

Jagoda Płaczkiwicz^{1*}

¹ Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii,
Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w grudniu 2016 r.
Zaakceptowano w lutym 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Udział białek wielofunkcyjnych w bakteryjnej patogenezie. 3. Wpływ białek wielofunkcyjnych na układ odpornościowy. 4. Obecność białek wielofunkcyjnych u bakterii kwasu mlekowego. 5. Transport białek wielofunkcyjnych na powierzchnię komórek bakteryjnych. 6. Ewolucja białek wielofunkcyjnych. 7. Wykrywanie białek wielofunkcyjnych. 8. Podsumowanie

Bacterial moonlighting proteins

Abstract: Existence of moonlighting proteins in microorganisms is a known phenomenon, yet still not well understood. Moonlighting proteins have at least two independent biological functions, which must be performed by one polypeptide chain without separation into protein domains. Most of these proteins, beside their role in the cytoplasm, play an important role outside of the cell i.e. they take part in the process of pathogenesis by binding and activating host's plasminogen. The existence of moonlighting proteins complicates the understanding of pathogenicity and virulence of many common bacteria as well as their role in commensal bacteria. Many of moonlighting proteins occurring in commensal bacteria appear to perform similar functions to proteins discovered in pathogenic bacteria, e.g. binding extracellular matrix. Moonlighting proteins found in bacteria are mostly housekeeping enzymes, especially from the glycolytic pathway, such as enolase, aldolase, dehydrogenase as well as heat-shock proteins and transcriptional factors.

1. Introduction. 2. Involvement of moonlighting proteins in bacterial pathogenesis. 3. Effect of moonlighting proteins on the immune system. 4. Moonlighting proteins in lactic acid bacteria. 5. Transportation of moonlighting proteins to the bacterial surface. 6. Evolution of moonlighting proteins. 7. Detection of moonlighting proteins. 8. Summary

Słowa kluczowe: bakteryjna patogenez, białka wielofunkcyjne, enzymy

Key words: bacterial pathogenesis, moonlighting proteins, enzymes

1. Wprowadzenie

Zjawisko występowania białek wielofunkcyjnych u mikroorganizmów jest zjawiskiem powszechnym, jednak wciąż niedokładnie poznanym. Z roku na rok pojawiają się liczne nowe doniesienia dostarczające niezwykle interesujących informacji dotyczących tych białek. Wyniki wykazujące, że jedno białko może pełnić wiele funkcji biologicznych opublikowane zostały po raz pierwszy w 1989 roku, a zjawisko to początkowo określano terminem „gene sharing” [40]. W 1999 roku Constance Jeffery dokładnie zdefiniowała cechy takich białek i wprowadziła stosowany powszechnie do dziś termin białek wielofunkcyjnych (moonlighting proteins) [20]. Białka wielofunkcyjne to białka, które pełnią co najmniej dwie niezależne od siebie funkcje biologiczne. Funkcje te muszą być pełnione przez jeden łańcuch polipeptydowy bez podziału na domeny białkowe. Wyklucza to jednoznacznie białka homologiczne, białka powstające na skutek fuzji genów, alternatywnego splicingu lub proteolizy. Jeffery opisała również przykłady mechanizmów, za pomocą których białka te mogą pełnić kilka funkcji, m.in. różny poziom ekspresji genów kodujących te białka, różna lokalizacja subkomórkowa,

oligomeryzacja lub w przypadku enzymów zmiana stężenia substratu, kofaktora lub produktu [20]. Obecnie internetowa baza danych MoonProt [32] zawiera 291 (czerwiec 2016) opisanych i eksperymentalnie zweryfikowanych białek wielofunkcyjnych, występujących m.in. u zwierząt, roślin, bakterii lub drożdży. Pierwszym białkiem wielofunkcyjnym, którego występowanie wykazano u bakterii była dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) *Streptococcus pyogenes*. Po wykazaniu, że GAPDH będąca enzymem szlaku glikolizy, oddziałuje z fibronektyną oraz białkami cytoszkieletu aktyną i miozyną, stało się oczywiste, że to białko wielofunkcyjne może uczestniczyć w kolonizacji gospodarza przez paciorkowce grupy A [37].

2. Udział białek wielofunkcyjnych w bakteryjnej patogenezie

Narastająca wśród bakterii patogennych wielolekooporność skłania badaczy do poszukiwania alternatywnych sposobów walki z tymi mikroorganizmami. Niewątpliwie pogłębianie wiedzy na temat białek wielofunkcyjnych obecnych na powierzchni komórek

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554 14 19; e-mail: j.placzkiwicz@biol.uw.edu.pl

bakteryjnych może okazać się jednym ze sposobów na stawienie czoła temu problemowi. Białka wielofunkcyjne uczestniczące w bakteryjnej patogenezie to przede wszystkim enzymy szlaków metabolicznych, głównie glikolizy, takie jak m.in. enolaza, aldolaza czy wspomniana wcześniej GAPDH, jak również białka opiekuńcze [32]. Większość spośród tych białek poza funkcją w cytoplazmie, pełni również istotną rolę na powierzchni komórki bakteryjnej uczestnicząc w patogenezie poprzez wiązanie i aktywację plazminogenu gospodarza [33]. Plazminogen w wyniku aktywacji poprzez bakteryjne streptokinazy i stafylokinazy przekształcany jest w aktywną formę – plazminę, której jedną z funkcji jest degradacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej, w tym lamininy, fibryny i fibrynogenu [4, 42]. Dodatkowo plazmina oraz plazminogen regulują dwa istotne systemy u kręgowców: kaskadę krzepnięcia i układ dopełniacza. Ułatwia to patogenom przetrwanie w organizmie gospodarza i skuteczną ucieczkę przed jego układem odpornościowym [4].

3. Wpływ białek wielofunkcyjnych na układ odpornościowy

Szereg zewnątrzkomórkowych białek bakteryjnych, określanych terminem VIP (Virulence-Associated Immunomodulatory Proteins) oddziałuje z układem odpornościowym gospodarza. Również bakteryjne białka wielofunkcyjne wykazują taką zdolność. Wyizolowane z podłoża, w którym hodowane były bakterie *Streptococcus agalactiae* białko wielofunkcyjne – GAPDH aktywowało limfocyty B do proliferacji i różnicowania [31].

Warianty immunologiczne otoczkowych polisacharydów *Staphylococcus pneumoniae* powszechnie stosowane są do typowania klinicznych izolatów tej bakterii. Analiza immunogennych białek ściany komórkowej *S. pneumoniae* za pomocą techniki spektrometrii mas MALDI-TOF wykazała w otoczkach obecność m.in. enzymów szlaku glikolizy, białek zaangażowanych w syntezę białek, oraz jednego białka opiekuńczego DnaK. Myszy BALB/c, immunizowano wybranymi rekombinowanymi białkami wielofunkcyjnymi, co skutkowało pojawieniem się przeciwciał przeciwko tym białkom, jak również przedłużało żywotność zwierząt immunizowanych przed infekcją *S. pneumoniae* szczepu WU1 [30].

Pałeczka *Aeromonas salmonicida* jest czynnikiem etiologicznym furunkulozy – choroby ryb powodującej olbrzymie straty ekonomiczne wśród hodowców, co związane jest z śmiertelnością ryb oraz ze zwiększonym zużyciem antybiotyków [19]. Większość badań nad szczepionkami wykorzystuje osady bakteryjne

inaktywowane formaliną, przez co usuwana zostaje bakteryjna frakcja zewnątrzkomórkowa. Analizy proteomiczne *A. salmonicida* wykazały natomiast, że liczna grupa wielofunkcyjnych białek, które lokalizują się na powierzchni ściany komórkowej ma właściwości immunogenne [48]. Przykłady przedstawione w tym punkcie przedstawiają perspektywę wykorzystania białek wielofunkcyjnych, jako potencjalnych celów działania szczepionek.

4. Obecność białek wielofunkcyjnych u bakterii kwasu mlekowego

Początkowo badania dotyczące białek wielofunkcyjnych ograniczały się do ich udziału w bakteryjnej patogenezie. Jednakże stopniowo pojawiające się doniesienia na temat ich obecności u bakterii kwasu mlekowego dostarczają zaskakujących informacji. Wiele z białek wielofunkcyjnych występujących u gatunków komensalnych okazuje się pełnić zbliżone funkcje do tych odkrytych u bakterii patogennych, jak np. oddziaływanie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, czy plazminogenem [3, 10]. Podobnie jest również w przypadku udziału tych białek w adhezji do komórek nabłonkowych, czy komórek błon śluzowych gospodarza. Czynniki elongacyjny Tu (EL-Tu) oraz białko szoku cieplnego GroEL laseczki kwasu mlekowego *Lactobacillus johnsonii* La1, uczestniczą w adhezji tej bakterii do komórek nabłonkowych oraz do komórek błony śluzowej jelita [5, 16]. GAPDH zlokalizowana na powierzchni *Lactobacillus plantarum* również wykazuje zdolność wiązania do powierzchni błony śluzowej jelita grubego. Usunięcie białek powierzchniowych tych bakterii skutkuje spadkiem adhezji badanych laseczek do ludzkich komórek nabłonkowych okrężnicy linii Caco-2 o 40% [26]. Jako, że GAPDH jest białkiem wielofunkcyjnym charakterystycznym również dla patogenów, możliwe jest, że dochodzi do konkurencji o miejsca wiązania na powierzchni komórek nabłonkowych z bakteriami patogennymi. Potwierdziły to wyniki badań, w których wykazano, że kolonizacja komórek Caco-2 przez *L. plantarum*, w znacznym stopniu zapobiega adhezji patogenów takich jak *Clostridium sporogenes* i *Enterococcus faecalis* [41]. Również białka wielofunkcyjne obecne na powierzchni komensalnej bakterii żeńskich dróg rodnych *Lactobacillus jensenii* wykazują zdolność hamowania adhezji bakterii patogennych [45]. Kluczowym etapem infekcji *Neisseria gonorrhoeae* jest adhezja do komórek nabłonkowych [18]. Enolaza uwolniona przez *L. jensenii* do supernatantu (RSC- released surface components), hamuje adhezję *N. gonorrhoeae* do ludzkich komórek nabłonkowych endometrium linii Hec-1-B. Procent komórek patogenu ulegających adhezji jest skorelowany ze stężeniem rekombinowanej enolazy

i może zmniejszać się nawet czterokrotnie. Borgdorff i wsp. wykazali obecność licznych białek wielofunkcyjnych, a przede wszystkim GAPDH i GPI *Lactobacillus iners* i *Lactobacillus crispatus* w materiale pobranym z dróg rodnych rwandyjskich kobiet narażonych na infekcję wirusem HIV [7]. W przypadku *L. iners* zaobserwowano znaczący spadek ilości tych białek w preparatach od kobiet z dysbiozą naturalnej mikroflory, podobną zależność zaobserwowano również dla *L. crispatus*, lecz w mniejszym stopniu. Według badaczy wyniki mogą świadczyć o strategii przetrwania bakterii komensalnych, które utrzymują wewnątrzkomórkowo w warunkach dysbiozy istotne enzymy metabolizmu podstawowego. Jednakże prowadzić to może do całkowitego wyparcia tych bakterii przez gatunki patogenne. Prawdopodobna wydaje się być również hipoteza, iż duża obecność białek wielofunkcyjnych w środowisku skutkuje przetrwaniem naturalnej mikroflory, tym samym mniejsza ilość tych białek prowadzić może do dysbiozy. Z kolei Kainulainen i wsp. wykazali, iż to warunki stresu komórkowego jak np. zmiana pH z kwasowego na zasadowe skutkuje uwolnieniem bakterierynych białek wielofunkcyjnych z powierzchni *L. crispatus* do otoczenia [24].

Oddziaływania z plazminogenem są charakterystyczną cechą patogennych bakterii takich jak np. *Escherichia coli* [38], czy *Listeria monocytogenes* [43], umożliwiającą im skuteczną kolonizację infekowanej niszy. Również enolaza *Bacteroides fragilis* będącego powszechną bakterią komensalną mikrobiomu układu pokarmowego człowieka, wywołującego częste zakażenia oportunistyczne posiada zdolność oddziaływania z plazminogenem [44]. Białka wielofunkcyjne licznych gatunków z rodzaju *Bifidobacterium*, stanowiących prawie 3% całkowitej mikroflory jelitowej człowieka, również wykazują zdolność wiązania plazminogenu [9]. Ponieważ patogeny i bakterie symbiotyczne ludzkiego przewodu pokarmowego zasiedlają tę samą niszę ekologiczną prawdopodobne jest, że łączą je podobne mechanizmy kolonizacji związane m.in. ze zdolnością wiązania plazminogenu.

5. Transport białek wielofunkcyjnych na powierzchnię komórek bakterierynych

Bakteryjna błona cytoplazmatyczna mimo bardzo dynamicznej struktury jest nieprzepuszczalna dla cząsteczek posiadających ładunek oraz większych niż 100 Da. Większość białek transportowanych na powierzchnię komórki bakterierynej zawiera N-końcową sekwencję sygnałową [13]. Tym bardziej interesujący jest fakt, że dla większości białek wielofunkcyjnych wykazano brak obecności znanej sekwencji sygnałowej. Potwierdziła to analiza bioinformatyczna z wykorzy-

staniem narzędzi takich jak SignalIP, czy Psort przeprowadzona dla 98 białek wielofunkcyjnych różnych organizmów. W żadnym z rozpatrywanych przypadków nie dowiedziono obecności sekwencji sygnałowej [2]. Dysmutaza ponadtlenkowa *Mycobacterium tuberculosis* oraz białka wielofunkcyjne *L. monocytogenes*: GroEL i izomeraza fosfomannozy są jedynymi białkami pozbawionymi znanej sekwencji sygnałowej, których transport przez błonę komórkową został wyjaśniony [8, 29]. Zaangażowany w ten proces jest system sekrecji Sec, który jest silnie konserwowany wśród bakterii. Białka transportowane przez ten system jak np. autolizyny zawierają klasyczną N-końcową sekwencję sygnałową [12]. Według autora badań dotyczących *L. monocytogenes*, transport białek GroEL i izomerazy fosfomannozy związany może być właśnie z aktywnością autolizyn. Wykazano, że autolizyny uczestniczą w eksporcie elementów rzęski na powierzchnię komórki bakterieryjnej prawdopodobnie poprzez tworzenie porów w ścianie komórkowej [34]. Niewykluczone jest, że transport białek wielofunkcyjnych *L. monocytogenes* związany jest z aktywnością autolizyn tworzących miejsca w ścianie komórkowej, przez które białka te mogłyby przedostać się na powierzchnię komórki [29].

W 2010 roku Pasztor wraz z współpracownikami na podstawie badań białek wielofunkcyjnych *Staphylococcus aureus* postawił hipotezę, iż to liza komórek bakterieryjnych może prowadzić do uwolnienia tych białek do supernatantu. Następnie białka te miałyby ulec asocjacji na powierzchni sąsiadujących bakterii. Badacze wykazali, że mutacja w genie kodującym główną hydrolazę peptydoglikanu *S. aureus* – Atl skutkuje spadkiem obecności w sekretomie 22 białek cytoplazmatycznych [39]. Z kolei w 2012 roku opublikowane zostały wyniki badań demonstrujących zdolność GAPDH *Streptococcus agalactiae* do wiązania się z powierzchnią licznych, nawet filogenetycznie odległych bakterii [35]. Zaobserwowano również zależność pomiędzy spadkiem lizy badanych komórek bakterieryjnych, a spadkiem ilości GAPDH w supernatancie, co było zgodne z doniesieniami Pasztor i wsp. [39].

Opierając się na doniesieniach, że liza komórki jest efektywnym mechanizmem dostarczania elementów cytoplazmatycznych do środowiska, również badania dotyczące biofilmów bakterieryjnych zaczęły skupiać się na tym zjawisku. Analizy biofilmów *P. aeruginosa* wykazały, że liza komórek bakterieryjnych zachodzi na skutek ekspresji genu kodującego endolizynę (*lys*). Dodatkowo zaobserwowano, że liza komórki bakterieryjnej jest mechanizmem sprzyjającym biogenezie pęcherzyków błonowych. Pęcherzyki tworzące się z fragmentów błony rozpadającej się komórki prawdopodobnie wyłapują uwolnione komponenty cytoplazmatyczne. Mimo że biogeneza pęcherzyków w wyniku lizy komórki bakterieryjnej nie jest zjawiskiem precyzyjnie kontrolowanym,

może stanowić kolejny poznany mechanizm transportu białek wielofunkcyjnych [47].

Jednakże doniesienia dotyczące transportu białek wielofunkcyjnych na powierzchnie komórki są często sprzeczne, co świadczy o tym, że w proces ten zaangażowanych może być wiele mechanizmów. W 2015 roku Ebner oraz współpracownicy wykazali, że aldolaza oraz enolaza *S. aureus* najprawdopodobniej nie wiążą się z powierzchnią komórek bakteryjnych na skutek lizy. W fazie eksponentialnej wzrostu, gdzie liczba lizujących komórek jest najmniejsza, zaobserwowano największą liczbę tych białek na powierzchni komórki w porównaniu z innymi fazami wzrostu [13].

6. Ewolucja białek wielofunkcyjnych

Wiele z poznanych białek wielofunkcyjnych jest enzymami silnie konserwowanymi ewolucyjnie. Przypuszcza się, że 7 z 10 białek glikolizy oraz 7 z 8 Cyklu Krebsa pełni dodatkową funkcję [46]. Dodatkowe funkcje zdają się występować częściej w białkach, w których kodujące je geny ulegają konstytutywnej ekspresji. Może to być jednak związane z faktem, że konserwowane ewolucyjnie geny obecne są w wielu różnych organizmach, tym samym wyższa jest szansa na identyfikację nowej funkcji [14].

Istnienie białek wielofunkcyjnych tłumaczyć może teoria mówiąca, że nie ma żadnego końcowego celu w ewolucji, a nowe funkcje rozwijają się jedynie przez adaptację już istniejących. Jeżeli konkretna nowa funkcja białka skutkuje korzyścią dla organizmu, to funkcja ta będzie podlegać selekcji w trakcie ewolucji [15]. Zaskakująco nawet niewielka mutacja może skutkować zmianą funkcji. *Enterobacter aerogenes* produkuje paraliżującą toksynę wykorzystywaną przez drapieżne larwy mrówkolwów z rodziny *Myrmeleontidae*. Okazało się, że toksyna ta produkowana przez *E. aerogenes* jest homologiem białka opiekuńczego GroEL *E. coli*, niewykazującego właściwości toksycznych. Substytucja jedynie 4 aminokwasów w sekwencji aminokwasowej toksycznego białka *E. aerogenes* skutkowałą znacznym spadkiem jego toksyczności [49].

Wzór ekspresji genów niezbędny dla jednej funkcji może być niezbyt idealny dla drugiej. W takiej sytuacji dystrybuowanie oryginalnej oraz dodatkowej funkcji białka wielofunkcyjnego na dwa geny w wyniku duplikacji może być bardzo korzystne, co zostało szerzej omówione w doskonałej pracy przeglądowej autorstwa Huberts oraz van der Klei [17]. Analizując strukturę białka, druga funkcja może być rezultatem nowego wykorzystania istniejącego miejsca wiązania lub modyfikacji regionów nieużywanych. Przykładem może być izomeraza glukozy-6-fosforanu, której sekwencja aminokwasowa miejsca aktywnego jest silnie

konserwowana wśród licznych gatunków. Natomiast w pozostałej części enzymu występują liczne kieszonki, pętle oraz inne struktury, które przez miliardy lat ewolucji mogły z łatwością wytworzyć własne, dodatkowe miejsce aktywne zapewniając tym białkom dodatkową funkcję [23].

7. Wykrywanie białek wielofunkcyjnych

Białka wielofunkcyjne stanowią olbrzymie wyzwanie dla badaczy. Utrudnieniem jest fakt, że białka homologiczne często nie są wielofunkcyjne. Ogromna liczba poznanych sekwencji białkowych oraz zwiększająca się dostępność technik umożliwiających analizę wielu białek jednocześnie zapoczątkowała rosnące zainteresowanie proteomiką – również w celu wykrywania białek wielofunkcyjnych. Projekty proteomiczne angażujące biochemiczne, genetyczne oraz bioinformatyczne techniki mogą determinować cechy setek, a nawet tysięcy białek podczas jednej analizy, nie opierając się na wcześniej oszacowanych danych. Modele ewolucji białek wielofunkcyjnych, można zastosować dla wielu białek. Sugeruje to, że obecna liczba poznanych i eksperymentalnie zweryfikowanych białek wielofunkcyjnych prawdopodobnie reprezentuje niewielki odsetek tych, które rzeczywiście istnieją. Stąd wyniki dostarczające informacji na temat lokalizacji, interakcji z innymi cząsteczkami, czy wynikających z mutacji w genach niespodziewanych fenotypów, mogą być często klasyfikowane jako wyniki fałszywie pozytywne.

Pierwszą wysokoprzepustową próbą identyfikacji dodatkowych funkcji znanych białek była przeprowadzona w 2015 roku analiza w oparciu o sieci oddziaływań pomiędzy białkami (PPIs – protein-protein interactions) w ludzkim interaktomie. Zidentyfikowano 430 konserwowanych ewolucyjnie białek określonych terminem EMFs (Extreme Multifunctional Proteins), charakteryzujących się określonym zestawem cech, w tym m.in. względnie stałą ekspresją genów kodujących te białka lub dużą liczbą interaktorów. Autorzy podkreślają, że białka EMF nie spełniają wszystkich kryteriów białek wielofunkcyjnych natomiast istnieje duże prawdopodobieństwo, że białka wielofunkcyjne stanowią podgrupę białek EMF [11].

Analizę porównawczą 11 narzędzi bioinformatycznych do przewidywania funkcji białek wielofunkcyjnych przeprowadził Gomez wraz ze współpracownikami, czego wynikiem było wskazanie platformy PSI-BLAST, jako relatywnie dobrej [1]. W oszacowywaniu funkcji na podstawie odległych sekwencji wykorzystywane jest również narzędzie PFP [25]. Jeffery, będąca autorką terminu „moonlighting proteins” oraz wieloletnią badaczką tego zjawiska postanowiła wykorzystując analizy bioinformatyczne ocenić czy białka

te wykazują podobne cechy fizyczne. Analiza 98 białek wielofunkcyjnych różnych gatunków dotyczyła określenia punktu izoelektrycznego, składu aminokwasowego, indeksu alifatyczności oraz GRAVY (Grand Average of Hydrophaty) [28]. Wykorzystano w tym celu program Protparam [6], dzięki czemu udało się określić liczne wspólne cechy fizyczne tych białek. W większości białka wielofunkcyjne występujące na powierzchni komórek posiadają istotne cechy typowych białek wewnątrzkomórkowych. Autorzy postawili hipotezę, że wielofunkcyjność może być powszechną cechą białek, a przeprowadzona analiza umożliwi ich łatwiejszą identyfikację [2].

Spektrometria mas oraz dwuwymiarowa elektroforeza żelowa są bardzo dobrymi technikami służącymi do identyfikacji białek obecnych w tkankach, czy w różnych przedziałach subkomórkowych. W związku z tym spektrometria mas może stanowić istotną technikę wykrywania białek wielofunkcyjnych, gdyż obecność białek w niespodziewanej lokalizacji komórkowej, czy kompleksie białkowym sugeruje, że białko to prawdopodobnie posiada drugą funkcję [22]. Analiza elektroforetyczna 2D-DIGE białka LuxS, będącego autoinduktorem w zjawisku quorum sensing *Salmonella Typhimurium* wykazała, że białko to ulega modyfikacji potranslacyjnej. Na podstawie tych wyników przeprowadzono dalsze analizy, które potwierdzały przypuszczenia badaczy, że białko to lokalizuje się również po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Fakt, że zewnętrzne białko LuxS pozbawione było typowej sekwencji sygnałowej pozwala przypuszczać, że zostało odkryte nowe białko wielofunkcyjne o nieznanym celu. Przykład ten pokazuje w jaki sposób wysokopręciowe analizy elektroforetyczne mogą posłużyć do wykrywania nowych białek wielofunkcyjnych [27]. Również określone za pomocą promieniowania rentgenowskiego struktury krystaliczne białek wielofunkcyjnych pomogły w zrozumieniu w jaki sposób białka te mogą posiadać dwie funkcje w zależności od warunków środowiskowych lub komórkowych [21].

Interakcję białek wielofunkcyjnych z innymi cząsteczkami (białkami, przeciwciałami, peptydami) *in vitro* badać można z wykorzystaniem mikromacierzy białkowych. Nową strategią poszukiwania dodatkowych funkcji enzymów jest porównywanie fenotypu w szczepach, w których enzym został inaktywowany przez mutację punktową ze szczepami, w których przeprowadzono delecję całego genu. W przypadku genów kodujących białka wielofunkcyjne powinna występować rozbieżność w fenotypach [17]. Obecność białek wielofunkcyjnych wykazano również u organizmów eukariotycznych, w tym u drożdży. Mutacja w genie kodującym dekarboksylazę pirogronianową drożdży szczepu *Hansenula polymorpha* skutkuje akumulacją nieaktywnych monomerów oksydazy alkoholowej

w cytoplazmie. Takie odkrycie sugeruje, że dekarboksylaza pirogronianowa jest białkiem wielofunkcyjnym, a druga funkcja związana jest z gromadzeniem oksydazy alkoholowej [36].

8. Podsumowanie

Obecnie trudno jest oszacować jak powszechne są białka wielofunkcyjne. Zwiększająca się liczba doniesień na temat ich kluczowej roli w bakteryjnej patogenezie stanowi jednocześnie olbrzymią możliwość, jak i wyzwanie dla współczesnej biologii molekularnej, biotechnologii i medycyny. Profesor Dame Sally Davies naczelny lekarz Wielkiej Brytanii w swoim raporcie przedstawiła skutki narastającej oporności na antybiotyki, tym samym nawołując m. in. WHO do podjęcia walki z tym kryzysem. Podstawą dla potencjalnego wykorzystania białek wielofunkcyjnych jest dokładne ich poznanie. Badacze muszą poszerzyć dotychczasową wiedzę na temat struktury, nowych funkcji, mechanizmów transportu na powierzchnię komórki bakteryjnej, ewolucji, czy roli bakterii komensalnych. Dodatkowo ze względu na różnorodność białek wielofunkcyjnych wśród bakterii, istotne jest aby możliwie jak najdokładniej scharakteryzować udział w patogenezie w różnych warunkach, dla różnych gatunków. Istotne może okazać się również badanie interakcji pomiędzy białkami wielofunkcyjnymi obecnymi na powierzchni ludzkich komórek, bakterii komensalnych, czy innych bakterii patogennych z tymi obecnymi u analizowanego gatunku. Z pewnością rozwój proteomiki oraz poznanie większej ilości białek wielofunkcyjnych pozwoli na ich lepszą systematykę, jednocześnie stanowiąc podstawę do stworzenia baz danych, które mogłyby ułatwić dalsze badania.

Piśmiennictwo

1. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997)
2. Amblee V., Jeffery C.J.: Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. *PLoS One*, **10**, e0130575 (2015)
3. Antikainen J., Kuparinen V., Lähteenmäki K., Korhonen T.K.: Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 526–534 (2007)
4. Barthel D., Schindler S., Zipfel P.F.: Plasminogen is a complement inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18831–18842 (2012)
5. Bergonzelli G.E., Granato D., Pridmore R.D., Marvin-Guy L.F., Donnicola D., Corthésy-Theulaz I.E.: GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **74**, 425–434 (2006)

6. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000)
7. Borgdorff H., Armstrong S.D., Tytgat H.L., Xia D., Ndayisaba G.F., Wastling J.M., van de Wijgert J.H.: Unique insights in the cervicovaginal *Lactobacillus iners* and *L. crispatus* proteomes and their associations with microbiota dysbiosis. *PLoS One*, **11**, e0150767 (2016)
8. Braunstein M., Espinosa B.J., Chan J., Belisle J.T., Jacobs W.R.: SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **48**, 453–464 (2003)
9. Candela M., Bergmann S., Vici M., Vitali B., Turrone S., Eikmanns B.J., Hammerschmidt S., Brigidi P.: Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.* **189**, 5929–5936 (2007)
10. Castaldo C., Vastano V., Siciliano R.A., Candela M., Vici M., Muscariello L., Marasco R., Sacco M.: Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell Fact.* **8**, 14 (2009)
11. Chapple C. E., Robisson B., Spinelli L., Guien C., Becker E., Brun C.: Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network. *Nat. Commun.* **6**, 7412 (2015)
12. Danese P.N., Silhavy T.J.: Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 59–94 (1998)
13. Ebner P., Rinker J., Götz F.: Excretion of cytoplasmic proteins in *Staphylococcus* is most likely not due to cell lysis. *Curr. Genet.* **62**, 19–23 (2016)
14. Fothergill-Gilmore L.A., Michels P.A.: Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 105–235 (1993)
15. Gancedo C., Flores C.L.: Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 197–210 (2008)
16. Granato D., Bergonzelli G.E., Pridmore R.D., Marvin L., Rouvet M., Corthésy-Theulaz I.E.: Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* **72**, 2160–2169 (2004)
17. Huberts D.H., van der Klei I.J.: Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 520–525 (2010)
18. Hung M.C., Christodoulides M.: The biology of *Neisseria* adhesins. *Biology (Basel)*, **2**, 1054–1109 (2013)
19. Janda J.M., Abbott S.L.: The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 35–73 (2010)
20. Jeffery C.J.: Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11 (1999)
21. Jeffery C.J.: Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 663–668 (2004)
22. Jeffery C.J.: Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 772–782 (2005)
23. Jeffery C.J., Bahnson B.J., Chien W., Ringe D., Petsko G.A.: Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator. *Biochemistry*, **39**, 955–964 (2000)
24. Kainulainen V., Loimaranta V., Pekkala A., Edelman S., Antikainen J., Kylväjä R., Laakkonen M., Laakkonen L., Finne J., Korhonen T. K.: Glutamine synthetase and glucose-6-phosphate isomerase are adhesive moonlighting proteins of *Lactobacillus crispatus* released by epithelial cathelicidin LL-37. *J. Bacteriol.* **194**, 2509–2519 (2012)
25. Khan I., Chitale M., Rayon C., Kihara D.: Evaluation of function predictions by PFP, ESG, and PSI-BLAST for moonlighting proteins. *BMC Proc.* **6**, Suppl. 7, S5 (2012)
26. Kinoshita H., Saito T. i wsp.: Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1667–1674 (2008)
27. Kint G., Sonck K.A., Schoofs G., De Coster D., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: 2D proteome analysis initiates new insights on the *Salmonella Typhimurium* LuxS protein. *BMC Microbiol.* **9**, 198 (2009)
28. Kyte J., Doolittle R.F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132 (1982)
29. Lenz L.L., Mohammadi S., Geissler A., Portnoy D.A.: SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12432–12437 (2003)
30. Ling E., Feldman G., Portnoi M., Dagan R., Overweg K., Mulholland F., Chalifa-Caspi V., Wells J., Mizrahi-Nebenzahl Y.: Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 290–298 (2004)
31. Madureira P., Ferreira P. i wsp.: *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J. Immunol.* **178**, 1379–1387 (2007)
32. Mani M., Chen C., Amblee V., Liu H., Mathur T., Zwicke G., Zabad S., Patel B., Thakkar J., Jeffery C. J.: MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Res.* **43**, D277–282 (2015)
33. Matta S.K., Agarwal S., Bhatnagar R.: Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2111–2120 (2010)
34. Nambu T., Minamino T., Macnab R.M., Kutsukake K.: Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**, 1555–1561 (1999)
35. Oliveira L., Madureira P., Andrade E.B., Bouaboud A., Morello E., Ferreira P., Poyart C., Trieu-Cuot P., Dramsi S.: Group B Streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages. *PLoS One*, **7**, e29963 (2012)
36. Ozimek P., van Dijk R., Latchev K., Gancedo C., Wang D.Y., van der Klei I.J., Veenhuis M.: Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 786–797 (2003)
37. Pancholi V., Fischetti V.A.: A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**, 415–426 (1992)
38. Parkkinen J., Korhonen T.K.: Binding of plasminogen to *Escherichia coli* adhesion proteins. *FEBS Lett.* **250**, 437–440 (1989)
39. Pasztor L., Götz F. i wsp.: Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. *J. Biol. Chem.* **285**, 36794–36803 (2010)
40. Piatigorsky J., Wistow G.J.: Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, **57**, 197–199 (1989)
41. Ramiah K., van Reenen C.A., Dicks L.M.: Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.* **159**, 470–475 (2008)

42. Sazonova I.Y., Houg A.K., Chowdhry S.A., Robinson B.R., Hedstrom L., Reed G.L.: The mechanism of a bacterial plasminogen activator intermediate between streptokinase and staphylokinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 12609–12613 (2001)
43. Schaumburg J., Diekmann O., Hagendorff P., Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S., Jänsch L., Wehland J., Käst U.: The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*, **4**, 2991–3006 (2004)
44. Sijbrandi R., Den Blaauwen T., Tame J.R., Oudega B., Luirink J., Otto B.R.: Characterization of an iron-regulated alpha-enolase of *Bacteroides fragilis*. *Microbes Infect.* **79**–18 (2005)
45. Spurbeck R.R., Arvidson C.G.: *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 3103–3111 (2010)
46. Sriram G., Martinez J.A., McCabe E.R., Liao J.C., Dipple K.M.: Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 911–924 (2005)
47. Turnbull L., Whitchurch C.B. i wsp.: Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.* **7**, 11220 (2016)
48. Vanden Bergh P., Heller M., Braga-Lagache S., Frey J.: *The Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* exoproteome: global analysis, moonlighting proteins and putative antigens for vaccination against furunculosis. *Proteome Sci.* **11**, 44 (2013)
49. Yoshida N., Oeda K., Watanabe E., Mikami T., Fukita Y, Nishimura K., Komai K., Matsuda K.: Protein function. Chaperonin turned insect toxin. *Nature*, **411**, 44 (2001)