążący preproteinę u *B. subtilis* powstaje pomiędzy subdomenami PPXD (preprotein crosslinking domain) oraz domenami HWD i HSD znajdującymi się w C-końcu białka [11].

Mechanizm przekazania preproteiny z białka SecA do kanału transportowego jest nie do końca wyjaśniony, pomimo znajomości struktur krystalograficznych poszczególnych domen. Białko SecA w pośrednim stanie hydrolizy ATP i wiążące preproteinę łączy się prawdopodobnie z jedną niebiorącą udziału w sekrecji cząsteczką SecY kanału transportowego, a następnie przemieszcza łańcuch polipeptydowy z wykorzystaniem sąsiedniego białka SecY [39]. Do procesu sekrecji niezbędne są duże zmiany konformacyjne w chaperonie SecA, w wyniku których domena wiążąca preproteinę kontaktuje się z równocześnie z domenami NBD1 i NBD2, a powierzchnia powstała w wyniku tego oddziaływania idealnie dopasowana jest do bocznego wejścia do kanału sekrecyjnego. W transporcie decydującą rolę odgrywa struktura palca utworzonego przez 2 helisy SecA, którego koniec porusza się w górę i w dół kanału w trakcie cyklu hydrolizy ATP, wypychającego polipeptyd do wnętrza [53]. Model sekrecji obrazuje Rys. 4.



Rys. 4. Model sekrecji przeprowadzanej przez białko SecA.

1. Zamknięta struktura białka SecA uczestniczy w interkalacji peptydu sygnałowego białka do kanału tworzonego przez białka SecY.
2. Hydroliza ATP powoduje, że kłama SecA przybiera formę otwartą i oddysocjuje od polipeptydu, umożliwiając interakcję helikalnego palca z białkiem, co prowadzi do przemieszczania białka do wewnątrz kanału sekrecyjnego.

4.3. Kompleks sekrecyjny Sec

Kompleks sekrecyjny systemu Sec *B. subtilis* wykazuje duże podobieństwo do jego odpowiednika u *E. coli*. Kanał transportowy tworzony jest przez 3 białka: SecY, SecE i SecG, które stanowią rdzeń heterotrimerycznego kanału, który oddziałuje z białkiem SecA. Białka SecY i SecE są niezbędne do przeżycia, natomiast mutacje w genie *secG* prowadzą do wytworzenia fenotypu termowrażliwego [48]. Pierścień łączy się po stronie zewnętrznej błony cytoplazmatycznej z innym heterotrimerycznym kompleksem, w skład którego wchodzi białko SecDF będące fuzją białek SecD i SecF *E. coli* oraz białko YrbF. Jego funkcja nie jest do końca poznana, lecz może on brać udział w późniejszych etapach wydzielania – istnieją sugestie, że SecD uczestniczy w odcinaniu przetransportowanego polipeptydu. Inne możliwe funkcje to odcinanie peptydów sygnałowych od kanałów kompleksu Sec, a także regulacja formowania kanałów transportowych [11]. Związanie się ATP z białkiem SecA prowadzi do sieci insercji C-końca do wewnątrz kanału SecYEG, a następnie do wprowadzenia krótkiego odcinka preproteiny. Hydroliza ATP powoduje uwolnienie preproteiny oraz oddysocjowanie SecA, a dalszy transport jest uwarunkowany powtórzonymi cyklami hydrolizy ATP, o czym wspomniano już wcześniej [46]. Transportowi białek towarzyszy także proces odcinania peptydów sygnałowych. Jest on przeprowadzany przez peptydazy sygnałowe (SP-azy) typu I i II, związane z błoną cytoplazmatyczną. Peptydy sygnałowe są odcinane, kiedy C-koniec transportowanego białka pojawi się po stronie zewnątrzkomórkowej błony.

5. System sekrecji Tat

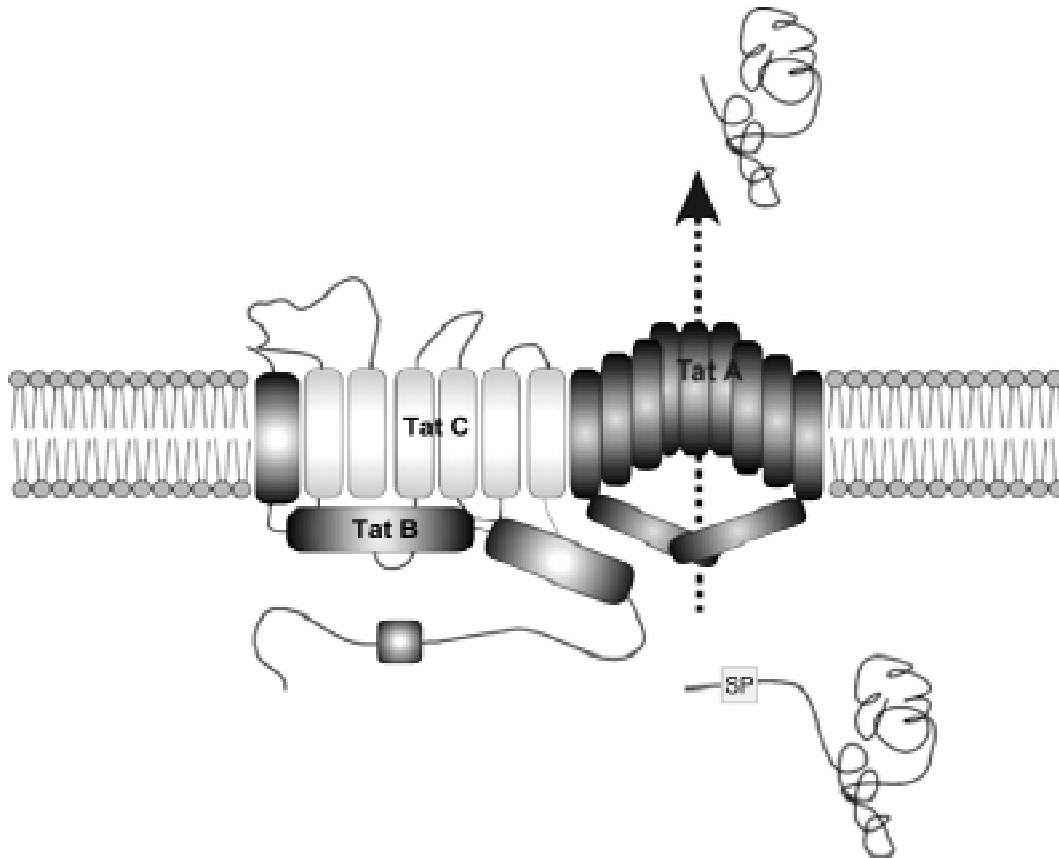
System sekrecji Tat w odróżnieniu od systemu Sec służy do przetransportowywania z komórki białek o strukturze natywnej, zwiniętej. Aby białko zostało

skierowane na tę drogę sekrecji, musi posiadać peptyd sygnałowy rozpoznawany przez specyficzne chaperony. Peptydy sygnałowe Tat są z reguły dłuższe (ok. 37 aminokwasów) i mniej hydrofobowe niż ich odpowiedniki w substratach systemu Sec. U *E. coli* i innych bakterii Gram-ujemnych charakterystyczne jest występowanie motywu 2 arginin RR/RK (twin-arginine motif) pomiędzy regionami N i H [32]. Struktura peptydu sygnałowego została przedstawiona na rys. 5. J o n g b l o e d i wsp. [26] sugerują, że u bakterii Gram-dodatnich, w tym u *B. subtilis*, motyw ten jest mniej przydatny w poszukiwaniu substratów transportowych ścieżki Tat i że kryteria wyznaczania ich muszą być zmienione ze względu na selektywność systemu.

Składnikami maszyny sekrecyjnej są białka TatA, TatB, TatC oraz TatE, spośród których TatA, TatB i TatE są strukturalnie podobne do siebie. TatA i TatE mogą być używane zamiennie, w związku z czym obecność jednego z nich oraz TatB i TatC jest niezbędna, aby białko mogło ulec sekrecji. W odróżnieniu od *E. coli* czy większości pozostałych bakterii, *B. subtilis* posiada dwa geny *tatC*, oznaczane jako *tatCd* i *tatCy*. Powyżej nich leży odpowiednio gen *tatAd* lub *tatAy*. Trzeci gen *tatAc* nie jest genetycznie spokrewniony z pozostałymi. Spośród 14 wydzielanych pozakomórkowo białek *B. subtilis* posiadających motyw RR/KR zidentyfikowanych za pomocą techniki spektrometrii masowej MALDI-TOF, udowodniono że tylko 1 białko PhoD jest całkowicie zależne od systemu transportu Tat

Rys. 5. Organizacja strukturalna peptydów sygnałowych systemu Sec u *B. subtilis*

Regiony N, H i C wyróżnione są poprzez cieniowanie, a ich długości (liczba reszt aminokwasowych) podane są w nawiasach. W obrębie regionu N 2 reszty argininowe oznaczone zostały symbolem „RR”.



Rys. 6. Model struktury translokonu Tat. Białka TatA, TatB i TatC zostały oznaczone odmiennym cieniowaniem. TatB oddziałuje z peptydem sygnałowym preproteiny, co prowadzi do sekrecji.

[26]. Trzy z pozostałych 13 (LipA, WapA i YoaA) transportowane są dzięki ścieżce sekrecji Sec, o czym świadczy zablokowanie eksportu przy zastosowaniu azydku sodu [26]. Nowsze badania dowiodły istnienia jeszcze jednego substratu Tat u *B. subtilis*, którym jest YwbN [27].

Kompleks sekrecyjny Tat zbudowany jest z białek TatA, TatB i TatC. Największym i najbardziej konserwowanym genetycznie składnikiem jest TatC, które u *E. coli* posiada 6 domen transmembranowych oraz C-koniec i N-koniec wystający do części cytoplazmatycznej komórki bakteryjnej. Służy ono jako region inicjujący oddziaływanie z peptydem sygnałowym proteiny. Białko TatB posiada N-końcowy motyw transmembranowy, za którym znajduje się motyw zawiasowy prowadzący do helikalnego regionu mogącego układać się wzdłuż błony komórkowej od strony cytoplazmy. TatB oddziałuje z całą długością peptydu sygnałowego i prawdopodobnie pośredniczy w interakcji między substratem a TatA i TatC. TatA posiada podobną do TatB strukturę i bierze udział w późniejszych etapach sekrecji. Prawdopodobnie jest kluczowym białkiem uczestniczącym w wytworzeniu poru sekrecyjnego, który powstaje z połączenia C-końca TatB z N-końcem TatC. Oczyszczono także kompleksy TatA i TatB, co świadczy o tym, że kompleks Tat jest

bardzo dynamiczną strukturą [32]. Rys. 6 przedstawia organizację systemu sekrecyjnego Tat.

Ważnym elementem procesu sekrecji białek jest rozpoznanie tych, które znajdują się w konformacji natywnej. Udział w tym procesie mają chaperony oraz liczne kofaktory często odnajdywane w tych samych operonach, co substraty systemu i które określa się mianem REMP (redox enzymes maturation proteins). Prawdopodobnie zwinięte białko indukuje przyłączenie się chaperonów i innych kofaktorów do niego, a dzięki sile protonomotorycznej formowany jest kanał sekrecyjny, przez który zachodzi transport białka (głównie przy udziale TatA) [2].

6. System sekrecji Com

System sekrecji Com ma mniejszy od wcześniej wymienionych systemów udział w eksporcie białek na zewnątrz komórki bakteryjnej. Białka ulegające sekrecji przy jego udziale mają znaczenie przy wytwarzaniu stanu kompetencji komórek *B. subtilis*. Ich obecność jest niezbędna do wytworzenia pilusa, który umożliwia kontakt DNA z odpowiednim receptorem na powierzchni komórki (białko ComEA). Znane są 4 białka, w których znajduje się pseudopilinowa

sekwencja sygnałowa, wykazujące podobieństwo do pilin typu IV i białek II systemu sekrecji bakterii Gram-ujemnych [35]. Zalicza się do nich białka ComGC, ComGD, ComGE oraz ComGG. Peptydy sygnałowe mają długość 33 aminokwasów, i składają się z 3 części N, H i C, jednakże w przeciwieństwie do systemów Sec i Tat miejsce cięcia C jest położone nie w C-końcu, a pomiędzy pozostałymi domenami. Konsensusowa sekwencja K-G-F położona w pozycji od -2 do +1 jest rozpoznawana przez peptydazę sygnałową ComC, która działa po cytoplazmatycznej stronie błony [34]. ComC jest ponadto odpowiedzialne za metylację fenyloalaniny w pozycji +1.

Substraty systemu Com przed odcięciem sekwencji sygnałowej zlokalizowane są głównie w błonie cytoplazmatycznej, a cięcie proteolityczne powoduje przemieszczenie się na zewnętrzną stronę błony. Do utrzymania stabilności ComGC istotna jest obecność oksydoreduktazy dwusiarczkowej BdbGC, która prawdopodobnie katalizuje powstanie wewnętrznego mostka disiarczkowego w tym białku [9]. Białka ComG biorą zapewne udział w tworzeniu kanału przecinającego błonę (jeden lub kilka typów białek) lub w reorganizacji budowy ściany komórkowej, umożliwiając interakcję DNA z receptorem ComEA [10].

Piliny typu IV polimeryzują w pili, stanowiąc długie asymetryczne włókna, które mają znaczenie w adhezji oraz ruchliwości. Pseudopiliny będące czynnikami kompetencji mogą formować takie struktury przy nadekspresji tych białek, jednakże brak jest dowodów eksperymentalnych na obecność takich kompleksów. Potwierdzono natomiast, że główna pseudopilina *B. subtilis* ComGC tworzy multimericzne kompleksy połączone kowalencyjnie mostkami disiarczkowymi [9].

7. System sekrecji ABC

Feromony oraz bakteriocyny stanowią odrębną grupę białek transportowanych na zewnątrz komórki *B. subtilis*. Są to związki posiadające aktywność antybakteryjną, która jest skierowana przeciw innym przedstawicielom bakterii Gram-dodatnich [29]. Transport odbywa się dzięki transporterom ABC (ATP-binding cassette), które odnajdywane są także u eukariontów. Należą one do dużej rodziny wielopodjednostkowych permeaz, które wybiórczo przenoszą substraty takie jak jony, aminokwasy, peptydy, antybiotyki czy polisacharydy na zewnątrz komórki lub do jej wnętrza. U *B. subtilis* transportery ABC uczestniczą w eksporcie lantibiotyków i feromonów, które posiadają specyficzną sekwencję sygnałową, zwaną tu często peptydem liderowym [33]. W przeciwieństwie do substratów systemów Sec, Tat czy Com, nie posiada on regionu H, a jedynie N i C. Długość peptydu liderowego waha się

między 23 a 30 resztami aminokwasowymi. Dodatkową jego rolą jest ochranianie komórki przed aktywnością antybakteryjną preproteiny, gdyż w jego obrębie zachodzą modyfikacje posttranslacyjne.

Do zajścia transportu pośredniczonego przez transporter ABC wymagany jest nakład energii pochodzący z hydrolizy ATP. Typowy transporter zbudowany jest z dwóch domen hydrofobowych spinających błonę komórkową (MSD), z których każda zawiera 6 segmentów i odpowiada za formowanie kompleksu sekrecyjnego oraz z 2 domen hydrofilowych wiążących nukleotydy (NBD) znajdujących się po stronie cytoplazmatycznej błony [41]. Domena NBD składa się z krótkich odcinków wysoko konserwowanej sekwencji: motywów WalkerA i WalkerB, które tworzą kieszeń wiążącą ATP, motywu znacznikowego położonego pomiędzy nimi oraz położonego poniżej WalkerB motywu z konserwowaną resztą histydyny. W MSD nie wyróżnia się fragmentów o bardzo konserwowanej sekwencji. Przykładami lantibiotyków przenoszonych dzięki systemowi ABC są sublacyna 168 i subtilina *B. subtilis*. W przypadku subtiliny transporter zbudowany jest z 2 białek SpaT (NBD) i SpaB (MSD) [33].

8. Czynniki wspomagające zwijanie transportowanych białek

Aby białka, które ulegają sekrecji były funkcjonalne, muszą ulec prawidłowemu zwijaniu, czyli uzyskaniu natywnej konformacji. U *B. subtilis* znane są 3 czynniki warunkujące ten proces: propeptydy, izomerazy oraz jony metali.

Propeptydy są krótkimi odcinkami znajdującymi się między peptydem sygnałowym a dojrzałym białkiem w produkcji translacji, o długości od 70 do 200 aminokwasów. Nie są one bezpośrednio zaangażowane w proces transportu, jednak ich obecność jest niezwykle ważna w procesie obróbki postsekrecyjnej, która prowadzi do wytworzenia stabilnej formy transportowanego polipeptydu. Ich rolą jest przyspieszanie zwijania poprzez stabilizację kompleksów pośrednich lub formowanie rdzenia zapoczątkowującego proces [49]. W przypadku subtylizyny, propeptyd pozostający w bliskim sąsiedztwie dojrzałego białka jest tymczasowym inhibitorem jego aktywności. Dopiero autokatalityczne wycięcie się tego odcinka i jego degradacja zezwalają na pełną aktywność enzymatyczną [17]. Znanych jest kilka białek *B. subtilis*, w których za peptydem sygnałowym znajduje się krótki odcinek zbudowany z aminokwasów nie odnajdowanych w sekwencji dojrzałego białka. Ich obecność nie jest konieczna do zajścia procesu sekrecji czy zwijania do właściwej konformacji, a ich usuwanie odbywa się na zasadzie niespecyficznego

cięcia proteolitycznego w środowisku, do którego białko jest transportowane [45].

Zwijanie postsekrecyjne białek sekrecyjnych *B. subtilis* jest nadzorowane przez niewielką ilość białek. Zalicza się do nich lipoproteinę PrsA niezbędną do wzrostu bakterii oraz SpoIIIJ i YqjG o podobnej roli. Nokaut genu *prsA* prowadzi do istotnych zmian morfologicznych i śmierci komórki. Obniżone stężenia białka w komórce skutkują natomiast zwiększonym poziomem degradacji białek zależnych od PrsA, które zostały przetransportowane. Molekularne wyjaśnienie sposobu, w jaki PrsA ułatwia zwijanie białek jest nieznany, chociaż wiadomo, że białko wykazuje podobieństwo do izomeraz peptydylowo-propylowych (PPIaz) z rodziny parwulinowych, które zwiększają tempo zwijania białek z resztami *cis*-prolylowymi.

Kolejnym czynnikiem, który warunkuje proces zwijania eksportowanych białek jest obecność dwuwartościowych jonów metali w środowisku komórki bakteryjnej, szczególnie bogatym w jony Ca^{2+} , Fe^{3+} i Mg^{2+} . Wiele z przetransportowywanych białek to metaloproteazy, które wymagają kationów metali do prawidłowego zwijania, stabilności i aktywności. Wpływ jonów na proces nabierania natywnej konformacji zależy od całościowego ładunku na powierzchni ściany komórkowej i jest częściowo modyfikowany przez poziom D-alanylnacji kwasu teichoowego, na co wskazuje wzrost stężenia jonów na powierzchni komórki, a co za tym idzie wzrost produkcji wielu sekrecyjnych białek będące skutkiem inaktywacji operonu *dlt* odpowiedzialnego za alanylnację [17].

9. Proteazy kontrolne

Istnieje możliwość, że przetransportowane białko nie zostanie uwolnione z kanału sekrecyjnego lub nastąpi nieuprawnione związanie ze ścianą komórkową w strefie wzrostu, co prowadziłoby do zahamowania wzrostu i śmierci komórki. Za kontrolę białek związanych z powierzchnią błony i ściany komórkowej oraz degradację nieprawidłowych odpowiadają tzw. „proteazy kontrolne”. *B. subtilis* koduje 5 takich proteaz, z których główne WprA, HtrA i HtrB są proteazami serynowymi. Enzymy te są indukowane w odpowiedzi na czynniki stresowe związane ze złym zwinięciem lub fizjologiczne (tj. ciepło), które mogłyby naruszyć strukturę białek. Ich obecność jest główną przeszkodą w produkcji białek heterologicznych w *B. subtilis*. WprA jest białkowym produktem genu *wprA* związanym ze ścianą komórkową (wall associated protein), którego produkt translacji ma 96 kDa, ale jest cięty proteolitycznie po przetransportowaniu. W ścianie odnajdywane są 2 białkowe produkty: CWBP23 pochodzące z N-końca polipeptydu oraz CWBP52 pochodzenia

C-końcowego połączone 21 kDa linkerem. CWBP52 stanowi proteazę serynową, a CWBP23 jest prawdopodobnie propeptydem stymulującym zwijanie proteazy. Enzym jest aktywny prawdopodobnie w przestrzeni pomiędzy błoną a ścianą komórkową, o czym świadczy udział proteazy w inaktywacji termowrażliwej peptydazy sygnałowej S [7]. Wiedza dotycząca sygnału indukującego naczelną proteazę kontrolną jest jednak niepełna. Proteazy HtrA i HtrB prawdopodobnie są związane z błoną komórkową i posiadają dużą pozacytoplazmatyczną domenę proteazy serynowej. Geny kodujące te białka są aktywowane w odpowiedzi na stesy sekrecyjne tj. nadprodukcja czy szok cieplny na 2-składnikowej ścieżce transdukcji sygnału CssR-CssS. Receptor CssR w wyniku stresu ulega fosforylacji i w formie aktywnej indukuje ekspresję genów *htrA* i *htrB* [50].

10. Produkcja białek heterologicznych w *B. subtilis*

Zdolność *B. subtilis* do bardzo wydajnego pozakomórkowego wydzielania enzymów jest od lat wykorzystywana w przemyśle do produkcji enzymów czy witamin. Znajomość kompletnego genomu, przyznanie gatunkowi statusu „GRAS” (generally regarded as safe), wysoka odporność na niekorzystne warunki dzięki wytwarzaniu spor, niskie koszty prowadzenia hodowli oraz fakt, że białka nie są po przetransportowaniu wiązane w obrębie błony zewnętrznej sprawiły, że zaczęto rozpatrywać *B. subtilis* jako narzędzie do produkcji heterologicznej białek o znaczeniu farmakologicznym czy immunologicznym [18]. Szczególnie interesującym obszarem badań jest wykorzystanie zmodyfikowanych szczepów *B. subtilis* jako wektorów do immunizacji. Dotychczasowe próby stworzenia szczepionki opartej na zrekombinowanych szczepach dotyczyły produkcji antygenów w postaci białek powierzchniowych lub wydzielanych do podłoża hodowlanego.

B. subtilis posłużył jako wektor do ekspresji antygeny ochronnego (PA) *B. anthracis*, będącego głównym celem dla neutralizujących przeciwciał, a który był otrzymywany bezpośrednio z hodowli patogenu. Sklonowanie genu kodującego PA na plazmidzie ekspresyjnym doprowadziło do efektywnej sekrecji w pełni immunogennego antygeny przez zrekombinowane szczepy [23]. Systemy oparte na plazmidach wykorzystano także do produkcji toksyny krztuśca (*Bordetella pertussis* toxin, PT) [19], a także podjednostki białka błony zewnętrznej P1 *Neisseria meningitidis* [21]. W obu przypadkach osiągnięto odpowiedź komórkową u immunizowanych zwierząt, jednakże niezbędne było wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej, gdyż w trakcie ekspresji lub oczyszczania tracone były epitopy antygenów. *B. subtilis* posłużył również do

ekspresji 3 białek *Chlamydia pneumoniae* jako białek błonowych lub cytoplazmatycznych ze znacznikami His. Inne badania dotyczyły ekspresji pneumolizyny i białka błony zewnętrznej *Haemophilus influenzae* jako białek cytoplazmatycznych lub sekrecyjnych [14]. Stosunkowo niewielka liczba szczepów, które posłużyły jako nośnik szczepionek podjednostkowych jest uwarunkowana obecnością licznych proteaz sekrecyjnych, niestabilnością genetyczną (np. w wyniku utraty plazmidu) lub strukturalną (w wyniku rearanzacji genomu) czy też ograniczoną dostępnością promotorów do konstrukcji wektorów ekspresyjnych. Opracowano metody obejścia tych problemów, które polegają na zastosowaniu szczepów z obniżoną liczbą produkowanych proteaz [51] oraz podwyższoną ekspresją chaperonów tj. białka PrsA [24] stosowaniu plazmidów integrujących w miejsca genomu o stabilnej strukturze genetycznej na zasadzie rekombinacji homologicznej [16] czy zastosowanie plazmidów replikujących się w postaci 2-niciowych produktów pośrednich [25].

B. subtilis wykorzystywany jest też jako żywy nośnik antygenów, który może być podawany drogą pokarmową bez potrzeby atenuacji, ponieważ wykorzystuje się go jako probiotyk [36]. Szczególną cechą wykorzystywaną przy konstrukcji szczepionek jest zdolność do tworzenia spor, które mogą nieść na powierzchni antygeny. Wykorzystano 2 białka płaszcza spory CotA i CotB, które poddano fuzji z fragmentem C toksyny tężca (TTC) i podjednostką B toksyny LTB enterotoksycznych szczepów *E. coli* [22]. Problemem w tworzeniu „żywych” szczepionek w oparciu o *B. subtilis* jest niska immunogenność tej bakterii w tkankach ssaczy – odpowiedź na dostarczane drogą pokarmową obce i własne antygeny jest bardzo słaba ze względu na powszechną obecność spor w środowisku, dlatego niezbędne jest podawanie wysokich dawek antygeny [14].

Ważne jest dalsze poznanie losów komórek bakteryjnych oraz spor po podaniu szczepionki. Kluczowym procesem w aktywacji odpowiedzi immunologicznej jest prezentacja antygeny limfocytom przez komórkę gospodarza zawierającą spory *B. subtilis* w fagosomie. Bardziej immunogenne szczepy powinny posiadać zdolność efektywnej sporulacji po fagocytozie. Bielecki i wsp. [6] skonstruowali szczep *B. subtilis* ekspresyjny listeriolizynę O (LLO) *L. monocytogenes*, co umożliwiło bakterii ucieczkę z fagosomu oraz efektywne namnażanie się w cytoplazmie komórki gospodarza. W badaniach przeprowadzonych przez Huang i wsp. [20] dowiedziono natomiast, że antygen ochronny *B. anthracis* ekspresyjny razem z LLO po dostarczeniu do cytoplazmy makrofagów na powierzchni spory *B. subtilis* przyczynił się do wzmożenia odpowiedzi limfocytów Th1. LLO wykorzysta-

na została również do konstrukcji, w której bakteryjne białko zostało sprzężone z przeciwciałem monoklonalnym B3, rozpoznającym antygen na powierzchni komórek nowotworowych raka piersi MCF7. Powstała w ten sposób immunotoksyna była zdolna do eliminacji komórek niosących antygen, a jej działanie podlegało regulacji na zasadzie utleniania i redukcji kluczowej dla aktywności cysteiny w sekwencji białka [4]. LLO sprzężona z przeciwciałami skierowanym przeciwko markerom nowotworowym mogłaby znaleźć szerokie zastosowanie w terapii, jednak niezbędne jest wcześniejsze jak najdokładniejsze poznanie efektu cytotoksycznego hemolizyny oraz mechanizmów immunologicznych towarzyszących zarażaniu.

11. Podsumowanie

Dzięki poznaniu całkowitej sekwencji genomu *B. subtilis* oraz dzięki zaawansowanym metodom analizy proteomicznej poznano złożoność systemów sekrecyjnych tej niepatogenicznej bakterii. Coraz bardziej rozległa wiedza na temat mechanizmów transportu białek na zewnątrz komórki bakteryjnej umożliwia efektywniejsze wykorzystanie *B. subtilis* jako atrakcyjnego narzędzia do produkcji białek na szeroką skalę, zarówno w przemyśle, jak i terapii. Atutami bakterii są bardzo wydajna produkcja i sekrecja białka, niepatogenność, łatwość i niskie koszty hodowli, a także brak potrzeby oczyszczania substratów sekrecji. Przeprowadzone z użyciem tej bakterii badania dowodzą, jak szerokie są perspektywy wykorzystania jej w opracowywaniu nowych szczepionek. *B. subtilis* może bowiem stanowić żywy nośnik antygenów heterologicznych (w postaci spor lub komórek wegetatywnych) bądź służyć jako ich fabryka. Lepsze zrozumienie procesów zaangażowanych w transport białek u *B. subtilis* może przyczynić się również do lepszego zrozumienia mechanizmów patogenyzy bakterii Gram-dodatnich, ponieważ wiele czynników wirulencji stanowią białka wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej.

Piśmiennictwo

1. Akita M., Sasaki S., Matsuyama S., Mizushima S.: SecA interacts with the secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8162–8169 (1990)
2. Alami M., Lüke I., Deitermann S., Eisner G., Koch H.G., Brunner J., Müller M.: Differential interactions between a twinarginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell.* **12**, 937–946 (2003)
3. Antelmann H., Tjalsma H., Voigt B., Ohlmeier S., Bron S., van Dijk J. M., Hecker M.: A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* **11**, 14984–14502 (2001)

4. Bergelt S., Frost S., Lilie H.: Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin. *Protein Sci.* **18**, 1210–1220 (2009)
5. Beveridge T.J., Murray R.G.: Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**, 876–887 (1980)
6. Bielecki J., Youngman P., Connelly P., Portnoy P. A.: *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*, **345**, 175–176 (1990)
7. Bolhuis A., Tjalsma H., Stephenson K., Harwood C.R., Venema G., Bron S., van Dijl J.M.: Different mechanisms for thermal inactivation of *Bacillus subtilis* signal peptidase mutants. *J. Biol. Chem.* **274**, 15865–15868 (1999)
8. Bradshaw N., Walter P.: The signal recognition particle (SRP) RNA links conformational changes in the SRP to protein targeting. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2728–2734 (2007)
9. Chen I., Provedel R., Dubnau D.: The macromolecular complex formed by a pili in competent *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 21720–21727 (2006)
10. Chung Y.S., Breidt F., Dubnau D.: Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **29**, 905–913 (1998)
11. de Keyser J., van der Does C., Driessen A.J.M.: The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *CMLS*, **60**, 2034–2052 (2003)
12. Desvaux, M., Hébraud M.: The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 774–805 (2006)
13. Deuerling E., Mogk A., Richter C., Purucker M., Schumann W.: The ftsH gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol. Microbiol.* **23**, 921–933 (1997)
14. Ferreira L.C.S., Ferreira R.C.C., Schumann W.: *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An. Acad. Bras. Cienc.* **77**, 112–124 (2005)
15. Gelis I., Bonvin A.M.J.J., Keramisanou D., Koukaki M., Gouridis G., Karamanou S., Economou A., Kalodimos C. G.: Structural basis for signal sequence recognition by the 204-kDa translocase motor SecA determined by NMR. *Cell*, **131**, 756–769 (2007)
16. Härtl B., Wehrl W., Wiegert T., Homuth G., Schumann W.: Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes. *J. Bacteriol.* **183**, 2696–2699 (2001)
17. Harwood C.R., Cranenburgh R.: *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trend in Microbiology*, **16**, 73–79 (2007)
18. Harwood C.R.: *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotech.* **10**, 247–256 (1992)
19. Himanen J.P., Taira S., Sarvas M., Saris P., Runeberg-Nyman K.: Expression of pertussis toxin subunit S4 as an intracytoplasmic protein in *Bacillus subtilis*. *Vaccine*, **8**, 600–604 (1990)
20. Huang J.-M., La Ragione R.M., Cooley W.A., Todryk S., Cutting S.M.: Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. *Vaccine*, **26**, 6043–6052 (2008)
21. Idänpään-Heikkilä I., Muttilainen S., Wahlström E., Saari-nen L., Leinonen M., Sarvas M., Mäkelä P.H.: The antibody response to a prototype liposome vaccine containing *Neisseria meningitidis* outer membrane protein P1 produced in *Bacillus subtilis*. *Vaccine*, **13**, 1501–1508 (1995)
22. Istatico R., Cangiano G., Tran H.T., Ciabattini A., Medagli-ni D., Oggioni M.R., Felice M., Pozzi G., Ricca E.: Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* **183**, 6294–6301 (2001)
23. Ivins B.E., Welkos S.L.: Cloning and expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.* **54**, 537–542 (1986)
24. Jacobs M., Andersen J.B., Kontinen V., Sarvas M.: *Bacillus subtilis* PrsA is required *in vivo* as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without prosequences. *Mol. Microbiol.* **8**, 957–966.
25. Janniere L., Bruand C., Ehrlich S.D.: Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene*, **87**, 53–61 (1990)
26. Jongbloed J.D.H., Antelmann H., Hecker M., Nijland R., Bron S., Airaksinen U., Pries F., Quax W.J., van Dijl J.M., Braun P.G.: Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44068–44078 (2002)
27. Jongbloed J.D., Grieger U., Antelmann H., Hecker M., Nijland R. i wsp.: Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **54**, 1319–1325 (2004)
28. Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R.: Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* **185**, 5627–5631 (2003)
29. Klein C., Entian K.D.: Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2793–2801 (1994)
30. Kobayashi K., Ehrlich S.D., Ogasawara N. i wsp.: Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**, 4678–4683 (2003)
31. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. i wsp.: The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249–256 (1997)
32. Lee P. A., Tullman-Ercek D., Georgiou G.: The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 373–395 (2006)
33. Ling L.F., Xu Z.R., Li W.F., Shuai J.B., Lu P., Hu C.X.: Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotech. Adv.* **25**, 1–12 (2007)
34. Lory S.: Leader peptidase of type IV prepilins and related proteins. In G. von Heijne (ed.), *Signal Peptidases*. R.G. Landes Co., Austin, Tex, 17–29 (1994)
35. Łasica A.M., Staroń A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Charakterystyka białek Dsb organizmów prokariotycznych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 223–235 (2007)
36. Mazza P.: The use of *Bacillus subtilis* as an anti-diarrhoeal microorganism. *Bol. Chim. Farm.* **133**, 3–18 (1994)
37. Nakano M., Zuber P.: Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 165–90 (1998)
38. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G.: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1–6 (1997)
39. Osborne A.R., Rapoport T.A.: Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell*, **129**, 97–110 (2007)
40. Papanikou E., Karamanou S., Baud C., Frank M., Sianidis G., Keramisanou D., Kalodimos C., Kuhn A., Economou A.: Identification of the preprotein binding domain of SecA. *J. Biol. Chem.* **280**, 43209–43217 (2005)

41. Quentin Y., Fichant G., Denizot F.: Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transporter systems. *J. Mol. Biol.* **287**, 467–484 (1999)
42. Robson A., Gold V.A.M., Hodson S., Clarke A.R., Collinson I.: Energy transduction in protein transport and the ATP hydrolytic cycle of SecA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5111–5116 (2009)
43. Rosenkrands I., Weldingh K., Jacobsen S., Hansen C.V., Florio W., Gianetti I., Andersen P.: Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis*, **21**, 935–948 (2000)
44. Sutcliffe I.C., Harrington D.J.: Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacteria. *Microbiology*, **148**, 2065–2077 (2002)
45. Takase K., Mizuno H., Yamane K.: NH₂-terminal processing of *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *J. Biol. Chem.* **263**, 11548–11553 (1988)
46. Tjalsma, H., Antelmann H., Dijl J.M. i wsp.: Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets” of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 207–233 (2004)
47. Tjalsma, H., Bolhuis A., Jongbloed J.D.H., Bron S., an Dijl J.M.: Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 515–547 (2000)
48. van Wely K.H.M., Swaving J., Broekhuizen C.P., Rose M., Quax W.J., Driessen A.J.M.: Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis* *yvaL* gene as a SecG homologue. *J. Bacteriol.* **181**, 1786–1792 (1999)
49. Wang L., Ruan B., Ruvinov S., Bryan P.N.: Engineering the independent folding of the subtilisin BPN’ pro-domain: correlation of pro-domain stability with the rate of subtilisin folding. *Biochemistry*, **37**, 3165–3171 (1998)
50. Westers H., Westers L., Darmon E., van Dijl J.M., Quax W.J., Zanen G.: The CssRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* **273**, 3816–3827 (2006)
51. Wu S.C., Yeung J.C., Duan Y., Ye R., Szarka S.J., Habibi H.R., Wong S.L.: Functional production and characterization of a fimbriin-specific single chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3261–3269 (2002)
52. Zanen G., Antelmann H., Meima R., Jongbloed J.D.H., Kolkman M., Hecker M., van Dijl J.M.: Proteomic dissection of potential signal recognition particle dependence in protein secretion by *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, **6**, 3636–3648 (2006)
53. Zimmer J., Nam Y., Rapoport T.A.: Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*, **455**, 936–943 (2008)