

Barbara Katarzyna Pawłowska^{1*}, Beata Magdalena Sobieszkańska¹

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.
Zaakceptowano w sierpniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Amyloidy bakteryjne. 2.1. Fimbrie spiralne. 2.1.1. Synteza fimbrii spiralnych. 2.1.2. Regulacja ekspresji operonu *csg*. 2.1.3. Udział fimbrii spiralnych w wirulencji bakterii. 2.1.4. Rola fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń człowieka. 2.2. Inne amyloidy bakteryjne. 2.3. Amyloidy grzybicze. 3. Podsumowanie

Amyloids, common proteins among microorganisms

Abstract: Historically, the term *amyloid* was used strictly with reference to human neurodegenerative diseases. Nowadays, it is known that many proteins have the potential to conformational changes into β -sheet structures with tendency to form insoluble amyloid fibrils. Moreover, amyloid proteins are widespread among microorganisms. Bacteria and fungi produce functional amyloids which exhibit all characteristics of amyloid proteins, but in contrast to a numerous group of human toxic amyloids, they play important physiological functions in microorganisms. There is growing evidence that functional amyloids are important in bacterial adhesion and invasion. Furthermore, amyloids make biofilms thicker, rougher, and more resistant to drying out. The increasing interest in better understanding of the nature of these unusual microbial proteins and their role in pathogenesis are likely to contribute to the effective treatment or prevention of infectious diseases in humans.

1. Introduction. 2. Bacterial amyloids. 2.1. Curli fibers. 2.1.1. Curli biogenesis. 2.1.2. Regulation of *csg* operon. 2.1.3. Participation of curli in bacterial virulence. 2.1.4. Role of curli in pathogenesis. 2.2. Other bacterial amyloids. 2.3. Fungal amyloids. 3. Recapitulation

Słowa kluczowe: amyloidy funkcjonalne, biofilm, fimbrie spiralne

Key words: functional amyloids, biofilm, curli fibers

1. Wprowadzenie

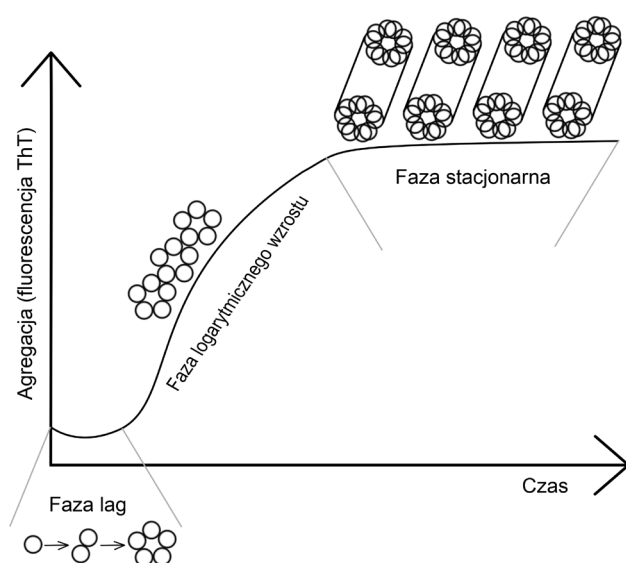
Termin amyloid po raz pierwszy został zastosowany przez Rudolfa Virchowa, który w 1854 roku zaobserwował pozakomórkowe złogi w tkance mózgu i na podstawie niebieskiego wybarwienia jodyną, błędnie opisał je jako skrobia (łac. *amylum*; grec. *amylon*). Pierwsze szczegółowe badania nad amyloidami przeprowadzili Friedreich i Kekule, którzy w 1859 roku potwierdzili białkowe pochodzenie złogów, wykluczając tym samym obecność węglowodanów w badanej masie. Postęp wiedzy o II-rzędowej strukturze białek przyczynił się do odkrycia, że amyloidy w przeciwieństwie do innych białek o strukturze α -helisy, posiadają prawoskrętną konfigurację β . Charakterystyczna dla wszystkich białek amyloidowych, regularna struktura nierozgałęzionych włókien, tzw. β -harmonijka warunkuje ich wysoką oporność na proteolizę [14, 80, 85]. Do powstawania włókien amyloidowych w organizmie człowieka dochodzi na skutek błędnego uformowania łańcucha polipeptydowego. Przyczyną zmian prawidłowej konformacji białka mogą być różnorodne środowiskowe [56]. Do zmiany struktury drugorzędowej białka z α -helisy na β -harmonijkę może dojść na skutek: zmian pH lub temperatury, mechanicznego stresu, glikacji oraz oksy-

dacji [18]. Nieprawidłowa konformacja przestrzenna białek prowadzi do polimeryzacji monomerów w toksyczne dla komórek formy przejściowe [17, 29]. Do zakończenia procesu agregacji dochodzi w momencie osiągnięcia stanu równowagi, czyli powstania nierozpuszczalnych struktur, tj. amorficznych agregatów lub włókien amyloidu [30, 35].

Powstawanie włókien amyloidowych w organizmie człowieka towarzyszy rozwojowi amyloidoz, tj. chorób polegających na odkładaniu się w tkankach lub określonych narządach wewnętrznych złogów białek amyloidowych. Gromadzenie się włókien amyloidowych w mózgu prowadzi natomiast do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, m. in. choroby Alzheimera oraz Parkinsona. Dotychczas rozpoznano dużą, heterogenną grupę toksycznych białek amyloidowych, tym nie mniej, występujące w organizmie człowieka amyloidy nie zawsze związane są z procesem patologicznym i mogą również pełnić funkcje fizjologiczne. Przykładem jest odkryte w 2006 roku premelanosomowe białko 17 (Pmel17), które uczestniczy w procesie polimeryzacji i biosyntezy melaniny [24].

W przeciwieństwie do białek amyloidowych powstających w organizmie człowieka przede wszystkim w procesach chorobowych, liczne drobnoustroje tj. bakterie

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel.: 71 784 12 78; email: pawlowska.barba@gmail.com



Rys. 1. Proces polimeryzacji białek amyloidowych
Agregacja monomerów prowadzi do powstania toksycznych form pośrednich (oligomerów), protofibryli oraz włókien amyloidów.

i grzyby wytwarzają tzw. amyloidy funkcjonalne, które pośredniczą w ich procesach fizjologicznych [27, 90, 95].

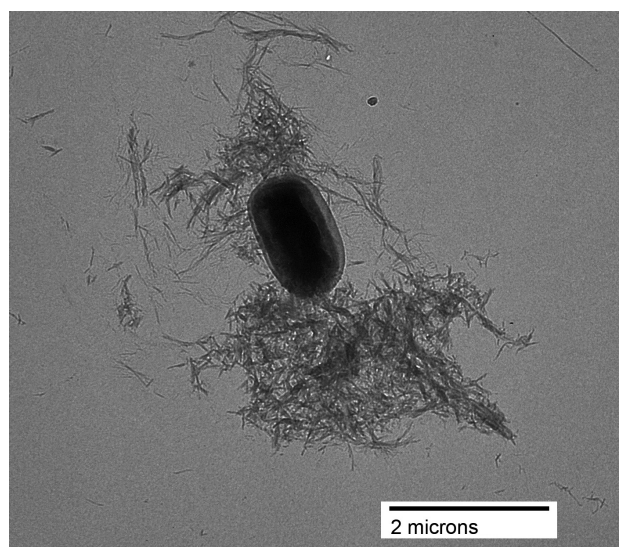
Amyloidy funkcjonalne drobnoustrojów powstają w skomplikowanych procesach biosyntezy, co odróżnia je od nieprawidłowo połażowanych, toksycznych amyloidów ludzkich. Pomimo istotnych różnic na etapie tworzenia amyloidów wytwarzanych przez drobnoustroje oraz organizm człowieka, białka te cechują się szeregiem wspólnych właściwości fizyko-chemicznych. [13]. Struktura β -harmonijki, która charakteryzuje wszystkie amyloidy odpowiada za ich niezwykłą oporność na trawienie proteazami oraz denaturację enzymatyczną, cieplną i chemiczną. Włókna amyloidowe cechuje wytrzymałość na rozciąganie porównywalna do stali, a sztywność mechaniczna tych białek jest zbliżona do jedwabiu [87]. Ze względu na wysoką trwałość włókien amyloidowych do izolacji monomerów tych białek stosuje się stężony kwas mrówkowy lub heksafluoro-2-propanol (HFIP). W pozostałych kwasach oraz zasadach białka amyloidowe nie rozpuszczają się [60, 86]. Ponadto, do charakterystycznych cech wszystkich białek amyloidowych zalicza się zdolność wiązania czerwieni Konga, tioflawiny T oraz kurkuminy [45, 49, 55]. Dodatek czerwieni Konga lub kurkuminy do podłoża hodowlanego umożliwia wykrywanie białek amyloidowych na powierzchni bakterii, ponieważ barwniki te wbudowują się w strukturę β -harmonijki, wpływając zarówno na kolor jak i morfologię kolonii. Zastosowanie czerwieni Konga jest również wykorzystywane do wykrywania charakterystycznej dla amyloidów dwójłomności w świetle spolaryzowanym, którą obserwuje się w postaci żółto-zielonego świecenia. Tioflawina T jest barwnikiem fluorescencyjnym, który stosowany jest do badań nad kinetyką procesów polimeryzacji białek

amyloidowych. Wbudowanie tioflawiny T w strukturę β -harmonijki powstających włókien amyloidu prowadzi do wzmocnienia jego fluorescencji. W procesie agregacji białek amyloidowych wyróżnia się trzy etapy: 1) fazę lag, która odpowiada oligomeryzacji globularnych monomerów, 2) fazę tworzenia i wydłużania włókien amyloidu oraz 3) fazę stabilizacji, która odzwierciedla zakończony proces polimeryzacji i stałą liczbę włókien (Rys. 1).

2. Amyloidy bakteryjne

2.1. Fimbrie spiralne

Pierwsze doniesienia o bakteryjnych amyloidach pojawiły się w 1989 roku [66]. Jak dotychczas, fimbrie spiralne są jedynym wykrytym u Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* antygenem bakteryjnym zbudowanym z amyloidu (Rys. 2.). Ekspresja genów *csg* (*curli-specific genes*), które kodują te adhezyny została potwierdzona u *Salmonella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp. *Proteus* sp oraz gatunku *Escherichia coli* (*E. coli*) [98].



Rys. 2. Fimbrie spiralne na powierzchni *E. coli*
Zdjęcie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego dzięki uprzejmości prof. M. Chapmana.

2.1.1. Synteza fimbrii spiralnych

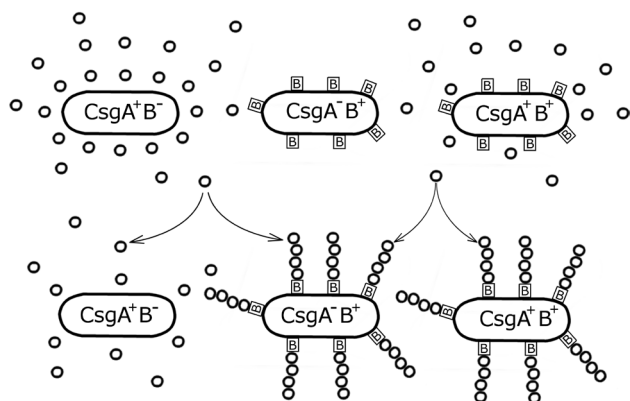
Za biogenezę fimbrii spiralnych odpowiadają białka kodowane przez siedem genów zlokalizowanych na dwóch operonach: *csgDEFG* oraz *csgBAC*. Podczas transkrypcji operon *csgDEFG* jest przepisywany w lewo, natomiast *csgBAC* w prawo. Operon *csgBAC* zawiera geny, które kodują dwie kluczowe podjednostki strukturalne tj. białka CsgA i CsgB. Białka te posiadają zbl-

zoną masę cząsteczkową (~17 kDa) a ich struktura obejmuje pięć homologicznych odcinków, których model przypomina spinkę do włosów [5]. Powtarzające się sekwencje aminokwasów są bogate w glicynę, glutaminę i asparaginę, co jest typowe dla peptydów amyloidogennych [69]. Pomiedzy resztami glutaminy i sparaginy powstają wiązania wodorowe, które zapewniają trwałość i odporność białek amyloidowych na proteolizę [72, 97].

Podjednostki strukturalne fimbrii spiralnych polimeryzują poza komórką bakteryjną, co odróżnia te adhezyny od pozostałych typów fimbrii, których synteza rozpoczyna się przy podstawie błony zewnętrznej.

Sekrecja białka CsgA i CsgB do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest możliwa, ponieważ podczas syntezy fimbrii spiralnych w błonie zewnętrznej bakterii powstają kanały zbudowane z lipoproteiny CsgG. Translokacja głównych podjednostek strukturalnych jest zależna od innych białek: CsgC, CsgE oraz CsgF. Rolą białka CsgC jest zapobieganie autotoksyczności poprzez hamowanie przedwczesnej amyloidogenezy na etapie transportu monomerów CsgA. Białko CsgE jest obecne w przestrzeni periplazmatycznej bakterii i pełni rolę pomocniczą podczas naprowadzania cząstek CsgA w kierunku kanału zlokalizowanego w błonie zewnętrznej. W momencie uwolnienia do środowiska pozakomórkowego podjednostek CsgA i CsgB istotną rolę odgrywa związana z błoną zewnętrzną cząsteczka CsgF, która odpowiada za zakotwiczenie białka CsgB, a następnie wpływa na szybkość polimeryzacji monomerów CsgA w włókna amyloidowe fimbrii spiralnych [22, 44].

Zakotwiczenie białka zarodnikowego CsgB w błonie zewnętrznej zapoczątkowuje proces nukleacji, gdyż jest sygnałem wzbudzającym polimeryzację rozpuszczalnych monomerów CsgA. W warunkach *in vivo*



Rys. 3. Synteza fimbrii spiralnych

CsgA⁺B⁻ – bakteria wydziela do środowiska monomery CsgA, ale brak ekspresji CsgB na jej powierzchni uniemożliwia syntezę fimbrii spiralnych; CsgA⁻B⁺ – bakteria nie wytwarza CsgA, ale posiada na swojej powierzchni białko CsgB, stąd na jej powierzchni powstają fimbrie spiralne, gdy w środowisku obecne są monomery CsgA; CsgA⁺B⁺ – bakteria zdolna do samodzielnej syntezy fimbrii spiralnych.

białko CsgB jest niezbędne podczas biosyntezy fimbrii spiralnych, gdyż komórka bakteryjna niewykazująca ekspresji tego białka jest niezdolna do zakotwiczenia na błonie zewnętrznej powstających włókien amyloidu. Cząsteczki CsgA oraz CsgB mogą być natomiast syntezowane przez dwie, różne bakterie, które należą do odmiennych gatunków np. *Salmonella* sp. i *E. coli*. Wariant taki jest możliwy, ponieważ bakteria, pozbawiona ekspresji białka zarodnikowego CsgB, uwalnia do środowiska zewnętrznego monomery CsgA, które mogą agregować na powierzchni innej bakterii, posiadającej w błonie zewnętrznej białko zarodnikowe CsgB (Rys. 3.) [33].

2.1.2. Regulacja ekspresji operonu *csg*

W przeciwieństwie do nieprawidłowo formowanych ludzkich białek amyloidowych, biogeneza fimbrii spiralnych jest ściśle uporządkowana. Za prawidłowy przebieg tego wieloetapowego procesu odpowiadają czynniki regulatorowe. Najważniejszym z nich jest białko CsgD, które zalicza się do rodziny regulatorów transkrypcyjnych FixJ/UhpA/LuxR [12]. Za funkcje regulatorowe tych białek odpowiada domena C-końcowa, która ma właściwości wiążące DNA. Białko CsgD łącząc się z promotorem operonu *csgBAC* indukuje jego pozytywną regulację [79].

W odróżnieniu od innych białek z rodziny FixJ/UhpA/LuxR, białko CsgD nie ma wpływu na własną ekspresję. Jest ona zależna od: fazy wzrostu bakterii, sygnałów środowiskowych, międzykomórkowej cząsteczki sygnalizacyjnej tj. cyklicznego guanozyno-3',5'-monofosforanu (c-GMP) oraz małego regulatorowego RNA [51]. Bakteryjne małe RNA są obecnie przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich istotny wpływ na regulację ekspresji genów. Regulatorowym RNA, które oddziałuje na gen *csgD* jest czynnik RydC, pełniący rolę ryboregulatora u *Salmonella* sp. oraz u *E. coli*. Do prawidłowego funkcjonowania czynnika RydC niezbędna jest obecność białka opiekuńczego Hfq. Kompleks RydC-Hfq łączy się z *csgD* mRNA na zasadzie komplementarności, a następnie blokuje proces translacji, co skutkuje wyciszeniem biogenezy fimbrii spiralnych i utratą zdolności tworzenia biofilmu. [8]. Wznowienie translacji następuje dopiero po znacznym obniżeniu poziomu białka RydC w komórce bakteryjnej.

Istotnym czynnikiem środowiskowym regulującym biosyntezę fimbrii spiralnych jest temperatura. Choć większość bakterii wykazuje ekspresję genów operonu *csg* wyłącznie w temperaturze poniżej 30°C, wiele patogennych szczepów *E. coli* syntezuje fimbrie spiralne również w temperaturze ciała ludzkiego. Zdolność pałeczek *E. coli* do biogenezy fimbrii spiralnych w temperaturze 37°C pojawia się na skutek mutacji

w genie *csgD* [93]. W warunkach *in vitro* fimbrie spiralne produkowane są w stacjonarnej fazie wzrostu bakterii, na podłożach hodowlanych o niskiej osmolalności, przy ograniczonym dostępie azotu, fosforu i żelaza. Ponadto, ekspresja genu *csgD* jest najwyższa w warunkach mikroaerofilnych [5, 28].

2.1.3. Udział fimbrii spiralnych w wirulencji bakterii

Fimbrie spiralne pełnią istotne funkcje podczas wieloetapowego procesu tworzenia biofilmów. Udział tych adhezyn jest szczególnie ważny podczas pierwszej fazy tworzenia struktury biofilmu, czyli w momencie wstępnej adhezji bakterii do powierzchni abiotycznych lub biotycznych [94]. Fimbrie zbudowane z amyloidu przyczyniają się do efektywnej kolonizacji tkanek roślinnych, nierdzewnej stali, polistyrenu czy szkła [4, 42, 71, 80]. Po skolonizowaniu powierzchni, dzięki hamowaniu przez fimbrie spiralne agregacji komórek bakteryjnych, mogą one tworzyć mikrokolonie. Dojrzały biofilm jest strukturą trójwymiarową, pokrytą warstwą zewnątrzkomórkowej macierzy, która chroni bakterie przed szkodliwymi czynnikami (m.in. antybiotykami). Ukryte wewnątrz biofilmu patogeny jelitowe są bezpieczne, gdyż macierz zewnątrzkomórkowa posiada cechy wytrzymałej bariery fizycznej. Charakterystyczne właściwości fizyczne i chemiczne macierzy są utrzymywane przez fimbrie spiralne, które stanowią główny, białkowy składnik macierzy zewnątrzkomórkowej tworzonej przez *E. coli* i *Salmonella* sp. Dzięki wysokiej trwałości i oporności amyloidów na proteolizę, biofilmy stanowią swoiste schronienie dla bakterii, umożliwiające im namnażanie pomimo niekorzystnych warunków panujących poza strukturą biofilmu. Bakterie prezentujące na swojej powierzchni fimbrie spiralne produkują biofilmy, które są wyraźnie grubsze i bardziej rozległe w porównaniu do biofilmów syntezowanych przez drobnoustroje pozbawione tych antygenów [43, 95].

Unikalną cechą fimbrii spiralnych jest ich zdolność wiązania białek plazmatycznych i komórkowych, co świadczy o udziale tych antygenów w patogenezie zakażeń u człowieka. Powinowactwo do białek głównego układu zgodności tkankowej MHC-I (*major histocompatibility complex*) umożliwia modulowanie odpowiedzi przeciwzapalnej gospodarza, ponieważ w warunkach fizjologicznych cząsteczki MHC-I odpowiadają m.in. za obronę przed patogenami [40, 64, 67]. Amyloidowe fimbrie mogą wiązać zarówno łańcuch ciężki α białka MHC-I, jak i jego podjednostkę tj. β_2 -mikroglobulinę. Ponadto, w badaniach *in vitro* wykazano, że bakterie prezentujące fimbrie spiralne wykazują zwiększoną adhezję do linii komórkowej o prawidłowej ekspresji cząsteczek MHC-I w porównaniu do linii o zredukowanej ekspresji tych antygenów na powierzchni [67].

Zdolność wiązania plazminogenu ułatwia bakteriom produkującym fimbrie spiralne inwazję do tkanek gospodarza. Na skutek wiązania plazminogenu powstaje plazmina, która odpowiada m.in. za przerwanie ciągłości tkanek. Uszkodzenie komórek gospodarza sprzyja z kolei inwazji bakterii do głębszych warstw tkanek. Ponadto, Gophna i wsp. [32] wykazali, że po wprowadzeniu operonu *csg* odpowiedzialnego za syntezę fimbrii spiralnych do genomu nieinwazyjnych szczepów *E. coli* bakterie te wykazywały zdolność do inwazji.

Główna jednostka strukturalna CsgA posiada dwa miejsca wiążące, które mogą równocześnie reagować z różnymi cząsteczkami [65]. Jednoczesne wiązanie dwóch, odmiennych białek może pobudzać układ odpornościowy gospodarza do nasilonej reakcji immunologicznej. Białko CsgA zalicza się do wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*), co oznacza, że jest ono selektywnie rozpoznawane przez błonowe Toll-like receptory (TLR) [92]. Fimbrie spiralne, podobnie jak ludzkie amyloidy (m.in. β , amylina oraz surowiczy amyloid A), rozpoznawane są przez receptory TLR2 [11, 50, 96]. W proces wiązania bakteryjnych włókien amyloidu zaangażowane są również receptory TLR1, których aktywacja jest niezbędna do skutecznego wzbudzenia nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Związanie białka CsgA przez kompleks TLR1/2 skutkuje m.in. wzmożoną syntezą i sekrecją cytokin prozapalnych, tj. interleukiny (IL) -1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-22, IL-23 oraz TNF- α [6, 38, 59, 75, 91]. Z drugiej strony, wiązanie TLR2 powoduje: a) wzmożoną ekspresję kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*), która reguluje przepuszczalność bariery jelitowej poprzez uszczelnianie ciasnych połączeń międzykomórkowych oraz b) sekrecję IL-10, która ma właściwości przeciwzapalne [68].

2.1.4. Rola fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń człowieka

Rola fimbrii spiralnych w chorobotwórczości człowieka nie została jak dotychczas jednoznacznie potwierdzona. Szczepy prezentujące fimbrie spiralne w temperaturze ciała ludzkiego izolowano z przypadków sepsy, zakażeń układu moczowego oraz biegunek u ludzi [6, 7, 15, 37, 39, 46].

Pierwsze doniesienia o udziale fimbrii spiralnych w patogenezie chorób człowieka ukazały się 2000 roku [6]. Rezultatem badań przeprowadzonych przez Bian i wsp. [6] było wykrycie w surowicy krwi chorych z sepsą przeciwciał anti-CsgA, co potwierdza udział tych antygenów w zakażeniach ogólnoustrojowych. Ponadto, obecność przeciwciał anti-CsgA została potwierdzona w surowicy dzieci, które zmarły w wyniku zespołu uogólnionej reakcji zapalnej, podczas gdy

w grupie kontrolnej zdrowych dzieci przeciwciała te nie były obecne [31].

Amyloidowe fimbrie spiralne są również istotne podczas rozwoju zakażeń układu moczowego [61]. Badania na zwierzętach wykazały, że uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC) prezentujące fimbrie spiralne skuteczniej kolonizują pęcherz moczowy w porównaniu do szczepów mutantów pozbawionych genów *csg* [10]. Co więcej, Hung i wsp. [39] wykazali, że istnieje związek pomiędzy zdolnością uropatogenów do syntezy fimbrii spiralnych w temperaturze ciała ludzkiego, a rozwojem u chorych powikłania zakażenia układu moczowego w postaci wtórnego zakażenia krwi. Ponadto, w zakażeniach układu moczowego poważny problem kliniczny stanowi biofilm, który rozwija się na cewnikach moczowych. Fimbrie spiralne są kluczowym antygenem bakteryjnym zaangażowanym w proces syntezy biofilmu, dlatego nowatorskie podejście do leczenia zakażeń układu moczowego zakłada hamowanie syntezy u bakterii również i tych adhezyn. Interesujące badania przeprowadzili Kai-Larsen i wsp. [41], którzy udowodnili, że produkowana przez nabłonek pęcherza moczowego i nerek katelicydyna LL-37, hamuje polimeryzację białka CsgA, co uniemożliwia syntezę fimbrii spiralnych u namnażających się uropatogenów.

Istnieje niewiele doniesień naukowych o udziale fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń układu pokarmowego. Opisane przypadki dotyczą biegunek i zapaleń jelit wywołanych przez szczepy *E. coli*, u których amyloidowe fimbrie stanowiły jedyny znany czynnik wirulencji [15, 37]. Zdolność syntezy fimbrii spiralnych wykazują również szczepy *E. coli* wywołujące biegunki u dzieci [88]. Przeprowadzone w 2013 roku badania epidemiologiczne wskazują, że fimbrie spiralne są istotne w patogenezie biegunek osób dorosłych, które są wywoływane przez szczepy *E. coli* o rozsianym typie adhezji (DAEC, *diffusely adherent E. coli*). Natomiast, u dzieci do piątego roku życia nie obserwuje się różnic w odsetku szczepów DAEC tworzących fimbrie spiralne pomiędzy grupą dzieci z biegunką a grupą dzieci zdrowych [53].

2.2. Inne amyloidy bakteryjne

Jak dotychczas, zdolność syntezy funkcjonalnych amyloidów potwierdzono u bakterii z klas *Gammaproteobacteria*, *Bacterioidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* [48]. Główną funkcją bakteryjnych amyloidów jest udział w tworzeniu biofilmów, które powstają w różnorodnych niszach ekologicznych. Do bakterii wytwarzających biofilm w środowisku wodnym, tj. jeziorach słodkowodnych lub wodzie pitnej należy *Pseudomonas* sp., który wytwarza amyloidowe fimbrie Fap (*functional amyloids in Pseudomonas*). Operon zawierający sześć genów (*fapA-F*), które kodują białka strukturalne fimbrii Fap wykryto u gatunków *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*

oraz *P. putida* [19]. Główną podjednostką strukturalną tych adhezyn jest białko FapC, które polimeryzuje w włókna amyloidu. Cząsteczka FapC składa się z trzech podobnych fragmentów, które są połączone przez regiony o różnej długości i składzie aminokwasowym. Regiony pomiędzy powtarzającymi się fragmentami mają zwykle charakter hydrofilowy, stąd prawdopodobnie wywierają wpływ na właściwości dojrzalej struktury biofilmu. Sygnałem do wzbudzenia procesu nukleacji jest aktywacja białka FapB. Pozostałe cząsteczki biorące udział w biogenezie fimbrii Fap biorą udział w transporcie monomerów FapC przez błonę zewnętrzną bakterii lub pełnią inne funkcje opiekuńcze [34].

Pałeczki niefermentujące zaliczane do gatunku *P. aeruginosa* należą do drobnoustrojów oportunistycznych, których chorobotwórczość jest związana ze zdolnością tworzenia biofilmu (np. w płucach osób chorych na mukowiscydozę lub na powierzchni ran). W środowisku szpitalnym gatunek ten odpowiada za częste i trudne w eradykacji zakażenia, ponieważ wielooporne szczepy *P. aeruginosa* z łatwością kolonizują urządzenia medyczne i armaturę sanitarną. Za charakterystyczne właściwości tego gatunku odpowiadają m.in. fimbrie Fap, które są zaangażowane w proces adhezji i agregacji bakterii oraz odpowiadają za stabilizację trójwymiarowej struktury biofilmu [34]. Badania przeprowadzone przez Herbst i wsp. [34] wykazały, że funkcjonalny amyloid produkowany przez *Pseudomonas* sp. chroni biofilm przed wysychaniem, a ponadto zwiększa jego hydrofobowość oraz sztywność. Co więcej, synteza fimbrii Fap moduluje aktywność innych czynników wirulencji *P. aeruginosa*: a) ogranicza wytwarzanie elastazy B i proteazy A; b) stymuluje syntezę alginianu oraz c) wzmacnia aktywność systemu sekrecji typu IV [34].

Fimbrie Fap *Pseudomonas* sp. oraz fimbrie spiralne *E. coli* wykazują podobieństwo zarówno pod względem właściwości fizycznych jak i pełnionych funkcji. Co więcej, proces tworzenia fimbrii Fap jest homologiczny do biogenezy fimbrii spiralnych, ale nie wymaga obecności białka regulatorowego. [20].

Gram-dodatnie laseczki *Bacillus subtilis* należą do saprofitów występujących w glebie, które biorą udział w rozkładaniu związków organicznych. Biofilm, który budują saprofity glebowe jest ściśle pokryty macierzą pozakomórkową złożoną z egzopolisacharydu oraz białek: BslA i TasA. Właściwości amyloidogenne białka TasA umożliwiają polimeryzację w włókna, które tworzą sieć otaczającą bakterie we wnętrzu biofilmu. Adhezyny zbudowane z białka TasA osiagają u *B. subtilis* zmienną długość i szerokość około 10–15 nm. Wzajemne połączenie sąsiadujących komórek bakteryjnych za pomocą fimbrii zwiększa wytrzymałość tworzonej struktury [76]. Biogeneza amyloidowych fimbrii u *B. subtilis* jest zależna od obecności operonu *tasA-sipW-tasA*, który zawiera wyłącznie trzy geny.

Główną podjednostką strukturalną jest białko TasA, wykazujące właściwości przeciwbakteryjne o szerokim spektrum działania. Macierz zewnątrzkomórkowa, która zawiera białko TasA nabiera właściwości toksycznych, co przypuszczalnie ma istotny wpływ na zwalczanie konkurencyjnych bakterii [9, 76, 89]. Gen *sipW* koduje peptydazę sygnałową, której zadaniem jest odcięcie od białek TasA oraz TapA sekwencji sygnałowych, a następnie kontrola ich sekrecji poza komórkę bakteryjną. Ponadto, białko SipW pełni funkcje regulatorowe, gdyż wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w syntezę egzopolisacharydów. Produktem trzeciego genu operonu *tasA-sipW-tasA* jest białko TapA, którego rolą jest: a) zakotwiczenie wytwarzanych fimbrii w ścianie komórkowej bakterii; b) wzbudzenie polimeryzacji monomerów TasA oraz c) późniejsza kontrola nad efektywnym tworzeniem amyloidowych włókien [77]. Szczepy pozbawione białka TapA tworzą cienkie i nieprawidłowo uformowane fimbrie, które nie spełniają swoich funkcji [78].

Właściwości amyloidu funkcjonalnego posiadają również fimbrie MTP (*Mycobacterium tuberculosis pili*), które wytwarzają mykobakterie chorobotwórcze dla człowieka. Homologia fimbrii MTP oraz fimbrii spiralnych *E. coli* dotyczy ich morfologii, właściwości biochemicznych oraz pełnionych funkcji. Za kodowanie głównej podjednostki strukturalnej fimbrii MTP odpowiada chromosomalny gen *mtp*, który wykryto u *M. tuberculosis*, *M. bovis* oraz *M. avium* spp. paratuberculosis. Do syntezy fimbrii MTP zdolne są wyłącznie patogenne gatunki *Mycobacterium* sp., co świadczy o ich udziale w wirulencji prątków [2]. Co więcej, w surowicy chorych na gruźlicę wykrywa się przeciwciała anti-MTP. Badania przeprowadzone przez Naidoo i wsp. [58] wykazały, że oznaczanie obecności genu *mtb* metodą PCR jest czułą i swoistą metodą, która w przyszłości mogłaby znaleźć zastosowanie w diagnostyce gruźlicy.

Fimbrie MTP zbudowane są z amyloidu i tworzą cienkie (2–3 nm szerokości), elastyczne włókna. Główną funkcją tych adhezyn jest udział w pierwszym etapie zakażenia. Efektywna kolonizacja organizmu gospodarza jest możliwa dzięki zdolności wiązania przez fimbrie MTP lamininy, ale w przeciwieństwie do fimbrii spiralnych, adhezyny MTP nie wykazują powinowactwa do fibronektyny i kolagenu typu IV. Ponadto, badania *in vitro* wykazały, że szczep pozbawiony fimbrii MTP wykazuje znacznie zmniejszoną adhezję (o 69%) i inwazję (o 56%) do komórek nabłonka płuc w porównaniu do szczepu dzikiego [74]. Fimbrie MTP podobnie jak inne amyloidy funkcjonalne biorą również udział w tworzeniu biofilmu [73]. Badania nad immunomodulującym wpływem fimbrii MTP wykazały, że pomimo aktywnego udziału tych adhezyn podczas pierwszej fazy zakażenia, nie są one immunogenne [74].

Głównym gatunkiem zaangażowanym w powstawanie płytki nazębnej jest *Streptococcus mutans*, który tworzy biofilm bakteryjny na powierzchni zębów. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Oli i wsp. [63] wykazały, że macierz zewnątrzkomórkowa pokrywająca biofilm złożony z *S. mutans* zawiera funkcjonalny amyloid, tj. adhezyny P1. Są to struktury zaliczane do lektyn, które przyczyniają się do rozwoju próchnicy, ponieważ wiążą m.in. fibronektynę, fibrynogen, kolagen oraz składniki obecne w ślinie. Adhezyny P1 są produkowane zarówno przez szczepy laboratoryjne, jak i izolaty z płytki nazębnej. Szczepy, które nie posiadają genu *spaP*, kodującego adhezyny P1 wytwarzają biofilm oraz wiążą barwniki służące do wykrywania amyloidów, co świadczy o obecności na powierzchni *S. mutans* dodatkowych, innych niż adhezyny P1 amyloidów funkcjonalnych, które nie zostały dotychczas zidentyfikowane [63].

Biosynteza funkcjonalnych amyloidów zachodzi również u niektórych gatunków gronkowców, m.in. *Staphylococcus aureus* oraz *Staphylococcus epidermidis*. Moduliny rozpuszczalne w fenolu (PSM, *phenol soluble modulins*) są istotnym czynnikiem wirulencji szczepów MRSA (MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Do najważniejszych funkcji monomerów PSM należą: a) chemoatrakcja i liza neutrofilów gospodarza; b) działanie prozapalne; c) właściwości przeciwbakteryjne, które zapewniają przewagę nad konkurującymi gatunkami bakterii oraz d) udział w dyspersji i migracji bakterii z biofilmu. Autoagregacja cząsteczek PSM prowadzi do powstania fimbrii o właściwościach amyloidu, tzn. zdolnych do wiązania barwników służących do wykrywania struktury β oraz tworzących stabilne spolimeryzowane włókna odporne na proteolizę. Fimbrie złożone z PSM pełnią odmienne role w porównaniu do monomerów PSM, przede wszystkim biorąc udział w tworzeniu biofilmu i utrzymaniu jego prawidłowej struktury. Macierz zewnątrzkomórkowa zawierająca amyloidowe fimbrie produkowane przez *S. aureus* zapobiega rozproszeniu bakterii budujących biofilm. Ponadto, amyloidowe fimbrie gronkowców zwiększają odporność biofilmu na stres mechaniczny i enzymy degradujące. Przeciwnie funkcje fimbrii w stosunku do wolnych cząsteczek PSM świadczą o modulacji właściwości monomerów PSM na skutek ich polimeryzacji [82]. Obecność spolimeryzowanych włókien złożonych z PSM jest zależna od zdolności szczepu do częściowej autolizy i uwolnienia zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA, *extracellular DNA*), które sprzyja polimeryzacji monomerów PSM. Co więcej, eDNA tworzy przejściowe kompleksy z białkami PSM, zmniejszając tym samym ich toksyczność [81].

Zależność pomiędzy powstawaniem włókien amyloidu, a redukcją właściwości toksycznych została również potwierdzona w przypadku mikrocyliny E492 (MccE492), która jest syntezowana przez *Klebsiella*

Tabela I
Bakteryjne i grzybicze amyloidy funkcjonalne

	Organizm	Białka amyloidowe	Funkcja	Piśmien- nictwo
Bakterie	<i>Escherichia coli</i> (i inne gat. <i>Enterobacteriaceae</i>)	CsgA (fimbrie spiralne)	Adhezja, inwazja, tworzenie biofilmu, aktywacja układu immunologicznego gospodarza	[66, 5]
	<i>Pseudomonas</i> spp.	FapC	Tworzenie biofilmu	[19, 20, 34]
	<i>Bacillus subtilis</i>	TasA	Tworzenie biofilmu, toksyczność podczas sporulacji	[76, 77, 89]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTP	Wiązanie białek gospodarza, tworzenie biofilmu	[2]
	<i>Streptococcus mutans</i>	Adhezyna P1	Współtworzenie płytki nazębnej	[63]
	<i>Staphylococcus aureus</i> (i inne gat. <i>Staphylococcus</i>)	Moduliny rozpuszczalne w fenolu	Utrzymywanie struktury biofilmu	[82]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	mikrocyna E492	Bakteriocyna inaktywowana w trakcie amyloidogenezy	[54, 83]
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	czapliny	Adhezja do powierzchni hydrofilowych	[16, 21, 23]
	<i>Xhantomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	HpaG	Wzbudzanie nadwrażliwości u roślin	[62]
	<i>Erwinia amylovora</i>	HrpN		
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringa</i>	HrpZ		
Grzyby	<i>Candida</i> spp.	Adhezyny Als	Adhezja, tworzenie biofilmu, modulacja układu immunologicznego gospodarza	[3, 84]
	Grzyby strzępkowe (m.in. <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp. oraz <i>Aspergillus</i> spp.)	Hydrofobiny	Nadanie właściwości hydrofobowych strukturom powietrznym, unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza	[1, 52, 57]

pneumoniae [83]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa MccE492 ogranicza się do rodziny *Enterobacteriaceae* i bakterii, które walczą o zajęcie tej samej niszy ekologicznej. Toksyczność MccE492 polega na tworzeniu kanałów jonowych w podwójnej warstwie fosfolipidów konkurencyjnych bakterii, co prowadzi do depolaryzacji i wzrostu przepuszczalności ich błony cytoplazmatycznej [47]. Ponadto, MccE492 wykazuje *in vitro* właściwości cytotoksyczne wobec komórek eukariotycznych, indukując ich apoptozę lub nekrozę [36]. Do biogenezy toksycznych cząsteczek MccE492 dochodzi podczas fazy logarytmicznego wzrostu *K. pneumoniae*. Syntezowane cząsteczki mogą być wydzielane do środowiska w formie niezmienionej lub potranslacyjnie modyfikowanej, uruchamianej pod wpływem kowalencyjnego związania sideroforów do domeny C-końcowej cząsteczki MccE492. Tym nie mniej, obie formy mikrocyny wykazują właściwości amyloidogenne, choć forma niemodyfikowana efektywniej tworzy amyloid [54]. Proces amyloidogenezy zachodzi w fazie stacjonarnej wzrostu *K. pneumoniae* i wiąże się ze znacznym zmniejszeniem toksyczności MccE492. Proces agregacji mikrocyn jest odwracalny i umożliwia uwalnianie pojedynczych cząsteczek w momencie istotnych zmian warunków środowiska. Dzięki tej unikalnej właściwości włókna złożone z cząsteczek MccE492 są określane jako rezerwuar mikrocyn, które po uwolnieniu odzyskują cechy toksyczne [83].

Biosynteza amyloidów u występujących w glebie bakterii *Streptomyces coelicolor*, przyczynia się do modyfikacji właściwości powierzchniowych tych bakterii.

Czapliny (*chaplins*) to grupa ośmiu białek (ChpA-H) o właściwościach amyloidogennych, których sekrecja wiąże się z tworzeniem włókien amyloidu na powierzchni strzępek powietrznych oraz zarodników *S. coelicolor* [21, 23]. Sieć fimbrii zbudowanych z czaplin zapewnia hydrofobowość struktur powietrznych i chroni je przed wysychaniem. Ponadto, hydrofobowe fimbrie biorą udział w adhezji strzępek powietrznych do powierzchni hydrofilowych [16].

Amyloidy funkcjonalne są również produkowane przez Gram-ujemne patogeny roślin, ale ich rola jest słabo poznana. Harpiny są ciepłostalymi białkami, które są wydzielane jako bakteryjne czynniki wirulencji poprzez system sekrecji typu III. Do ich funkcji należy wzbudzanie nadwrażliwości rośliny i pośredniczenie w rozprzestrzenianiu się bakterii wewnątrz apoplastu. Najlepiej poznana harpiną syntezowaną przez *Xhantomonas axonopodis* pv. *glycines* jest białko HpaG, które polimeryzuje w włókna o cechach amyloidu. Tworzenie amyloidu przez harpiny koreluje z wirulencją bakterii, gdyż szczepy pozbawione genu *hpaG* kodującego HpaG są niezdolne do wzbudzenia nadwrażliwości roślin. W przypadku białka HpaG formy przejściowe oraz włókna amyloidu wykazują jednakową toksyczność wobec komórek roślinnych. Właściwości amyloidogenne posiadają również inne harpiny, m.in. HrpN wydzielane przez *Erwinia amylovora* oraz HrpZ, kluczowe w wirulencji *Pseudomonas syringae* pv. *syringa* [62]. Przykłady poznanych dotychczas białek amyloidowych wytwarzanych przez różne drobnoustroje przedstawia Tabela I.

2.3. Amyloidy grzybicze

Do grzybiczych amyloidów funkcjonalnych należą adhezyny Als (*Agglutinin-like sequence*), które są glikoproteinami kodowanymi przez osiem loci. Wszystkie glikoproteiny z rodziny Als posiadają strukturę złożoną z czterech charakterystycznych regionów, z pośród których domena T wykazuje właściwości amyloidu [70]. Adhezyny Als są istotnym czynnikiem wirulencji grzybów drożdżopodobnych, gdyż pośredniczą w adhezji, a następnie kolonizacji tkanek gospodarza. Podczas procesu biogenezy biofilmu adhezyny Als są odpowiedzialne za agregację komórek grzybiczych oraz wiązanie innych mikroorganizmów, co przyczynia się do utworzenia wielogatunkowego biofilmu [3, 84]. Ponadto, grzybicze amyloidy funkcjonalne odgrywają istotną rolę podczas rozwoju kandydoz inwazyjnych. Dzięki zdolności wiązania surowiczego amyloidu P (SAP) w organizmie gospodarza dochodzi do zahamowania odpowiedzi immunologicznej i ograniczenia nacieku złożonego z neutrofilów w miejscu wniknięcia do tkanki grzybów drożdżopodobnych. Powłoka zbudowana z amyloidu SAP, która powstaje na powierzchni grzybów uniemożliwia komórkom immunokompetentnym rozpoznanie obcych antygenów. Badania przeprowadzone przez Garcia-Sherman i wsp. [25, 26] wykazały, że proces tłumienia odpowiedzi immunologicznej zależy od kompleksów grzybiczych amyloidów z SAP jest również charakterystyczny dla innych zakażeń grzybiczych, tj. aspergilozy, mukormykozy oraz kokcydioidomykozy.

Hydrofobiny to grupa białek produkowanych wyłącznie przez grzyby strzępkowe. Agregacja w włókna amyloidowe jest charakterystyczna dla hydrofobin klasy II, które po spolimeryzowaniu pokrywają powierzchnię grzybni powietrznej, zapewniając jej wodoodporność. Co więcej, amyloidy zbudowane z monomerów hydrofobin umożliwiają rozprzestrzenianie zarodników w powietrzu oraz ich adhezję do powierzchni liści [52, 57]. Rola hydrofobin w chorobotwórczości człowieka jest słabo poznana. Aimanianda i wsp. [1] wykazali, że zarodniki grzybów z rodzajów *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* oraz *Aspergillus* nie pobudzają układu odpornościowego po dostaniu się do dróg oddechowych gospodarza dzięki powłoce złożonej z hydrofobin. Wpływ amyloidu na proces tłumienia odpowiedzi immunologicznej został dodatkowo potwierdzony w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, które wykazały, że zarodniki *Aspergillus fumigatus*, które nie posiadają hydrofobowej warstwy hydrofobin indukują maszyną odpowiedź ze strony układu odpornościowego gospodarza [1].

3. Podsumowanie

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaczy amyloidami funkcjonalnymi, tj. białkami, które formują włókna amyloidu na powierzchni drobnoustrojów.

Amyloidy wytwarzane przez bakterie i grzyby, podobnie jak toksyczne amyloidy ludzkie, powstają na drodze autoagregacji monomerów (podjednostek białkowych), ale w przeciwieństwie do nieprawidłowo połałdowanych, toksycznych włókien amyloidów ludzkich, wiele różnych grup drobnoustrojów wytwarza te białka w ściśle określonym celu, np. jako składnik macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu.

Jak dotychczas, rola poszczególnych amyloidów funkcjonalnych w patogenezie zakażeń człowieka jest słabo zbadana. Wnikliwe poznanie odpowiedzi immunologicznej organizmu człowieka na amyloidy syntezowane przez drobnoustroje mogłoby w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych metod leczenia licznych zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.

Piśmiennictwo

1. Aimanianda V., Bayry J., Bozza S., Knemeyer O., Perruccio K., Elluru S.R., Clavaud C., Paris S., Brakhage A.A., Kaveri S.V., Romani L., Latgé J.P.: Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, **460**, 1117–1121 (2009)
2. Alteri Ch.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L.: *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5145–5150 (2007)
3. Aoki W., Kitahara N., Miura N., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M.: Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (ALS) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 121–124 (2012)
4. Barak J.D., Gorski L., Naraghi-Aran P., Charkowski A.O.: *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5685–5691 (2005)
5. Barnhart M.M., Chapman M.R.: Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 131–147 (2006)
6. Bian Z., Brauner A., Li Y., Normark S.: Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* **181**, 602–612 (2000)
7. Bokranz W., Wang X., Tschäpe H., Römling U.: Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1171–1182 (2005)
8. Bordeau V., Felden B.: Curli synthesis and biofilm formation in enteric bacteria are controlled by a dynamic small RNA module made up of a pseudoknot assisted by an RNA chaperone. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4682–4696 (2014)
9. Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R.: A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* **59**, 1229–1238 (2006)
10. Cegelski L., Pinkner J.S., Hammer N.D., Cusumano C.K., Hung C.S., Chorell E., Åberg V., Walker J.N., Seed P.C., Almqvist F., Chapman M.R., Hultgren S.J.: Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chem. Biology*, **5**, 913–919 (2009)
11. Cheng N., He R., Tian J., Ye P.P., Ye R.D.: Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J. Immunol.* **181**, 22–26 (2008)
12. Chirwa N.T., Herrington M.B.: CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltrans-

- ferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **149**, 525–535 (2003)
13. Chiti F, Dobson C.M.: Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366 (2006)
 14. Cohen A.S., Calkins E.: Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, **183**, 1202–1203 (1959)
 15. Collinson S.K., Emödy L., Trust T.J., Kay W.W.: Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 4490–4495 (1992)
 16. de Jong W., Wösten H.A., Dijkhuizen L., Claessen D.: Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol. Microbiol.* **73**, 1128–1140 (2009)
 17. DeMarco M.L., Daggett V.: From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2293–2298 (2004)
 18. Dobson C.M.: Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329–332 (1999)
 19. Dueholm M.S., Petersen S.V., Sønderkær M., Larsen P., Christiansen G., Hein K.L., Enghild J.J., Nielsen J.L., Nielsen K.L., Nielsen P.H., Otzen D.E.: Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **77**, 1009–1020 (2010)
 20. Dueholm M.S., Søndergaard M.T., Nilsson M., Christiansen G., Stensballe A., Overgaard M.T., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Otzen D.E., Nielsen P.H.: Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiology*, **2**, 365–382 (2013)
 21. Ekkers D.M., Claessen D., Galli F., Stamhuis E.: Surface modification using interfacial assembly of the *Streptomyces* chaplin proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4491–4501 (2014)
 22. Evans M.L., Chorell E., Taylor J.D., Åden J., Götheson A., Li F., Koch M., Sefer L., Matthews S.J., Wittung-Stafshede P., Almqvist F., Chapman M.R.: The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. *Mol. Cell.* **57**, 445–455 (2015)
 23. Flårdh K., Buttner M.J.: *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 36–49 (2009)
 24. Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W.: Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* **4**, e6 (2006)
 25. Garcia-Sherman M.C., Lundberg T., Sobonya R.E., Lipke P.N., Klotz S.A.: A unique biofilm in human deep mycoses: fungal amyloid is bound by host serum amyloid P component. *NPJ Biofilms Microbiomes*, **1**, pii, 15009 (2015)
 26. Garcia-Sherman M.C., Lysak N., Filonenko A., Richards H., Sobonya R.E., Klotz S.A., Lipke P.N.: Peptide detection of fungal functional amyloids in infected tissue. *PLoS One*, **21**, e86067 (2014)
 27. Gebbink M.F., Claessen D., Bouma B., Dijkhuizen L., Wosten H.A.: Amyloids—a functional coat for microorganisms. *Nat. Rev.* **3**, 333–341 (2005)
 28. Gerstel U., Römling U.: Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella Typhimurium*. *Environ. Microbiol.* **3**, 638–648 (2001)
 29. Glabe C.G.: Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging*, **27**, 570–575 (2006)
 30. Go N.: The consistency principle in protein structure and pathways of folding. *Adv. Biophys.* **18**, 149–164 (1984)
 31. Goldwater P.N., Bettelheim K.A.: Curliated *Escherichia coli*, soluble curlin and the sudden infant death syndrome (SIDS). *J. Med. Microbiol.* **51**, 1009–1012 (2002)
 32. Gophna U., Barlev M., Seiffers R., Oelschläger T.A., Hacker J., Ron E.Z.: Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **69**, 2659–2665 (2001)
 33. Hammar M., Bian Z., Normark S.: Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6562–6566 (1996)
 34. Herbst F.A., Søndergaard M.T., Kjeldal H., Stensballe A., Nielsen P.H., Dueholm M.S.: Major proteomic changes associated with amyloid-induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Proteome. Res.* **14**, 720–781 (2015).
 35. Herczenik E., Gebbink M.F.: Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J.* **22**, 2115–2133 (2008)
 36. Hetz C., Bono M.R., Barros L.F., Lagos R.: Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2696–2701 (2002)
 37. Hinson G., Knutton S., Lam-Po-Tang M.K., McNeish A.S., Williams P.H.: Adherence to human colonocytes of an *Escherichia coli* strain isolated from severe infantile enteritis: molecular and ultrastructural studies of a fibrillar adhesin. *Infect. Immun.* **55**, 393–402 (1987)
 38. Hufnagel D.A., Tükel C., Chapman M.R.: Disease to dirt: the biology of microbial amyloids. *PLoS Pathog.* **9**, e1003740 (2013)
 39. Hung C., Marschall J., Burnham C.A., Byun A.S., Henderson J.P.: The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PLoS One*, **9**, e86009 (2014)
 40. Johansson C., Nilsson T., Olsén A., Wick M.J.: The influence of curli, a MHC-I-binding bacterial surface structure, on macrophage-T cell interactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30**, 21–29 (2001)
 41. Kai-Larsen Y., Lühje P., Chromek M., Peters V., Wang X., Holm A., Kádas L., Hedlund K.O., Johansson J., Chapman M.R., Jacobson S.H., Römling U., Agerberth B., Brauner A.: Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog.* **6**, e1001010 (2010)
 42. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 12–40 (2004)
 43. Kikuchi T., Mizunoe Y., Takade A., Naito S., Yoshida S.: Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol. Immunol.* **49**, 875–884 (2005)
 44. Klein R.D., Hultgren S.J.: Chaos controlled: discovery of a powerful amyloid inhibitor. *Mol. Cell.* **57**, 391–393 (2015)
 45. Klunk W.E., Jacob R.F., Mason R.P.: Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* **309**, 285–305 (1999)
 46. Kudinha T., Johnson J.R., Andrew S.D., Kong F., Anderson P., Gilbert G.L.: Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **32**, 543–548 (2013)
 47. Lagos R., Wilkens M., Vergara C., Cecchi X., Monasterio O.: Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membrane. *FEMS Lett.* **321**, 145–148 (1993)
 48. Larsen P., Nielsen J.L., Dueholm M.S., Wetzel R., Otzen D., Nielsen P.H.: Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ. Microbiol.* **9**, 3077–3090 (2007)
 49. Levine H.R.: Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **309**, 274–284 (1999)
 50. Liu S., Liu Y., Hao W., Wolf L., Kiliaan A.J., Penke B., Rübke C.E., Walter J., Heneka M.T., Hartmann T., Menger M.D., Fassbender K.: TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid β peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol.* **188**, 1098–1107 (2012)

51. Liu Z., Niu H., Wu S., Huang R.: CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* DOI: 10.1038/emi.2014
52. Macindoe I., Kwan A.H., Ren Q., Morris V.K., Yang W., Mackay J.P., Sunde M.: Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 804–811 (2012)
53. Mansan-Almeida R., Pereira A.L., Giugliano L.G.: Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* **13**, 22 (2013)
54. Marcoleta A., Marín M., Mercado G., Valpuesta J.M., Monasterio O., Lagos R.: Microcin e492 amyloid formation is retarded by posttranslational modification. *J. Bacteriol.* **195**, 3995–4004 (2013)
55. McCrate O.A., Zhou X., Cegelski L., Curcumin as an Amyloid-indicator Dye in *E. coli*. *Chem. Commun. (Camb)*. **49**, 4193–4195 (2013)
56. Moore R.A., Hayes S.F., Fischer E.R., Priola S.A.: Amyloid formation via supramolecular peptide assemblies. *Biochemistry*, **46**, 7079–7087 (2007)
57. Morris V.K., Ren Q., Macindoe I., Kwan A.H., Byrne N., Sunde M.: Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **286**, 15955–15963 (2011)
58. Naidoo N., Ramsugit S., Pillay M.: Mycobacterium tuberculosis pili (MTP), a putative biomarker for a tuberculosis diagnostic test. *Tuberculosis*, **94**, 338–345 (2014)
59. Nishimori J.H., Newman T.N., Oppong G.O., Rapsinski G.J., Yen J.H., Biesecker S.G., Wilson R.P., Butler B.P., Winter M.G., Tsois R.M., Ganea D., Tükel Ç.: Microbial amyloids induce interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 responses via Toll-like receptor 2 activation in the intestinal mucosa. *Infect. Immun.* **80**, 4398–4408 (2012)
60. Nordstedt C., Näslund J., Tjernberg L.O., Karlström A.R., Thyberg J., Terenius L.: The Alzheimer A beta peptide develops protease resistance in association with its polymerization into fibrils. *J. Biol. Chem.* **269**, 30773–30776 (1994)
61. Norinder B.S., Köves B., Yadav M., Brauner A., Svanborg C.: Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? *Microb. Pathog.* **52**, 10–16 (2012)
62. Oh J., Kim J.G., Jeon E., Yoo C.H., Moon J.S., Rhee S., Hwang I.: Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* **282**, 13601–13609 (2007)
63. Oli M.W., Otoo H.N., Crowley P.J., Heim K.P., Nascimento M.M., Ramsook C.B., Lipke P.N., Brady L.J.: Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, **158**, 2903–2916 (2012)
64. Olsén A., Herwald H., Wikström M., Persson K., Mattsson E., Björck L.: Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34568–34572 (2002)
65. Olsén A., Herwald H., Wikström M., Persson K., Mattsson E., Björck L.: Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34568–34572 (2002).
66. Olsén A., Jonsson A., Normark S.: Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, **338**, 652–655 (1989)
67. Olsén A., Wick M.J., Mörgelin M., Björck L.: Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* **66**, 944–949 (1998)
68. Oppong G.O., Rapsinski G.J., Tursi S.A., Biesecker S.G., Klein-Szanto A.J.P., Goulian M., McCauley C., Healy C., Wilson R.P., Tükel C.: Biofilm-associated bacterial amyloids dampen inflammation in the gut: oral treatment with curli fibres reduces the severity of hapten-induced colitis in mice. *npj Biofilms and Microbiomes*, DOI:10.1038/npjbiofilms.2015.19
69. Osheroich L.Z., Weissman J.S.: Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI(+)] prion. *Cell*, **106**, 183–194 (2001)
70. Otoo H.N., Lee K.G., Qiu W., Lipke P.N.: *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot. Cell*, **7**, 776–782 (2008)
71. Pawar D.M., Rossman M.L., Chen J.L.: Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 418–425 (2005)
72. Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A.: Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5591–5595 (2002)
73. Ramsugit S., Guma S., Pillay B., Jain P., Larsen M.H., Danaviah S., Pillay M.: Pili contribute to biofilm formation *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **104**, 725–735 (2013)
74. Ramsugit S., Pillay B., Pillay M.: Evaluation of the role of *Mycobacterium tuberculosis* pili (MTP) as an adhesin, invasin, and cytokine inducer of epithelial cells. *Braz. J. Infect. Dis.* **20**, 160–165 (2016)
75. Rapsinski G.J., Wynosky-Dolfi M.A., Oppong G.O., Tursi S.A., Wilson R.P., Brodsky I.E., Tükel Ç.: Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect. Immun.* **83**, 693–701 (2015)
76. Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R.: Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2230–2234 (2010)
77. Romero D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.: An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibers in *B. subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.* **80**, 1155–1168 (2011)
78. Romero D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.: Functional analysis of the accessory protein TapA in *Bacillus subtilis* amyloid fiber assembly. *J. Bacteriol.* **196**, 1505–1513 (2014)
79. Römling U., Rohde M., Olsén A., Normark S., Reinköster J.: AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* **36**, 10–23 (2000)
80. Ryu J.H., Kim H., Frank J.F., Beuchat L.R.: Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 359–362 (2004)
81. Schwartz K., Ganesan M., Payne D.E., Solomon M.J., Boles B.R.: Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol. Microbiol.* **99**, 123–134 (2016)
82. Schwartz K., Syed A.K., Stephenson R.E., Rickard A.H., Boles B.R.: Functional amyloids composed of phenol soluble modulus stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* **8**(6):e1002744 (2012)
83. Shahnawaz M., Soto C.: Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species. *J. Biol. Chem.* **287**, 11665–11676 (2012)
84. Sheppard D.C., Yeaman M.R., Welch W.H., Phan Q.T., Fu Y., Ibrahim A.S., Filler S.G., Zhang M., Waring A.J., Edwards J.E. Jr.: Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 30480–30489 (2004)
85. Sipe J.D., Cohen A.S.: Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000)
86. Sitaras C., Naghavi M., Herrington M.B.: Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis for the detection and isolation of amyloid curli fibers. *Anal. Biochem.* **408**, 328–331 (2011)

87. Smith J.F., Knowles T.P., Dobson C.M., Macphee C.E., Welland M.E.: Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15806–15811 (2006)
88. Sobieszkańska B.M., Dobrowolska M.: Synteza fimbrii curli przez szczepy *Escherichia coli* izolowane z przypadków biegunek dziecięcych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **56**, 239–244 (2005)
89. Stöver A.G., Driks A.: Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J. Bacteriol.* **181**, 1664–1672 (1999)
90. Syed A.K., Boles B.R.: Fold modulating function: bacterial toxins to functional amyloids. *Front. Microbiol.* **5**, 401 (2014)
91. Tükel C., Nishimori J.H., Wilson R.P., Winter M.G., Keestra A.M., van Putten J.P., Bäumlner A.J.: Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell. Microbiol.* **12**, 1495–1505 (2010)
92. Tükel C., Raffatellu M., Humphries A.D., Wilson R.P., Andrews-Polymeris H.L., Gull T., Figueiredo F., Wong M.H., Michelsen K.S., Akçelik M., Adams L.G., Bäumlner A.J.: CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol. Microbiol.* **58**, 289–304 (2005)
93. Uhlich G.A., Keen J.E., Elder R.O.: Mutations in the csgD promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2367–2370 (2001)
94. Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune P.: Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* **180**, 2442–2449 (1998)
95. Wang X., Rochon M., Lamprokostopoulou A., Lünsdorf H., Nitz M., Römling U.: Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2352–2363 (2006)
96. Westwell-Roper C., Ehses J.A., Verchere B.C.: Activation of Toll-like receptor 2 by islet amyloid polypeptide: a trigger for islet inflammation in type 2 diabetes? *Can. J. Diabetes*, **36**, S18 (2012)
97. Zhou Y., Smith D.R., Hufnagel D.A., Chapman M.R.: Experimental manipulation of the microbial functional amyloid called curli. *Methods Mol. Biol.* **966**, 53–75 (2013)
98. Zogaj X., Bokranz W., Nitz M., Römling U.: Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun.* **71**, 4151–4158 (2003)