

Aneta Dobosz¹, Katarzyna M. Bocian-Ostrzycka¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

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

Wpłynęło we wrześniu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Modelowy system szlaku utleniania Dsb *Escherichia coli*. 2.1. Charakterystyka białek EcDsbA i EcDsbB. 2.2. Szlaki utleniania i izomeryzacji/redukcji *E. coli*. 2.3. Rola motywu CXXC i pętli cis-Pro151 białka EcDsbA. 3. Różnorodność bakteryjnych szlaków oksydacji białek. 3.1. Zwiokrotniona liczba białek DsbA. 3.2. Różnorodność strukturalna monomerycznych białek DsbA. 3.3. Dimeryczne oksydoreduktazy DsbA. 3.4. Obecność lub brak białka pełniącego funkcję EcDsbB. 4. Specyficzność substratowa oksydoreduktaz DsbA. 4.1. Metody poszukiwania i lokalizacja substratów. 4.2. Czynniki wirulencji. 5. Inne systemy Dsb. 6. Podsumowanie

Diversity of the Dsb (disulfide bond) oxidative protein folding pathways in microbial world

Abstract: The introduction of structural disulfide bonds is crucial to the stability and activity of many extra-cytoplasmic proteins. The disulfide bond formation is a rate-limiting step in the folding process of a protein. However, most microorganisms encode a machinery to catalyse this oxidative protein folding step. In prototypic *Escherichia coli* oxidative pathway, the introduction of disulfide bridges into folding proteins is mediated by the thioredoxin family members – Dsb system proteins. Correct oxidative protein folding in the *E. coli* envelope depends on both EcDsbA and EcDsbB. Periplasmic oxidoreductase EcDsbA is a key disulfide bond formation catalyst, which is maintained in its active form by membrane-bound protein EcDsbB. To date, over 300 EcDsbA homologues from different bacterial organisms have been identified. Nevertheless, the structure, function and interactions of EcDsbA still remain the best studied. The rapidly expanding number of sequenced bacterial genomes has revealed dramatic differences between the model *E. coli* oxidative pathway and the pathway in other microorganisms. In this article, we review current knowledge about EcDsbA and focus on the diversity of the disulfide bond generation pathways functioning in the microbial world.

1. Introduction. 2. The classical *Escherichia coli* thiol oxidizing pathway. 2.1. Characteristics of EcDsbA and EcDsbB proteins. 2.2. *E. coli* oxidative and isomerization/reduction pathways. 2.3. The role of EcDsbA CXXC motif and cis-Pro151 loop. 3. Variety of bacterial oxidative pathways. 3.1. Multiplied number of DsbAs. 3.2. Structural diversity of monomeric DsbA proteins. 3.3. Dimeric DsbA oxidoreductases. 3.4. The presence or absence of a protein acting as EcDsbB. 4. Substrate specificity of DsbA oxidoreductases. 4.1. Procedures for DsbA substrates identification and methods of location analysis. 4.2. Virulence associated with DsbA substrates. 5. Other Dsb systems. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: bakteryjny szlak utleniania, białka Dsb, EcDsbA, mostki disiarczkowe

Keywords: Dsb proteins, EcDsbA, disulfide bonds, bacterial oxidative pathway

1. Wprowadzenie

Potranslacyjna modyfikacja białek jest istotnym procesem biologicznym decydującym o strukturze, stabilności i funkcjonalności wielu białek. Jedną z najczęściej występujących modyfikacji jest generowanie mostków disiarczkowych, polegające na utlenianiu wolnych grup tiolowych cystein, z jednoczesnym uwolnieniem dwu elektronów. Wiązania disiarczkowe obniżają entropię konformacyjną, stabilizują strukturę trzeciorzędową i czwartorzędową białek, podnoszą ich temperaturę topnienia, chronią białka przed degradacją przez proteazy, a także, poprzez zmianę ładunku powierzchniowego i specyficzności substratowej, pełnią funkcje regulatorowe. Co więcej, odwracalny charakter wprowadzania mostków disiarczkowych stanowi mechanizm sygnalizacyjny potencjału redoks [4].

W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces tworzenia wiązań disiarczkowych zachodzi w utleniających warunkach panujących w przestrzeni peryplazmatycznej. Generowanie mostków disiarczkowych jest etapem ograniczającym szybkość fałdowania białek. Proces ten *in vivo* jest katalizowany przez zespół białek Dsb (*disulfide bond*), dzięki czemu odbywa się on nawet w kilka sekund po syntezie białka i transporcie poza redukujące środowisko cytoplazmy [52, 63]. Pierwszym opisanym i jak dotąd najlepiej poznany katalizatorem reakcji w komórkach bakteryjnych jest zidentyfikowana we wczesnych latach 90-tych w komórkach *Escherichia coli* K-12 oksydoreduktaza EcDsbA. Analiza wielu aktualnie dostępnych sekwencji nukleotydowych genomów bakteryjnych, udokumentowała ogromną różnorodność systemów Dsb funkcjonujących w komórkach innych niż *E. coli* mikroorganizmów [34].

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

2. Modelowy system szlaku utleniania Dsb *Escherichia coli*

Z wyjątkiem kilku bezwzględnych beztlenowców preferujących środowisko redukujące, wiele bakterii wykształciło szlaki katalityczne umożliwiające im wprowadzanie wiązań -S-S- do struktury białek pozacytoplazmatycznych. System oksydacyjny, funkcjonujący na terenie peryplazmy, znany powszechnie jako system Dsb (*disulfide bond formation system*) został najlepiej poznany i scharakteryzowany u *E. coli* K-12. Oksydoreduktaza EcDsbA, wraz z kilkoma innymi białkami (DsbA-G) zaliczanymi do tego systemu, została zaklasyfikowana do podrodziny tioredoksyn I. Wszystkie zaliczane do niej białka charakteryzują się występowaniem umiejscowionego w domenie tioredoksynowej (TRX) ściśle konserwowanego, aktywnego motywu CXXC (X oznacza dowolny aminokwas) oraz charakterystyczną budową przestrzenną. Łańcuch tioredoksyny składa się z pięciu β -katek otoczonych czterema α -helisami, podzielonymi ze względu na umiejscowienie – na N-końcu struktury: $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$, a na C-końcu: $\beta_4\beta_5\alpha_4$. Końce połączone są α_3 -helisą [9, 61].

2.1. Charakterystyka białek EcDsbA i EcDsbB

Charakterystyka strukturalna monomerycznego białka DsbA *E. coli* K-12 o masie 21 kDa wykazała zasadnicze różnice pomiędzy strukturą EcDsbA, a klasycznej tioredoksyny. Analiza krystalograficzna ujawniła, że w skład EcDsbA wchodzi pięć skręconych β -katek umiejscowionych pomiędzy siedmioma α -helisami. Wykazano również, że pętla pomiędzy α_6 -helisą, a β_4 -kartką w zwoju tioredoksynowym jest kluczowa do zachowania prawidłowej funkcji i stabilności białka, a umiejscowiona w jej obrębie Pro151 w konformacji *cis*, odległa w strukturze pierwszorzędowej, znajduje się blisko aktywnego motywu Cys30-Pro31-His32-Cys33 (CPHC) w sfałdowanym białku. Powyżej motywu katalitycznego zlokalizowano wstawioną α -helikalną domenę, która najprawdopodobniej zaangażowana jest w proces wiązania i rozpoznawania substratów. Ponadto na powierzchni EcDsbA, poniżej aktywnego motywu CPHC, biegnie hydrofobowy rowek złożony z szeregu aminokwasów aromatycznych i alifatycznych, pełniący istotną rolę w cyklu katalitycznym oksydoreduktazy – jej wiązaniu i reoksydacji przez partnera redoks – błonowe białko EcDsbB [63].

Białko EcDsbA jest jednym z najsilniejszych oksydantów tiolowych, o potencjale redoks $E^{\circ} = -120$ mV, wprowadzającym mostki disiarczkowe w białkach substratowych szybko, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Aktywność EcDsbA zależy nie tylko od jego właściwości biofizycznych, ale także od aminokwasów oddzielających zlokalizowane w N-końcowej części pierwszej α_1 -helisy zwoju tioredoksynowego cysteiny

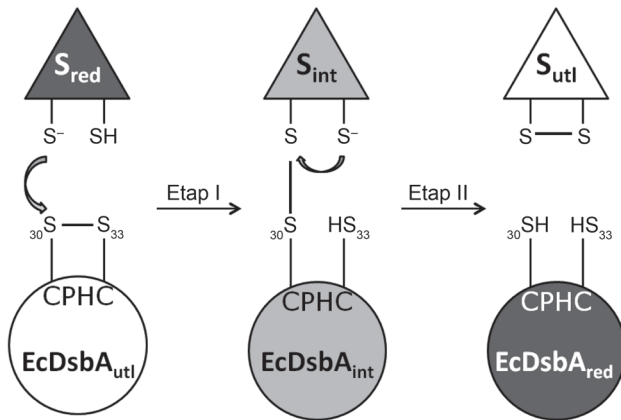
(Cys30 i Cys33) motywu katalitycznego. Wyeksponowana na powierzchni białka Cys30 posiada niską wartość $pK_a \sim 3,3$ (standardowe pK_a dla cysteiny wynosi ~ 9) i pozostaje w formie anionu tiolowego w pH fizjologicznym. Anion ten jest stabilizowany poprzez wiązanie wodorowe powstające pomiędzy His32 a Cys30 motywu aktywnego, wówczas gdy EcDsbA jest w stanie zredukowanym, co skutkuje mniejszą stabilnością tego białka w formie utlenionej. Różnica pomiędzy stabilnością form zredukowanej i utlenionej, która często preferowana jest przez substraty EcDsbA generuje siłę termodynamiczną, która pozwala na transfer mostków disiarczkowych z EcDsbA na białka substratowe [34].

Za utrzymanie oksydoreduktazy EcDsbA w aktywnej, utlenionej formie odpowiedzialne jest błonowe białko EcDsbB o masie ok. 20 kDa, czerpiące siłę oksydacyjną ze współpracy z łańcuchem oddechowym. EcDsbB wykorzystuje jako akceptor elektronów zarówno ubichinon w warunkach tlenowych jak i menachinon w warunkach anaerobowych, co pozwala na sprawne funkcjonowanie systemu EcDsbAB niezależnie od obecności tlenu [28].

Białko EcDsbB nie posiada charakterystycznego dla tioredoksyny układu przestrzennego. W strukturze trzeciorzędowej EcDsbB wyróżniono cztery helisy transmembranowe (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne krótszą P1 i dłuższą P2 w obrębie których występują dwie aktywne pary cystein: Cys41-Cys44 w pętli P1 oraz Cys104-Cys130 w pętli P2 [31]. Dodatkowo w C-końcowym fragmencie pętli P2 następuje wypętlanie aminokwasów w pozycjach od 116 do 120, co generuje powstanie dwóch krótszych pętli: P2 zawierającej Cys104 oraz P2' w której umiejscowiona jest Cys130. Zapewnia to skuteczniejsze zakotwiczenie białka EcDsbB w błonie wewnętrznej komórek bakteryjnych oraz dzięki odseparowaniu aktywnych cystein, szybszą reoksydację EcDsbA [29]. Pętla P1 jest nieznacznie wygięta, przez co dochodzi do powstania pomiędzy pętlami TM1 a TM4 rowka akceptorowego dla ubichinonu. Rowek, ten umiejscowiony w bliskim sąsiedztwie Cys41-Cys44 zapewnia ich utlenienie, a znajdująca się również w jego pobliżu Arg48 jest kluczowa przy transporcie elektronów z EcDsbB na chinon [16].

2.2. Szlaki utleniania i izomeryzacji/redukcji *E. coli*

W komórkach *E. coli* procesy wprowadzania i redukcji mostków disiarczkowych zachodzą w jednym przedziale komórkowym. Dzięki barierze kinetycznej, niekorzystne interakcje pomiędzy poszczególnymi elementami obydwu szlaków, prowadzące do zbyt dużego zużycia energii metabolicznej są zminimalizowane [2]. Dwuetapowa reakcja wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek transportowanych do peryplazmy (rys. 1) rozpoczyna się nukleofilowym atakiem cysteiny białka substratowego na N-terminalną cysteinę



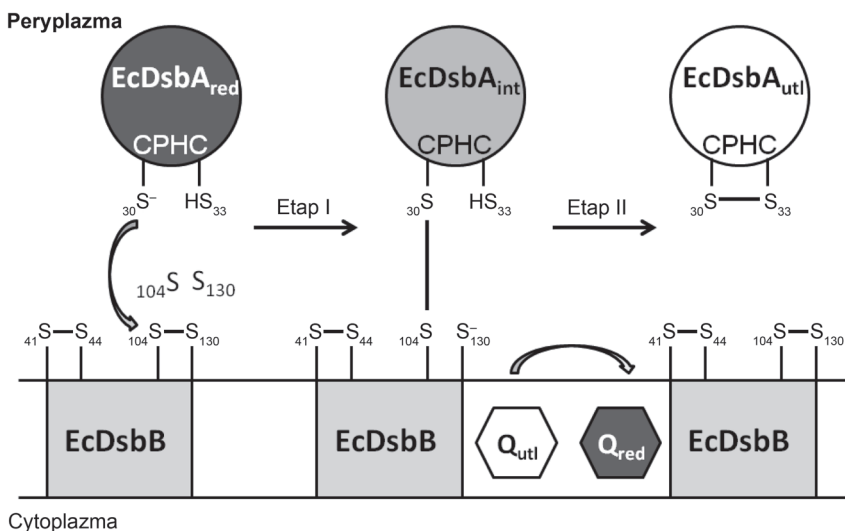
Rys. 1. Proces wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek substratowych w komórkach *E. coli* przez oksydoreduktazę EcDsbA (objaśnienia w tekście). Użyte oznaczenia: S – substrat; utl – białko w stanie utlenionym; red – białko w stanie zredukowanym; int – kompleks EcDsbA-substrat.

(Cys30) motywu CPHC EcDsbA, co skutkuje utworzeniem przejściowej struktury – połączonego EcDsbA, z białkiem docelowym (zredukowanym substratem). W następnym etapie kolejna deprotonowana cysteina substratu przeprowadza atak na cysteinę połączoną z DsbA, w wyniku czego następuje jego utlenienie i redukcja EcDsbA [13].

Za reutlenienie EcDsbA do jego aktywnej formy odpowiada błonowe białko EcDsbB, będące jego partnerem redoks. N-końcowa część pętli peryplazmatycznej P2 EcDsbB wiąże się do biegnącego poniżej motywu katalitycznego DsbA powierzchniowego, hydrofobowego rowka. Reakcja inicjowana jest poprzez nukleofilowy atak Cys30 motywu katalitycznego EcDsbA na Cys104-Cys130, co skutkuje utworzeniem przejściowego mostka disiarczkowego pomiędzy Cys30(EcDsbA)-Cys104(EcDsbB). Opublikowane struktury trzeciorzędowe kompleksów EcDsbA-EcDsbB wykazały także, że za powstanie mieszanego wiązania pomiędzy enzymami są odpowiedzialne również inne (oprócz aktyw-

nych cystein) aminokwasy. Zidentyfikowano 26 miejsc wiązania EcDsbA do EcDsbB (po 13 na każde białko). Między Arg148 EcDsbA, a Phe106 EcDsbB tworzone jest wiązanie wodorowe. Reszta oddziaływała ma charakter hydrofobowy [28, 30, 63]. Po reutlenieniu EcDsbA i jego uwolnieniu z przejściowego kompleksu, zredukowane w efekcie reakcji grupy tiolowe cystein 104 i 130 EcDsbB są utleniane przez parę reszt cysteinowych z pętli pierwszej (Cys41-Cys44), a elektrony transferowane są najpierw na chinon, a następnie na ich ostateczny akceptor (tlen w warunkach aerobowych lub fumaran/azotan w warunkach beztlenowych) [47]. Reakcja reutlenia białka EcDsbA przez EcDsbB została przedstawiona na rys. 2.

W przypadku białek zawierających więcej niż jedną parę cystein w cząsteczce położonych blisko siebie w strukturze pierwszorzędowej, EcDsbA działające szybko, często katalizuje wprowadzenie niewłaściwych wiązań disiarczkowych. Za ich usuwanie bądź rearanżację odpowiadają białka działające w szlaku izomeryzacji/redukcji. Główną izomerazą szlaku jest peryplazmatyczne, homodimeryczne (2 × 23 kDa) białko EcDsbC o kształcie litery V, które pozostaje aktywne w formie zredukowanej. Każdy z monomerów białka zawiera w swojej N-końcowej części domenę dimeryzacyjną, a w C-końcowej zwój tioredoksynowy z motywem CXXC, (Cys98 i Cys101) o właściwościach katalitycznych. Dwie inne cysteiny obecne w EcDsbC (Cys141 i Cys163) pełnią funkcję strukturalną. Po związaniu substratu do powstającej po połączeniu N-końcowych domen EcDsbC hydrofobowej kieszeni, Cys98 przeprowadza atak nukleofilowy na nieprawidłowo utworzone wiązanie disiarczkowe. W rezultacie powstaje kompleks przejściowy katalizatora z białkiem substratowym. Następnie, w zależności od pełnionej przez EcDsbC funkcji, przejściowe wiązanie jest rozrywane przez kolejną cysteinę substratu, przy czym w jego cząsteczce tworzy się stabilniejszy mostek disiarczkowy, a EcDsbC pozostaje w formie zredukowanej (EcDsbC



Rys. 2. Reakcja reutlenia EcDsbA przez EcDsbB (objaśnienia w tekście). Użyte oznaczenia: Q – chinon; utl – białko w stanie utlenionym; red – białko w stanie zredukowanym; int – kompleks EcDsbA-EcDsbB.

działa jak izomeraza). Alternatywnie, Cys104 aktywnego motywu EcDsbC usuwa błędnie wprowadzone wiązanie disiarczkowe w substracie pozostawiając go w formie zredukowanej. W tym przypadku EcDsbC ulega utlenieniu (działa jak reduktaza) [13].

Za przywrócenie białka EcDsbC do jego aktywnej, zredukowanej formy odpowiada 59 kDa, monomeryczne białko EcDsbD umiejscowione w błonie wewnętrznej, złożone z trzech odległych strukturalnie domen DsbD α , DsbD β i DsbD γ , przy czym każda z nich zawiera parę cystein niezbędnych do funkcjonowania białka. EcDsbD czerpie siłę redukcyjną niezbędną do utrzymania substratów w aktywnej formie z NADPH i tioredoksyny 1 (TrxA) przy udziale reduktazy tioredoksyny TrxB. Substratami dla EcDsbD, oprócz EcDsbC, są również CcmG (DsbE) – oksydoreduktaza zaangażowana w proces dojrzewania cytochromu c oraz homologiczne do EcDsbC białko EcDsbG (24% podobieństwo sekwencji aminokwasowej). Pomimo podobieństwa struktur trzeciorzędowych homodimerycznego białka EcDsbG (2 \times 27 kDa) do białka EcDsbC, EcDsbG wykazuje węższą w porównaniu do EcDsbC specyficzność substratową. Główną rolę pełnią przez EcDsbG jest kontrolowanie zawartości kwasu sulfenowego w peryplazmie, a co za tym idzie ochrona białek posiadających w swojej cząsteczce jedną cysteinę przed sulfenylacją w czasie ekspozycji na reaktywne formy tlenu (ROS). Udokumentowano, że EcDsbG współdziała z trzema transpeptydazami, odpowiadającymi za sieciowanie peptydoglikanu [13, 15, 47].

2.3. Rola motywu CXXC i pętli *cis*-Pro151 białka EcDsbA

Konserwowany motyw CXXC obecny w sekwencji aminokwasowej tiolowych oksydoreduktaz odpowiada za funkcjonalne właściwości białka oraz determinuje jego potencjał redoks. Prawidłowe funkcjonowanie tego centrum katalitycznego uwarunkowane jest zarówno przez aktywne cysteiny, jak i aminokwasy je oddzielające. Wiele grup badawczych skupiło się na wyjaśnieniu roli poszczególnych elementów tego motywu w przypadku EcDsbA (motyw katalityczny: Cys30-Pro31-His32-Cys33). Poddane analizie mutanty C30A i C33A w białku EcDsbA, gdzie aktywne cysteiny sekwencji CXXC zastąpiono alaniną, wykazały, że zarówno mutant podwójny jak i mutant EcDsbA C30A nie posiadają aktywności katalitycznej. W przypadku mutantu EcDsbA C33A udokumentowano, że jest on zdolny do wprowadzania mostków disiarczkowych do zredukowanej formy inhibitora trombiny – hirudyny, z wydajnością bliską białku natywnemu oraz tworzy stabilny kompleks z EcDsbB [70]. Rozwiązanie struktury kryształów zmutowanego EcDsbA C33A przyniosło interesujące rezultaty. Wykazano, że monomeryczne EcDsbA C33A są zdolne do łączenia się w dimery

poprzez tworzenie mostków disiarczkowych pomiędzy wolnymi cysteinami C30. Zaobserwowano także zmianę izomeryzacji *trans/cis* P31 motywu katalitycznego oraz konformacyjne rearanżacje hydrofobowego rowka odpowiedzialnego za wiązanie substratów [53].

Bioinformatyczne analizy dipeptydu oddzielającego aktywne cysteiny motywu CXXC wykazały wysoki poziom konserwacji P31 (85% scharakteryzowanych struktur białek DsbA) i preferencję aminokwasu zasadowego lub aromatycznego w pozycji X32. Najprawdopodobniej P31 jest istotna ze względu na generowanie odpowiedniej geometrii w pobliżu aktywnego motywu CXXC – odpowiada za łamanie α 1-helisy i tworzenie dipolu na jej końcu, co ma wpływ na siłę oksydacyjną EcDsbA [57]. P31, w przeciwieństwie do H32, nie jest bezpośrednio zaangażowana w utrzymanie niskiego pKa C30 i większej stabilności EcDsbA w zredukowanej formie. Wykazano, że histydyna ze względów sterycznych (długość łańcucha, konformacja) jest najskuteczniejszym z badanych aminokwasów mogącym tworzyć długotrwałe wiązanie wodorowe z anionem tiolowym C30 [37].

Kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu białka EcDsbA pełni również pętla *cis*-Pro151, odpowiedzialna za jego stabilność, właściwości redoks oraz zaangażowana w rozpoznawanie substratów. Analizy mutantów EcDsbA P151A (prolinę w pozycji 151 łańcucha polipeptydowego zastąpiono alaniną) wykazały, że substytucja ta skutkuje zmianą orientacji przestrzennej pętli oddziałującej z ligandami oraz zmniejszeniem siły oksydacyjnej EcDsbA w porównaniu z białkiem natywnym. Zarówno w przypadku mutantów EcDsbA P151A, jak i innych aminokwasów w tej pozycji, zaobserwowano akumulację przejściowych, połączonych mieszanym wiązaniem disiarczkowym, kompleksów EcDsbA-EcDsbB. Co więcej, mutacja EcDsbA P151T skutkowałą nagromadzeniem się intermediatów DsbA-substrat [5, 35]. W obrębie podrodzin tioredoksyn stwierdzono również konserwację pozycji aminokwasowej Pro-minus1, kontrolującej i modyfikującej właściwości katalityczne aktywnych cystein motywu CXXC. W przypadku EcDsbA zamiana waliny (V150) na występującą zazwyczaj w tym miejscu w sekwencji aminokwasowej izomeraż DsbC i DsbG treoninę (mutant EcDsbA V150T), zwiększała właściwości utleniające tego białka. Sugeruje to rolę V150 w pętli VcP w utrzymaniu równowagi pomiędzy zdolnością EcDsbA do utleniania substratów i reoksydacji przez EcDsbB [58].

3. Różnorodność bakteryjnych szlaków oksydacji białek

Porównanie sekwencji genomów 421 organizmów bakteryjnych pozwoliło na identyfikację 330 homologów białka EcDsbA [63]. Rozpuszczalne białka DsbA

bakterii Gram-ujemnych zazwyczaj lokalizują się w peryplazmie, podczas gdy ich homologi u bakterii Gram-dodatnich mają często postać lipoprotein i są związane z błoną komórkową [38]. Analizy bioinformatyczne wykazały również, że niektóre bakterie (szczególnie Gram-ujemne patogeny) posiadają w swoim proteomie więcej niż jeden homolog DsbA, a każdy z nich spełnia specyficzną rolę w procesie oksydacyjnego zwijania białek.

3.1. Zwielokrotniona liczba białek DsbA

W genomie *Neisseria meningitidis*, będącej czynnikiem etiologicznym meningokokowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zidentyfikowano trzy geny kodujące białka DsbA przy obecności jednego białka DsbB: dwie lipoproteiny – NmDsbA1 i NmDsbA2 oraz peryplazmatyczne NmDsbA3. NmDsbA1 i NmDsbA2 są podobnych rozmiarów, wykazują względem siebie duże podobieństwo w sekwencji aminokwasowej (73%), co sugeruje, że geny je kodujące mogły ulec w toku ewolucji duplikacji. Podobnie jak EcDsbA, posiadają katalityczny motyw CPHC. NmDsbA3 jest mniejsze, wykazuje względem NmDsbA1 i NmDsbA2 50%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej i charakteryzuje się innym centrum aktywnym – CVHC [64, 65]. Wszystkie trzy białka posiadają motyw TcP, w przeciwieństwie do występującego w EcDsbA VcP. Treonina obecna w motywie TcP odpowiada za wyjątkowe właściwości redoks białek DsbA *N. meningitidis*. NmDsbA są enzymami o najwyższym potencjale oksydacyjnym wśród podrodziny tioredoksyn ($E^{\circ} = -80$ mV), stabilnymi w formie zredukowanej. Rozwiązane drogą krystalografii struktury białek NmDsbA1 i NmDsbA3 okazały się być podobne, a główną różnicę stanowi orientacja helis w domenie TRX. Kryształ białka NmDsbA2 nie został jak dotąd otrzymany, jednak najprawdopodobniej, ze względu na obserwowane fizyko-chemiczne podobieństwa białek, jego właściwości są zbliżone do NmDsbA1 [42, 68, 69]. Substratem dla NmDsbA1 i NmDsbA2 jest sekretyna PilQ, zaangażowana w biogenezę pili typu IV oraz odpowiedzialna za wiązanie DNA i jego transport do komórki *Neisseria*. Szczep *N. meningitidis* pozbawiony genów *dsbA1* i *dsbA2* wykazuje obniżoną zdolność do adhezji. NmDsbA1 częściowo komplementuje brak zdolności do ruchu mutantu $\Delta dsbA$ *E. coli*, a NmDsbA2 całkowicie komplementuje brak EcDsbA w teście pomiaru aktywności alkalicznej fosfatazy. Substraty dla NmDsbA3 nie zostały jak dotąd poznane [64].

Kolejnym mikroorganizmem posiadającym trzy paralogi białka DsbA jest *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (Se). Białka nazwane SeDsbA, SeDsbL i SeSrgA charakteryzują się niską identycznością sekwencji aminokwasowej względem siebie (18–36%), co jest powodem ich unikalnych właściwości i odmiennej roli w procesie patogenezы. Wszystkie trzy białka mają budowę

dwudomenową i posiadają strukturę homologiczną do EcDsbA, różnią się natomiast właściwościami redoks, aminokwasami oddzielającymi cysteiny motywu katalitycznego oraz położeniem i aminokwasami w pozycji Pro-minus1. Są to odpowiednio dla SeDsbA: CPHC i VcP, dla SeDsbL: CPFC i VcP, dla SeSrgA: CPPC i TcP. SeDsbA charakteryzuje się najszerszą specyficznością substratową (między innymi białko rzęski FlgI) i tworzy funkcjonalną parę redoks z SeDsbB, podczas gdy jedynym ligandem dla SeDsbL (tworzy parę z SeDsbI) jest ASST (sulfotransferaza arylosulfatu). Dla kodowanego na plazmidzie wirulencji SeSrgA substrat stanowi główna podjednostka fimbrii adhezyjnych Pef [25].

Mikroorganizmem, charakteryzującym się obecnością unikalnej ścieżki utleniania białek jest także *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) – oportunistyczny patogen często infekujący chorych na mukowiscydozę oraz pacjentów z zaburzeniami w funkcjonowaniu układu immunologicznego. W proteomie tej bakterii zidentyfikowano dwie peryplazmatyczne oksydoreduktazy DsbA – PaDsbA1 i PaDsbA2 oraz dwa homologi białek DsbB – PaDsbB1 i PaDsbB2. PaDsbA1 jest głównym donorem mostków disiarczkowych, pełniącym istotną rolę w fałdowaniu wielu białkowych czynników wirulencji *P. aeruginosa*, utrzymywanych w aktywnej, utlenionej formie zarówno przez PaDsbB1 jak i PaDsbB2. Funkcja *in vivo* PaDsbA2 pozostaje nieznana [1]. W porównaniu do EcDsbA, zarówno PaDsbA1 (27%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej) jak PaDsbA2 (14%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej) charakteryzują się skróceniem hydrofobowego rowka wiążącego substraty i bardziej zasadową powierzchnią białka [1, 62].

Wielokrotną liczbę białek homologicznych do EcDsbA, które scharakteryzowano strukturalnie i funkcjonalnie, posiadają także bakteria *Xylella fastidiosa* (XfDsbA i XfDsbA2), która jest patogenem roślin, wywołującym duże straty w uprawach winogron, cytrusów, lucerny migdałów i kawy, pasożytniczy mikroorganizm *Wolbachia pipientis* (WpDsbA1 i WpDsbA2) oraz uropatogenny szczep *E. coli* (UPEC DsbA i DsbL), który zostanie dokładniej scharakteryzowany w rozdziale 4 [63].

3.2. Różnorodność strukturalna monomerycznych białek DsbA

Do tej pory scharakteryzowano strukturalnie i funkcjonalnie jedynie 13 monomerycznych białek DsbA. Dziesięć z nich pochodzi z komórek bakterii Gram-ujemnych, a trzy z Gram-dodatnich [51]. Białka homologiczne do EcDsbA charakteryzują się dużym zróżnicowaniem i stosunkowo niską identycznością sekwencji aminokwasowej, oscylującą w granicach 15–40%. Całkowicie konserwowanymi pozycjami aminokwasowymi okazały się jedynie aktywne cysteiny, wchodzące w skład motywu CXXC. W 85 procentach także, w pierwszej pozycji dipeptydu oddzielającego cysteiny motywu,

znajduje się prolina. Pomimo tak dużych rozbieżności w strukturze pierwszorzędowej tych białek, ich ogólna architektura jest podobna. We wszystkich scharakteryzowanych strukturalnie i funkcjonalnie białkach DsbA występuje zwój tioredoksynowy z insercyjną α -helikalną domeną oraz pętla *cis*-Pro. Różnice w sekwencji aminokwasowej determinują jednak unikalne cechy strukturalne tych białek, takie jak właściwości powierzchniowe i potencjał redoks [63]. Najbardziej podobnym strukturalnie homologiem EcDsbA (40-to procentowe podobieństwo sekwencji aminokwasowej) jest białko DsbA (TcP) *Vibrio cholerae*. Dwoma zasadniczymi aspektami różniącymi obydwie białka jest krótszy w porównaniu z EcDsbA rowek wiążący substraty i mniej wygięta α_1 -helisa białka DsbA *V. cholerae* [27].

Szeroka konserwacja genów kodujących białka DsbA w świecie mikroorganizmów oraz ich udział w prawidłowym zwijaniu wielu czynników wirulencji bakterii patogennych (patrz: podrozdział 4.2.) pozwala na rozpatrywanie tych protein jako potencjalnych nowych celów dla leków antybakteryjnych [12]. M c M a h o n i wsp. dokonali porównania białek DsbA pochodzących z różnych mikroorganizmów, mającego na celu wykazanie podobieństw strukturalnych pomiędzy nimi, które mogłyby następnie posłużyć jako platforma do projektowania substancji terapeutycznych. Ze względu na aranżację β -kartek, która zasadniczo odróżnia DsbA bakterii Gram-dodatnich od Gram-ujemnych (poza nielicznymi wyjątkami), dokonano podziału tych protein na dwie klasy. Następnie każdą z klas podzielono na dwie subclassy, biorąc pod uwagę właściwości powierzchniowe białek: otoczenie motywu katalitycznego oraz miejsce oddziaływania z partnerem redoks i substratami. Do klasy Ia zaliczono białka DsbA *E. coli* K-12, *S. enterica*, *K. pneumoniae* i *V. cholerae*, a do klasy Ib DsbA *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *X. fastidiosa* i *B. pseudomallei*. Podklasa Ia skupia DsbA o mniejszym potencjale oksydacyjnym niż Ib, lecz o większym rowku substratowym, który potencjalnie mógłby wiązać małe peptydy terapeutyczne. Do podklasy IIa przypisano DsbA *M. tuberculosis*, *S. aureus* i *B. subtilis*, a do podklasy IIb jedynie białko DsbA1 *W. pipientis* (w analizach bioinformatycznych podklasa ta nie została wyodrębniona) [51].

W ostatnim czasie rozwiązano strukturę białka DsbA *Proteus mirabilis* (Pm), która pozwala przypuszczać, że jest ono podobne strukturalnie do EcDsbA. Zbadano także miejsce, w którym PmDsbA wiąże się niekowalencyjnie ze swoim ligandem. Obszar ten mógłby stać się celem inhibitora blokującego maszynę Dsb tego patogenu [40]. Nowe spojrzenie na potencjalne miejsce działania peptydów antybakteryjnych przyniosła także charakterystyka strukturalna DsbA *Acinetobacter baumannii* (Ab). Wykazano, że białko AbDsbA oddziałuje z czynnikiem elongacyjnym EF-Tu i wiąże się z nim w innym miejscu niż partner redoks. Sugeruje to, że także niekatalityczny obszar

powierzchni białka AbDsbA może pełnić rolę w interakcji z substratami [56]. Jak dotąd żadne leki, będące inhibitorami bazującymi na strukturze białek DsbA, nie zostały wprowadzone do obiegu klinicznego [51].

3.3. Dimeryczne oksydoreduktazy DsbA

Zdecydowana większość dotychczas poznanych oksydoreduktaz homologicznych do EcDsbA, działających w szlaku utleniania, ma budowę monomeryczną. Wyjątek stanowią białka HP0231 *Helicobacter pylori*, DsbA2 *Legionella pneumophila* (Lp), oraz enzymy DsbA-like *Corynebacterium glutamicum*.

Mikroaerofilna pałeczka *H. pylori* jest czynnikiem etiologicznym raka żołądka oraz stanów zapalnych i wrzodów górnego odcinka przewodu pokarmowego [19]. W przeciwieństwie do *E. coli*, system Dsb *H. pylori* jest słabo poznany. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne pozwoliły na identyfikację jedynie trzech białek potencjalnie działających w tym systemie: HP0231, HP0377 i HP0595. Sekwencje aminokwasowe tych białek przyrównano liniowo do sekwencji aminokwasowych białek Dsb *E. coli*. Na tej podstawie białka te opisano jako homologi EcDsbB (HP0595), EcDsbG (HP0231) i EcDsbC (HP0377). Nie rozpoznano natomiast genu kodującego białko homologiczne do oksydoreduktazy EcDsbA [33].

Białko HP0231, opisywane w literaturze jako HpDsbG, jest dimerem złożonym z dwóch identycznych monomerów połączonych domenami dimeryzacyjnymi znajdującymi się na ich N-końcach. Każda z domen składa się z jednej α_1 -helisy i czterech ułożonych antyrównolegle β -kartek (β_1 - β_4). Na C-terminalnych domenach każdego z monomerów, odbiegających budową od klasycznych domen TRX (obecność dwóch insercyjnych $\alpha_4.1$ i $\alpha_4.2$ -helis oraz dodatkowej β_5 -kartki), umiejscowione są motywy katalityczne CXXC na α_3 -helisie i pętla *cis*-Pro w jego bliskiej odległości. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej białek HP0231 i dimerycznej reduktazy EcDsbG wykazało, że są one podobne jedynie w 6%-ach, a budowa monomerów obydwu białek jest różna. Pomimo podobieństwa rozmiarów obydwu kryształów, analiza superimpozycji (nałożenia modeli struktur białkowych) wykazała, że różnią się one zasadniczo długością linkera łączącego monomery, a także kształtem i ładunkiem na powierzchni V-kształtnej kieszeni wiążącej substraty (dodatni ładunek u HP0231, a ujemny u EcDsbG). Dodatkowo pętla *cis*-Pro białka HP0231 jest dłuższa niż ta EcDsbG, a motywy katalityczne HP0231 (CPHC i VcP) są takie same jak EcDsbA, a nie EcDsbG (CPYC i TcP) [71]. Badania funkcji HP0231 wykazały, że białko HP0231 tak jak EcDsbA pełni funkcję oksydazy i sugerują zmianę jego nazwy na HpDsbA. Oprócz takich samych jak u EcDsbA motywów aktywnych, HP0231 ma zbliżony do EcDsbA potencjał redoks, w dużym

stopniu komplementuje mutację $\Delta dsbA$ *E. coli*, występuje tak jak oksydazy *in vivo* w formie utlenionej i współdziała z HP0595, homologiem EcDsbB. Ponadto, mutanty izogeniczne w genie *hp0231* są wydłużone, nieruchliwe i bardziej wrażliwe na DTT, co również jest podobne do fenotypu mutantów $dsbA^-$ *E. coli* [59].

W genomie *L. pneumophila* zidentyfikowano dwa geny kodujące oksydoreduktazy tiolowe DsbA1 i DsbA2. Białko LpDsbA1 komplementuje mutację $\Delta dsbA$ *E. coli*, a jego brak w komórkach *L. pneumophila* nie skutkuje obserwowalną zmianą fenotypu mutantu, w przeciwieństwie do LpDsbA2, które jest niezbędne do przeżycia tej bakterii. Spokrewnione z białkiem Com1 *Coxiella burnetii* LpDsbA2 o masie 27 kDa jest odległe filogenetycznie od EcDsbA i poza kilkoma wyjątkami konserwowane w proteomach bakterii posiadających system sekrecji typu IV (T4SS). Transportowane na teren peryplazmy LpDsbA2 w komórkach natywnego gospodarza występuje w 60%-ach w formie zredukowanej, a w 40%-ach w formie utlenionej, co jest zbliżone ze stanem obserwowanym w przypadku EcDsbA. Dodatkowo zamiana Pro198 na treoninę w petli *cis*-Pro (P198T) tego białka skutkuje tak jak w przypadku EcDsbA nagromadzeniem stabilnych kompleksów z białkami substratowymi. Na N-końcu białka LpDsbA2 zidentyfikowano domenę dimeryzacyjną, dzięki której oksydoreduktaza ta występuje na terenie komórki w postaci homodimerów. LpDsbA2 komplementuje mutację $\Delta dsbC$ *E. coli* i tak jak izomeraza występuje w komórkach *E. coli* wyłącznie w formie zredukowanej. Ponadto LpDsbA2N (monomeryczne białko pochodne LpDsbA2, pozbawione domeny dimeryzacyjnej), w przeciwieństwie do natywnego DsbA2 *Legionella*, komplementuje brak EcDsbA w komórkach *E. coli*. Powyżej opisane właściwości pozwalają wnioskować, że LpDsbA2 jest enzymem bifunkcyjnym, posiadającym zarówno aktywność oksydazy jak i izomerazy [32, 39].

Stabilizację struktur białkowych poprzez wprowadzanie mostków disiarczkowych zaobserwowano także w przypadku Gram-dodatnich, tlenowych bakterii z rodzaju *Actinobacteria*. U przedstawiciela tej klasy *C. glutamicum* zidentyfikowano dwa homodimeryczne białka DsbA-like, które posiadają motyw katalityczny CXXC. Obydwa białka, nazwane CG26 i CG2799, podobnie jak EcDsbA wykazują *in vitro* słabe właściwości redukujące (redukują insulinę *in vitro*) i oksydacyjne (wydajnie utleniają zredukowaną RNazę A). CG26 jest konserwowane u różnych gatunków *Actinobacteria*, podczas gdy CG2799 ma jedynie dwa homologi, co sugeruje specyficzną dla *Corynebacteria* funkcję. Partner redoks tych białek nadal nie został poznany. W proteomie badanych gatunków nie zidentyfikowano białka homologicznego do EcDsbB, z tego względu sugeruje się udział białka VKOR (patrz: podrozdział 3.4) w reoksydacji białek DsbA-like *C. glutamicum* [11].

3.4. Obecność lub brak białka pełniącego funkcję EcDsbB

W przypadku bakterii należących do klas α , β i γ -Proteobacteria, mostki disiarczkowe do struktury białek wprowadzane są na podobnej drodze jak u *E. coli* (system DsbAB), w przeciwieństwie do wielu bakterii z klas *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* oraz bakterii bez-tlenowych, gdzie nie funkcjonuje standardowy szlak utleniania. Tworzenie wiązań -S-S- jest katalizowane przez DsbA, a za jego reoksydację odpowiedzialne jest białko będące homologiem eukariotycznej reduktazy epoksydowej VKOR [17].

Bakteryjne białko VKOR ewoluowało niezależnie od DsbB, jednakże wykazuje podobieństwa do DsbB w budowie strukturalnej i mechanizmie działania [34]. Strukturę białka VKOR w kompleksie z naturalnym substratem (białkiem posiadającym domenę TRX) rozwiązano w *Synechococcus* sp. We wszystkich białkach VKOR rdzeń katalityczny tworzą cztery helisy transmembranowe (TM1-4) otaczające chinon [45]. Białko VKOR *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb) funkcjonalnie zastępuje brak białka DsbB w mutancie *E. coli* $\Delta dsbB$. Ponadto, podobnie jak w przypadku białka eukariotycznego, aktywność MtbVKOR jest hamowana przez warfarynę (antykoagulant stosowany w leczeniu przeciwzakrzepowym, hamujący powstawanie aktywnej formy witaminy K). Dodatkowo wykazano, że te same mutacje punktowe są odpowiedzialne za zwiększoną oporność na ten lek w obydwu białkach. Bakteryjne białko VKOR może być zatem potencjalnym celem dla antybiotykoterapii i modelem badawczym dla homologa ludzkiego [18].

W ostatnim czasie jako partnera redoks dla MtbVKOR zidentyfikowano białko nazwane MtbDsbA-like, będące produktem genu Rv2969c. MtbDsbA jest monomerem złożonym z dwóch domen – tioredoksynowej (TRX), w obrębie której umiejscowiony jest klasyczny motyw CXXC oraz α -helikalnej zbudowanej z czterech helis α 2-5, która jest stabilizowana przez strukturalne wiązanie disiarczkowe pomiędzy α 2 a α 5-helisą. Pomimo wielu podobieństw do EcDsbA, unikalna dla MtbDsbA jest obecność w domenie TRX α 8-helisy (EcDsbA zbudowane jest z siedmiu α -helis). Dodatkowo, w przeciwieństwie do EcDsbA, MtbDsbA nie wykazuje właściwości redukujących w teście redukcji insuliny oraz posiada płytki powierzchniowy rowek hydrofobowy, co może świadczyć o jego wąskiej specyficzności substratowej [6, 55].

Jednym z najbardziej podobnych strukturalnie do MtbDsbA białek jest DsbA *Staphylococcus aureus* (Sa). *S. aureus* wraz z *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis* są organizmami, u których zidentyfikowano jedynie białko DsbA, bez obecności jego partnerów redoks – białek DsbB i VKOR.

Pomimo wielu podobieństw SaDsbA do EcDsbA (potencjał redoks, ogólna struktura), w przeciwieństwie do EcDsbA, lipoproteina SaDsbA o masie 23 kDa posiada taką samą stabilność w stanie utlenionym jak i zredukowanym. Umożliwia to efektywne utlenienie SaDsbA, zapewniające jego aktywność po wprowadzeniu mostka disiarczkowego, przez zewnątrzkomórkowe czynniki utleniające, bez udziału DsbB i VKOR. Ponad to SaDsbA nie posiada cech charakterystycznych dla funkcjonowania białek DsbA bakterii Gram-ujemnych takich jak obecność His w sekwencji CXXC oraz Val poprzedzającej pętlę *cis*-Pro (*VcP*). SaDsbA częściowo komplementuje $\Delta dsbA$ *E. coli* (niezależnie od EcDsbB), pomimo, że motywy CXYC i TcP SaDsbA są bardziej typowe dla izomeraz EcDsbC i EcDsbG [23].

4. Specyficzność substratowa oksydoreduktaz DsbA

Kolejnymi zasadniczymi różnicami pomiędzy oksydazą DsbA *E. coli* K-12, a jej homologami występującymi u innych gatunków bakterii jest specyficzność substratowa oraz rozmieszczenie genów *dsbAB* w genomie (w przypadku *E. coli* i wielu innych bakterii Gram-ujemnych są one umiejscowione w odległych względem siebie miejscach genomu). W proteomie *E. coli* zidentyfikowano około 300 białek transportowanych do peryplazmy, zawierających w sekwencji aminokwasowej kilka cystein, które mogą być potencjalnymi substratami dla utlenionego EcDsbA. Ligandem dla zredukowanego EcDsbA jest za to jedynie EcDsbB [52]. Mutanty *E. coli dsbA*⁻ wykazują fenotyp plejotropowy, są nieruchliwe oraz bardziej wrażliwe na DTT oraz jony metali ciężkich [46]. Udokumentowano, że EcDsbA uczestniczy w zwijaniu kluczowych dla funkcjonowania komórki *E. coli* białek takich jak FlgI (buduje pierścień P rzęski), LivK (prekursor białka wiążącego leucynę), YodA (wiąże jony metali), RcsF (białko regulatorowe), MepA (endopeptydaza mureiny), alkaliczna fosfataza, β -laktamaza, OmpA i rybonukleaza I [26, 36].

Wiele bakterii posiada białka homologiczne do EcDsbAB o wąskiej specyficzności substratowej. Geny kodujące te homologi białek DsbA i DsbB, nazwane DsbLI, zlokalizowane są przeważnie w trójcistronowym operonie, zawierającym także gen kodujący sulfotransferazę arylosulfatu (ASST), która jest ich jedynym substratem [34]. W przypadku *S. enterica* sv. Typihimurium, omówionej uprzednio w podrozdziale 3.1, geny *dsbL* i *dsbI* transkrybowane są niezależnie od genu *assT* [25].

ASST jest enzymem katalizującym detoksykację związków fenolowych, występującym u bakterii z rodzajów *Salmonella*, *Shewanella*, *Campylobacter*, *Geobacter* i *E. coli*. W komórkach uropatogennej (UPEC) *E. coli* CFT073, posiadającej dwie funkcjonalne pary enzymów zdolnych do wprowadzania mostków disiarczkowych

– DsbAB (podobnych do DsbAB *E. coli* K-12) i DsbLI, ASST jest jedynym substratem *in vivo* dla białka DsbL. DsbL jest silniejszym od EcDsbA oksydantem tiolowym posiadającym motyw katalityczny CPFC i potencjał redoks $E^{\circ} = -95$ mV, wykazującym względem EcDsbA 24%-owe podobieństwo sekwencji aminokwasowej i duże różnice strukturalne. Białko to posiada także dodatkowo naładowany rowek wiążący substrat, a z kolei w sekwencji aminokwasowej ASST w sąsiedztwie cystein dominują ładunki ujemne [21, 48]. Udokumentowano, że nie właściwości oksydacyjne lecz aktywność chaperonowa białka DsbL odgrywa kluczową rolę w procesie wprowadzania wiązania -S-S- do struktury ASST [49]. Bioinformatyczne analizy wykazały obecność genów kodujących białka DsbL w 17 genomach bakteryjnych, co jest skorelowane z występowaniem w ich sąsiedztwie genu *assT* i często też *dsbI* [66].

Klasyfikacja białek DsbB i DsbI jest nieprecyzyjna, a nomenklatura myląca. Białka DsbI występujące w proteomach bakterii z rodzaju ϵ -Proteobacteria (np. *C. jejuni*, *H. pylori*) nie są pokrewne białkom funkcjonującym w parze redoks DsbLI w komórkach UPEC *E. coli*, czy *S. enterica*. Nazwa „DsbI” powinna być zarezerwowana dla homologów EcDsbB posiadających 5 helis transmembranowych w domenie katalitycznej, motyw CXXC umiejscowiony w pętli peryplazmatycznej i strukturę β -śmigła na C-końcu białka. Proteiny DsbI obecne u *E. coli* i *S. enterica* powinny być raczej określane mianem DsbB2 lub DsbI(DsbB2) [20, 54].

4.1. Metody poszukiwania i lokalizacja substratów

Identyfikacja ligandów białek działających w szlaku utleniania jest stosunkowo trudna, ze względu na szybkie przejście pomiędzy kompleksem DsbA-substrat, a całkowicie utlenionym substratem (etap II reakcji wprowadzania mostków disiarczkowych; patrz: podrozdział 2.2) [63]. W ich rozpoznaniu wykorzystywanych jest kilka metod bioinformatycznych, niemniej jednak wymagane jest potwierdzenie interakcji w warunkach *in vivo*. W poszukiwaniu białek *in silico*, które potencjalnie mogą wymagać wprowadzania wiązań disiarczkowych wyróżnia się kilka podejść. Dobrym indykatozem są badania strukturalne pozwalające na pomiar odległości pomiędzy dwoma cysteinami w białku (powinna być ona mniejsza niż 2,5Å). Reaktywne, parzyste cysteiny, które potencjalnie mogą uczestniczyć w tworzeniu wiązania -S-S- są zazwyczaj konserwowane ewolucyjnie w sekwencji aminokwasowej białka, co pozwala na wykluczenie cystein nie zaangażowanych w ten proces. Obecność ortologów białek EcDsbA i EcDsbB również w oczywisty sposób sugeruje występowanie ich substratów [22].

Strategią wykorzystywaną do wychwytywania kompleksów DsbA-substrat w warunkach laboratoryjnych

jest wprowadzanie mutacji punktowych w obrębie pętli *cis*Pro. W przypadku EcDsbA (VcP) poddano badaniu 19 różnych mutantów, lecz jedynie trzy z wprowadzonych zmian przyniosły oczekiwane rezultaty. Zastąpienie Pro151 treonią skutkowało spowolnieniem drugiego etapu reakcji wprowadzania mostków disiarczkowych i akumulacją intermediatów DsbA-substrat. Z kolei mutacje P151S i V150G pozwalały na wychwycenie kompleksów EcDsbA z jego partnerem redoks EcDsbB [35]. Innymi wykorzystywanymi w tym celu metodami są elektroforeza dwukierunkowa w połączeniu ze spektrometrią mas [26]. Domniemane ligandy są również identyfikowane poprzez badanie ich stanu redoks w komórkach mutantów *E. coli dsbA*⁻ przy użyciu czynników alkilujących [43]. Zastosowanie mogłaby także znaleźć metoda wykorzystywana przy identyfikacji substratów tioredoksyny. Zmutowanie drugiej cysteiny motywu katalitycznego CXXC białka DsbA na alaninę mogłoby zapobiegać dysocjacji jego kompleksu z substratem [9, 63].

W przypadku *E. coli* jak i innych bakterii Gram-ujemnych wprowadzanie mostków disiarczkowych przez białka Dsb odbywa się w warunkach utleniających w peryplazmie – przedziale komórkowym otoczonym dwoma błonami komórkowymi: wewnętrzną/cytoplazmatyczną (IM/CM) i zewnętrzną (OM). Udokumentowano, że wiązania -S-S- są obecne nie tylko w strukturze rozpuszczalnych białek peryplazmatycznych, ale także w przypadku protein transportowanych po syntezie na zewnątrz komórki bakteryjnej. Jak dotąd niewiele wiadomo o charakterze uczestnictwa białek Dsb w procesie ich formowania [60]. W ostatnich latach wykazano, że w komórkach *E. coli* oksydoreduktaza EcDsbA we współpracy z EcDsbC i SurA (białko chaperonowe) bierze udział w fałdowaniu wbudowanej w OM lipoproteiny LptD. Dwa obecne w strukturze tego białka mostki disiarczkowe pomiędzy cysteinami Cys31-Cys137 i Cys724-Cys725 łączą domenę N-terminalną z C-terminalną, zapewniając jego prawidłowe funkcjonowanie [8]. Lipoproteina LptD o strukturze β-baryłki w kompleksie z LptE jest kluczowa do translokacji lipopolisacharydu przez zewnętrzną błonę komórkową, co stabilizuje barierę ochronną bakterii przeciw substancjom toksycznym, z włączeniem antybiotyków [14]. Udział systemu Dsb w formowaniu wiązań -S-S- zbadano również w przypadku małej (14 kDa), zakotwiczonej w OM lipoproteiny RcsF. Białko RcsF jest częścią ścieżki sygnałowej Rcs indukowanej w warunkach stresowych i w odpowiedzi na warunki środowiska kontrolującej transkrypcję wielu genów – odpowiedzialnych za podziały komórkowe (*ftsZ*), formowanie biofilmu, ruchliwość i produkcję czynników wirulencji [44]. W sekwencji aminokwasowej RcsF znajdują się cztery konserwowane cysteiny. Początkowo określono, że co najmniej dwie z nich połączone są wiązaniem

disiarczkowym i zidentyfikowano to białko jako substrat oksydoreduktazy DsbA [36]. Założenia te potwierdziło rozwiązanie struktury RcsF, dzięki któremu zidentyfikowano obecność dwóch nierównocennych wiązań -S-S- pomiędzy Cys74-Cys118 i Cys109-Cys124 (wiązanie niezbędne do zachowania aktywności białka). Co więcej udokumentowano, że w proces tworzenia mostków disiarczkowych jest zaangażowana reduktaza EcDsbC: „wychwycono” kompleksy białek RcsF-EcDsbC i udokumentowano zahamowanie ścieżki Rcs w mutancie *E. coli dsbC* [44].

W komórkach bakterii Gram-dodatnich brak jest klasycznej peryplazmy, a obszar w którym możliwe jest wprowadzanie mostków disiarczkowych, ogranicza się jedynie do przestrzeni pomiędzy błoną cytoplazmatyczną, a ścianą komórkową [50]. Bakterie Gram-dodatnie w porównaniu do Gram-ujemnych produkują mniej protein posiadających strukturalne wiązania -S-S- i alternatywnie zastępują je wiązaniami amidowymi [12]. Ciekawy mechanizm zaobserwowano u tlenowych bakterii z rodzaju *Firmicutes*, które mają zdolność do usuwania cystein z sekwencji aminokwasowej protein sekrecyjnych [11]. Chociaż w proteomach bakterii Gram-dodatnich zidentyfikowano i zcharakteryzowano białka homologiczne do DsbA, jednak proces generowania mostków disiarczkowych w komórkach tych mikroorganizmów nadal pozostaje słabo poznany. Przykładami protein w przypadku których udokumentowano obecność wiązań -S-S- są toksyny *Corynebacterium diphtheriae* i *Clostridium tetani*, neurotoksyna *A Clostridium botulinum* oraz egzotoksyna *Streptococcus pyogenes*, lecz maszyny odpowiedzialna za ich formowanie jak do tej pory nie została rozpoznana [12]. Substratami białek TDORs (*thiol-disulfide oxidoreductases*) bakterii Gram-dodatnich są często białka błonowe, wbudowane w ścianę komórkową lub wydzielane na zewnątrz komórki. TDORs są zazwyczaj lipoproteinami wbudowanymi w błonę komórkową i posiadającymi wyspecjalizowaną funkcję. W proteomie *Bacillus subtilis*, występują dwie pary homologów białek DsbAB (znanych jako białka Bdb), przy czym udokumentowano, że każda z nich oddziałuje docelowo wyłącznie z jednym białkiem. Substratem dla pary BdbCD jest bakteriocyna sublancyna 168, a dla pary BdbCD pseudopilina ComGC, niezbędna do osiągnięcia przez komórki *B. subtilis* stanu kompetencji [38]. Również w przypadku *S. aureus*, SaDsbA jest odpowiedzialna za stabilność białka ComGC, przy czym jak dotąd nie rozpoznano innych ligandów tego białka [12, 67]. W ostatnim czasie, przeprowadzono badania w komórkach *Streptococcus gordonii* mające na celu identyfikację TDORs tego gatunku. Wykazano, że naturalnym substratem dla oksydoreduktazy SdbA jest autolizyna AtlS, a mutanty *S. gordonii* w genie *sdbA* charakteryzują się fenotypem plejotropowym. Ponad to, sekwencja aminokwasowa

białka SdbA cechuje się małym podobieństwem wobec dotychczas poznanych sekwencji oksydoreduktaz bakterii Gram-dodatnich i może reprezentować nowy typ tych enzymów w ich komórkach [12].

4.2. Czynniki wirulencji

Substraty homologów białek DsbA to często czynniki warunkujące wirulencję bakterii patogennych takie jak: adhezyny, pili, toksyny czy elementy systemów sekrecyjnych.

W przypadku UPEC *E. coli* aktywność białka DsbA jest konieczna do osiągnięcia prawidłowej konformacji PapD, białka opiekuńczego wiążącego transportowane do peryplazmy podjednostki fimbrii typu P, które odgrywają istotną rolę w kolonizacji dróg moczowych [24]. Ponadto, wprowadzanie mostków disiarczkowych przez system Dsb do struktury białka FimA (głównej podjednostki pili typu I, warunkujących przyleganie patogenu do komórek gospodarza) jest niezbędne do jego rozpoznania i utworzenia kompleksu z białkiem chaperonowym FimC, co inicjuje proces formowania pili [10]. Aktywność DsbA jest również wymagana do powstawania pili typu IV (długich filamentów warunkujących adhezję i ruch drgający komórek bakteryjnych) u enteropatogennej *E. coli*, *N. meningitidis*, *Vibrio cholerae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Mostki disiarczkowe są także wprowadzane w obrębie C-końcowej domeny zewnątrzblonowej adhezyny (intiminy) jelitowych patogenów *E. coli*. Ponadto w komórkach *E. coli* jak również u *S. enterica*, *P. mirabilis*, *Ervinia carotovora*, *Burkholderia cepacia* i *Campylobacter jejuni* potwierdzono rolę DsbA w powstawaniu funkcjonalnej rzęski, warunkującej zdolność do ruchu. Niektóre bakterie produkują toksyny i enzymy takie jak proteazy, które warunkują uszkodzenie komórek gospodarza i rozprzestrzenianie się patogenu. Udział systemu Dsb w powstawaniu tych czynników wirulencji został dobrze scharakteryzowany w przypadku toksyn AB₅ *V. cholerae*. Substratami dla oksydoreduktazy DsbA *P. aeruginosa* są także enzymy sekrecyjne wydzielane przez system sekrecji typu II (T2SS) takie jak proteolityczna elastaza i lipaza, a w komórkach *Yersinia pestis* czy *Shigella flexneri* prawidłowemu zwijaniu z udziałem systemów Dsb ulegają także składniki niezbędne do prawidłowego działania systemu T3SS. W przypadku Gram-dodatnich organizmów takich jak *B. subtilis* czy *Streptococcus thermophilus* DsbA jest wymagane do produkcji antibakteryjnych peptydów (m.in. bakteriocyn), które negatywnie działają na organizmy pokrewne. Ułatwia to przetrwanie bakterii je wytwarzających w środowisku poprzez wyeliminowanie konkurencji o składniki pokarmowe [24, 46, 63].

Brak prawidłowego wprowadzenia mostków disiarczkowych do struktur czynników wirulencji warunkuje

obniżenie poziomu kolonizacji organizmu gospodarza oraz zatrzymanie namnażania i rozprzestrzeniania komórek bakteryjnych w jego obrębie [24]. Z tego względu białka DsbA są rozpatrywane jako potencjalne cele dla antybiotykoterapii. W przypadku patogenów z rodziny *Enterobacteriaceae* takich jak *E. coli*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Shigella flexneri* i *Cronobacter sakazakii*, będących przyczyną trudnych do zwalczania i wymagających nowych środków terapeutycznych infekcji szpitalnych, sekwencja aminokwasowa, właściwości redoks, struktura i miejsce wiązania substratów homologów DsbA są wysoce konserwowane [41].

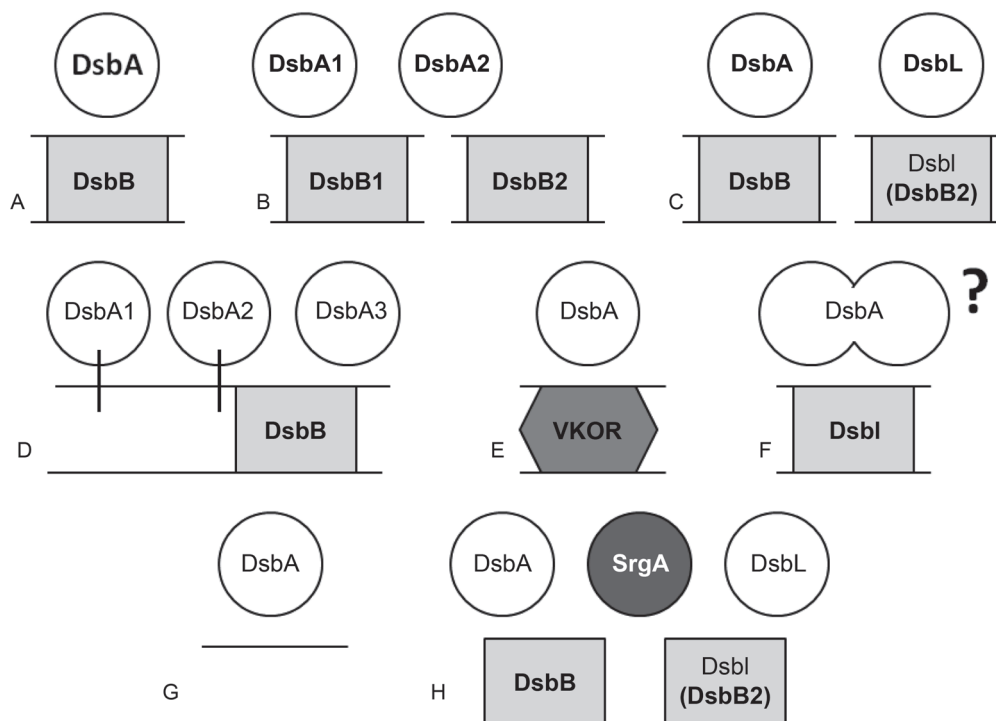
Na rys. 3 zobrazowano różnorodne, omawiane dotąd w niniejszej pracy systemy wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek.

5. Inne systemy Dsb

Chociaż obecność białka DsbA jest konieczna, aby proces wprowadzania mostków disiarczkowych zachodził efektywnie, wykazano, że w szczepach pozbawionych genów *dsbA* (lub *dsbB*) ich formowanie również ma miejsce lecz jest ono mniej wydajne w porównaniu ze szlakiem utleniania Dsb. Zjawisko to określono jako aktywność tła. Jest ono najprawdopodobniej spowodowane obecnością tlenu w peryplazmie. Podjęto próbę zidentyfikowania enzymów odpowiedzialnych za ten proces. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że nadekspresja zależnego od DsbC peryplazmatycznego białka PspE, które zawiera w sekwencji aminokwasowej tylko jedną cysteinę, zwiększa efektywność wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek w mutancie $\Delta dsbA$. Co więcej system PspE/DsbC nie jest źródłem aktywności tła, co sugeruje, że może być on wykorzystywany przez komórki bakteryjne w których nie funkcjonuje standardowy szlak utleniania zależny od obecności białek DsbA i DsbB [7].

W genomach prokariotycznych zidentyfikowano także białka zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej selenocysteinę (SeCys), określane jako nowa klasa białek DsbA. Udokumentowano, że proste diselenidy w stężeniu katalitycznym funkcjonalnie zastępują brak białka DsbA w mutantach *dsbA*⁻. Produkty genów SeCys DsbA-like nie zostały jak dotąd dobrze poznane [3].

Alternatywne szlaki wprowadzania mostków disiarczkowych do struktury białek w komórkach *E. coli* zostały także stworzone w warunkach laboratoryjnych. Dołączenie sekwencji sygnałnej do cytoplazmatycznej tioredoksyny skutkowało jej transportem do peryplazmy, gdzie była utleniana przez DsbB i w niewielkim stopniu katalizowała tworzenie wiązań -S-S-. Zastąpienie motywu katalitycznego CXXC tioredoksyny na CXCC, przyczyniało się do tworzenia dimerów tego



Rys. 3. Schemat obrazujący zróżnicowanie bakteryjnych szlaków utleniania białek. Szczegóły i objaśnienia w tekście. **A)** modelowy szlak utleniania *E. coli* DsbAB; **B)** obecność w komórce dwóch białek DsbA i dwóch białek DsbB (np. *P. aeruginosa*); **C)** występowanie równoległe dwóch par enzymów katalizujących wprowadzanie mostków disiarczkowych DsbAB i DsbLI(B2) (np. uropatogennej *E. coli* CFT073); **D)** występowanie zwielokrotnionej liczby homologów DsbA, z których niektóre zakotwiczone są w błonie komórkowej (np. *N. meningitidis*); **E)** obecność białka DsbA w parze z białkiem VKOR, które jest jego partnerem redoks (np. *M. tuberculosis* H37Rv); **F)** występowanie dimerycznego DsbA (np. *H. pylori*), ? – ścieżka utleniania nadal słabo poznana; **G)** występowanie w komórce bakteryjnej jedynie homologa DsbA (np. *S. aureus*); **H)** obecność szlaków DsbAB i DsbLI(B2) oraz dodatkowej, kodowanej plazmidowo oksydoreduktazy SrgA (np. *S. enterica* sv. Typhimurium).

białka zdolnych do efektywnego wprowadzania mostków disiarczkowych niezależnie od obecności DsbA i DsbB [34].

6. Podsumowanie

W komórkach *E. coli* mostki disiarczkowe wprowadzane są do struktury białek w szlaku utleniania przez system EcDsbA/EcDsbB. Monomeryczne, peryplazmatyczne EcDsbA jest główną oksydoreduktazą katalizującą proces, a zakotwiczone w błonie komórkowej EcDsbB odpowiada za utrzymanie EcDsbA w aktywnej, utlenionej formie. Prowadzone na przestrzeni ponad dwudziestu lat badania pozwoliły na szczegółowe poznanie funkcji, struktury i substratów EcDsbA, a ścieżka utleniania białek funkcjonująca w komórkach *E. coli* przez długi czas uznawana była za modelową. Wraz ze wzrostem liczby zsekwencjonowanych genomów bakteryjnych zidentyfikowano ponad 300 białek homologicznych do EcDsbA, pochodzących z różnych mikroorganizmów. Analiza porównawcza dostępnych struktur i funkcji tych białek wykazała ogólne podobieństwa pomiędzy nimi (obecność domeny TRX z insercyjną α -helisą, motywu aktywnego CXXC i pętli *cis*-Pro), ale także podkreśliła zasadnicze różnice

(odmienny potencjał redoks, właściwości powierzchniowe oraz różna sekwencja aminokwasowa i specyficzność substratowa). Wykazano także ogromną różnorodność szlaków utleniania białek funkcjonujących w komórkach bakteryjnych. Udokumentowano: zwielokrotnienie liczby białek DsbA; samodzielne funkcjonowanie DsbA, bez obecności partnera redoks; zastąpienie działania DsbB przez homolog eukariotycznej reduktazy epoksydowej VKOR; umiejscowienie genu kodującego DsbA na plazmidzie wirulencji; obecność dwóch par enzymów działających w szlaku utleniania oraz odnotowano przypadki dimerycznej budowy białek DsbA.

Praca finansowana z funduszy grantu NCN nr 2012/05/B/NZ1/00039

Piśmiennictwo

1. Arts I.S., Collet J.F. i wsp.: Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, **4**, (2013)
2. Bader M.W., Xie T., Yu C.A., Bardwell J.C.: Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J. Biol. Chem.* **275**, 26082–26088 (2000)
3. Beld J., Woycechowsky K.J., Hilvert D.: Diselenides as universal oxidative folding catalysts of diverse proteins. *J. Biotechnol.* **150**, 481–489 (2010)

4. Berkmen M.: Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **82**, 240–251 (2012)
5. Charbonnier J.B., Belin P., Moutiez M., Stura E.A., Quéméneur E.: On the role of the *cis*-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Sci.* **8**, 96–105 (1999)
6. Chim N., Harmston C.A., Guzman D.J., Goulding C.W.: Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Struct. Biol.* **18**, 13–23 (2013)
7. Chng S.S., Dutton R.J., Denoncin K., Vertommen D., Collet J.F., Kadokura H., Beckwith J.: Overexpression of the rhodanese PspE, a single cysteine-containing protein, restores disulphide bond formation to an *Escherichia coli* strain lacking DsbA. *Mol. Microbiol.* **85**, 996–1006 (2012)
8. Chng S.S., Xue M., Garner R.A., Kadokura H., Boyd D., Beckwith J., Kahne D.: Disulfide rearrangement triggered by translocon assembly controls lipopolysaccharide export. *Science*, **337**, 1665–1668 (2012)
9. Collet J.F., Messens J.: Structure, function, and mechanism of thio-redoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1205–1216 (2010)
10. Crespo M.D., Puorger C., Schärer M.A., Eidam O., Grütter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: Quality control of disulfide bond formation in pilus subunits by the chaperone FimC. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 707–713 (2012)
11. Daniels R., Mellroth P., Bernsel A., Neiers F., Normark S., von Heijne G., Henriques-Normark B.: Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **285**, 3300–3309 (2010)
12. Davey L., Ng C.K.W., Halperin S. A., Lee S.F.: Functional Analysis of Paralogous Thiol-disulfide Oxidoreductases in *Streptococcus gordonii*. *J. Biol. Chem.* **288**, 16416–16429 (2013)
13. Denoncin K., Collet J.F.: Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 63–71 (2013)
14. Denoncin K., Vertommen D., Paek E., Collet J.F.: The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential β -barrel protein LptD. *J. Biol. Chem.* **285**, 29425–29433 (2010)
15. Depuydt M., Leonard S.E., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K.S., Collet J.F.: A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, **326**, 1109–1111 (2009)
16. Depuydt M., Messens J., Collet J.F.: How proteins form disulfide bonds. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 49–66 (2011)
17. Dutton R.J., Boyd D., Berkmen M., Beckwith J.: Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11933–11938 (2008)
18. Dutton R.J., Wayman A., Wei J.R., Rubin E.J., Beckwith J., Boyd D.: Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 297–301 (2010)
19. Godlewska R., Dzwonek A., Mięka M., Ostrowski J., Pawłowski M., Bujnicki J.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* protein oxidation influences the colonization process. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 321–324 (2006)
20. Grabowska A.D., Jagusztyn-Krynicka E.K. i wsp.: Functional and Bioinformatics Analysis of Two *Campylobacter jejuni* Homologs of the Thiol-Disulfide Oxidoreductase, DsbA. *PLoS One*, **9**, (2014)
21. Grimshaw J.P., Stirnimann C.U., Brozzo M.S., Malojčić G., Grütter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **380**, 667–680 (2008)
22. Hatahet F., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1402–1414 (2014)
23. Heras B., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Frei P., Robin G., Cemazar M., Thöny-Meyer L., Glockshuber R., Martin J.L.: *Staphylococcus aureus* DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding. *J. Biol. Chem.* **283**, 4261–4271 (2008)
24. Heras B., Shouldice S.R., Totsika M., Scanlon M.J., Schembri M.A., Martin J.L.: DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 215–225 (2009)
25. Heras B., Totsika M., Jarrott R., Shouldice S.R., Guncar G., Achard M.E., Wells T.J., Argente M.P., McEwan A.G., Schembri M.A.: Structural and functional characterization of three DsbA paralogues from *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Biol. Chem.* **285**, 18423–18432 (2010)
26. Hiniker A., Bardwell J.C.: *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **279**, 12967–12973 (2004)
27. Hu S.H., Peek J.A., Rattigan E., Taylor R.K., Martin J.L.: Structure of TcpG, the DsbA protein folding catalyst from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* **268**, 137–146 (1997)
28. Inaba K., Ito K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 520–529 (2008)
29. Inaba K., Murakami S., Nakagawa A., Iida H., Kinjo M., Ito K., Suzuki M.: Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. *EMBO J.* **28**, 779–791 (2009)
30. Inaba K., Murakami S., Suzuki M., Nakagawa A., Yamashita E., Okada K., Ito K.: Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789–801 (2006)
31. Inaba K.: Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **146**, 591–597 (2009)
32. Jameson-Lee M., Garduño R.A., Hoffman P.S.: DsbA2 (27 kDa Com1-like protein) of *Legionella pneumophila* catalyses extra-cytoplasmic disulphide-bond formation in proteins including the Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **80**, 835–852 (2011)
33. Kaakoush N.O., Kovach Z., Mendz G.L.: Potential role of thiol-disulfide oxidoreductases in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 177–183 (2007)
34. Kadokura H., Beckwith J.: Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid. Redox. Signal.* **13**, 1231–1246 (2010)
35. Kadokura H., Nichols L., Beckwith J.: Mutational alterations of the key *cis* proline residue that cause accumulation of enzymatic reaction intermediates of DsbA, a member of the thioredoxin superfamily. *J. Bacteriol.* **187**, 1519–1522 (2005)
36. Kadokura H., Tian H., Zander T., Bardwell J.C., Beckwith J.: Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*, **303**, 534–537 (2004)
37. Karshikoff A., Nilsson L., Floppee N.: Understanding the -C-X1-X2-C- motif in the active site of the thioredoxin superfamily: *E. coli* DsbA and its mutants as a model system. *Biochemistry*, **52**, 5730–5745 (2013)
38. Kouwen T.R., van der Goot A., Dorenbos R., Winter T., Antelmann H., Plaisier M.C., Quax W.J., van Dijk J.M., Dubois J.Y.: Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **64**, 984–999 (2007)
39. Kpadeh Z.Z., Jameson-Lee M., Yeh A.J., Chertihin O., Shumilin I.A., Dey R., Day S.R., Hoffman P.S.: Disulfide bond oxidoreductase DsbA2 of *Legionella pneumophila* exhibits protein disulfide isomerase activity. *J. Bacteriol.* **195**, 1825–1833 (2013)

40. Kurth F, Duprez W, Premkumar L, Schembri M.A., Fairlie D.P., Martin J.L.: Crystal Structure of the Dithiol Oxidase DsbA Enzyme from *Proteus Mirabilis* Bound Non-covalently to an Active Site Peptide Ligand. *J. Biol. Chem.* **289**, 19810–19822 (2014)
41. Kurth F, Rimmer K., Premkumar L., Mohanty B., Duprez W., Halili M.A., Shouldice S.R., Heras B., Fairlie D.P., Scanlon M.J., Martin J.L.: Comparative sequence, structure and redox analyses of *Klebsiella pneumoniae* DsbA show that anti-virulence target DsbA enzymes fall into distinct classes. *PLoS One*, **8**, 1–15 (2013)
42. Lafaye C., Iwema T., Carpentier P., Jullian-Binard C., Kroll J.S., Collet J.F., Serre L.: Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **392**, 952–966 (2009)
43. Leichert L.I., Jakob U.: Global methods to monitor the thiol-disulfide state of proteins *in vivo*. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 763–772 (2006)
44. Leverrier P., Declercq J.P., Denoncin K., Vertommen D., Hiniker A., Cho S.H., Collet J.F.: Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **286**, 16734–16742 (2011)
45. Li W., Schulman S., Dutton R.J., Boyd D., Beckwith J., Rapoport T.A.: Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature*, **463**, 507–512 (2010)
46. Łasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 626–636 (2007)
47. Łasica A.M., Staroń A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Charakterystyka białek Dsb organizmów prokariotycznych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 223–235 (2007)
48. Malojčić G., Glockshuber R.: The PAPS-independent aryl sulfotransferase and the alternative disulfide bond formation system in pathogenic bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1247–1259 (2010)
49. Malojčić G., Owen R.L., Glockshuber R.: Structural and mechanistic insights into the PAPS-independent sulfotransferase catalyzed by bacterial aryl sulfotransferase and the role of the DsbL/Dsbl system in its folding. *Biochemistry*, **53**, 1870–1877 (2014)
50. Matias V.R., Beveridge T.J.: Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 1011–1021 (2006)
51. McMahon R.M., Premkumar L., Martin J.L.: Four structural subclasses of the antivirulence drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1391–1401 (2014)
52. Messens J., Collet J.F.: Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1050–1062 (2006)
53. Ondo-Mbele E., Vivès C., Koné A., Serre L.: Intriguing conformation changes associated with the *trans/cis* isomerization of a prolyl residue in the active site of the DsbA C33A mutant. *J. Mol. Biol.* **347**, 555–563 (2005)
54. Pawłowski M., Łasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., Bujnicki J.M.: AAN82231 protein from uropathogenic *E. coli* CFT073 is a close paralog of DsbB enzymes and does not belong to the DsbI family. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 181–184 (2009)
55. Premkumar L., Heras B., Duprez W., Walden P., Halili M., Kurth F., Fairlie D.P., Martin J.L.: Rv2969c, essential for optimal growth in *Mycobacterium tuberculosis*, is a DsbA-like enzyme that interacts with VKOR-derived peptides and has atypical features of DsbA-like disulfide oxidases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1981–1994 (2013)
56. Premkumar L., Kurth F., Duprez W., Grøftehaug M.K., King G.J., Halili M.A., Heras B., Martin J.L.: Structure of the *Acinetobacter baumannii* Dithiol Oxidase DsbA Bound to Elongation Factor EF-Tu Reveals a Novel Protein Interaction Site. *J. Biol. Chem.* **289**, 19869–19880 (2014)
57. Quan S., Schneider I., Pan J., Von Hacht A., Bardwell J.C.: The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem.* **282**, 28823–28833 (2007)
58. Ren G., Bardwell J.C. i wsp.: Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* **284**, 10150–10159 (2009)
59. Roszczenko P., Radomska K.A., Wywiał E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: A novel insight into the oxidoreductase activity of *Helicobacter pylori* HP0231 protein. *PLoS One*, **7**, (2012)
60. Ruiz N., Chng S.S., Hiniker A., Kahne D., Silhavy T.J.: Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12245–12250 (2010)
61. Sato Y., Inaba K.: Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals. *FEBS J.* **279**, 2262–2271 (2012)
62. Shouldice S.R., Heras B., Jarrott R., Sharma P., Scanlon M.J., Martin J.L.: Characterization of the DsbA oxidative folding catalyst from *Pseudomonas aeruginosa* reveals a highly oxidizing protein that binds small molecules. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 921–931 (2010)
63. Shouldice S.R., Heras B., Walden P.M., Totsika M., Schembri M.A., Martin J.L.: Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1729–1760 (2011)
64. Sinha S., Langford P.R., Kroll J.S.: Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000 (2004)
65. Tinsley C.R., Voulhoux R., Beretti J.L., Tommassen J., Nassif X.: Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J. Biol. Chem.* **279**, 27078–27087 (2004)
66. Totsika M., Heras B., Wurple D.J., Schembri M.A.: Characterization of two homologous disulfide bond systems involved in virulence factor biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *J. Bacteriol.* **191**, 3901–3908 (2009)
67. van der Kooi-Pol M.M., Reilman E., Sibbald M.J., Veenstra-Kyuchukova Y.K., Kouwen T.R., Buijs G., van Dijk J.M.: Requirement of signal peptidase ComC and thiol-disulfide oxidoreductase DsbA for optimal cell surface display of pseudopilin ComGC in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7124–7127 (2012)
68. Vivian J.P., Scanlon M.J. i wsp.: Structure and function of the oxidoreductase DsbA1 from *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **394**, 931–943 (2009)
69. Vivian J.P., Scanlon M.J. i wsp.: Structural and biochemical characterization of the oxidoreductase NmDsbA3 from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 32452–32461 (2008)
70. Wunderlich M., Otto A., Maskos K., Mücke M., Seckler R., Glockshuber R.: Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol.* **247**, 28–33 (1995)
71. Yoon J.Y., Kim J., Lee S.J., Kim H.S., Im H.N., Yoon H.J., Kim K.H., Kim S.J., Han B.W., Suh S.W.: Structural and functional characterization of *Helicobacter pylori* DsbG. *FEBS Lett.* **585**, 3862–3867 (2011)