

## GENEROWANIE MOSTKÓW DISIARCZKOWYCH W BIAŁKACH – RÓŻNORODNOŚĆ STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA BIAŁEK DSBA

Anna Marta Banaś, Anna Petrykowska, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka\*

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

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w październiku 2020 r.

**Streszczenie:** Białka Dsb katalizują wprowadzanie mostków disiarczkowych pomiędzy grupami tiolowymi reszt cysteinowych do białek pozacytoplazmatycznych w komórkach bakterii. Proces ten warunkuje osiągnięcie przez białka prawidłowej struktury, umożliwiającej pełnienie funkcji w komórce. Najlepiej poznanym i scharakteryzowanym białkiem zaangażowanym w proces wprowadzania mostków disiarczkowych jest monomeryczna oksydoreduktaza DsbA, działająca w komórkach modelowego organizmu *Escherichia coli*. Badania wielu mikroorganizmów pokazały ogromną różnorodność funkcjonowania szlaku wprowadzania mostków disiarczkowych. W prezentowanej pracy zebrano informacje charakteryzujące wyodrębnione strukturalne i filogenetyczne grupy białek DsbA różnych gatunków bakterii. Opiszano ich właściwości fizykochemiczne a także oddziaływanie z partnerami redoks oraz substratami. Skoncentrowano się również na opisanu dimerycznych białek, pełniących rolę w procesie wprowadzania mostków disiarczkowych. Ponieważ białka Dsb decydują często o aktywności czynników wirulencji, poznanie ich struktury i mechanizmów działania może przyspieszyć opracowanie nowych terapii antybakteryjnych.

1. Wstęp. 2. System białek Dsb *Escherichia coli*. 2.1. Charakterystyka tiolowej oksydoreduktazy *E. coli* – białka DsbA. 2.2. Białka szlaku izomerizacji-redukcji. 3. Klasyfikacja monomerycznych białek DsbA. 3.1. Fizyczno-chemiczne właściwości różnych grup DsbA. 4. Oddziaływanie DsbA z dwiema grupami substratów – partnerami redoks oraz substratami. 4.1. Oddziaływanie z partnerami redoks. 4.2. Oddziaływanie z substratami. 5. Dimeryczne oksydoreduktazy o aktywności oksydacyjnej. 6. Podsumowanie. 7. Piśmiennictwo

### DISULFIDE BONDS FORMATION IN BACTERIAL PROTEINS – STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY AMONG DSBA PROTEINS

**Abstract:** Bacterial proteins of the Dsb (disulfide bond) system catalyze the formation of disulfide bridges, a post-translational modification of extra-cytoplasmic proteins, which leads to stabilization of their tertiary and quaternary structures and often influences their activity. DsbA – *Escherichia coli* monomeric oxidoreductase is the best studied protein involved in this process. Recent rapid advances in global analysis of bacteria have thrown light on the enormous diversity among bacterial Dsb systems. The set of Dsb proteins involved in the oxidative pathway, varies, depending on the microorganism. In this article we have focused on characterization of structural and phylogenetic groups of monomeric DsbAs. This review discusses their physicochemical features and interactions with redox partners as well as with substrate proteins. The last part of the review concentrates on dimeric oxidoreductases responsible for disulfide generation. Many virulence factors are the substrates of the Dsb proteins. Thus unraveling the machinery that introduces disulfide bonds and expanding knowledge about Dsb protein structures and their activities may facilitate the discovery of an effective anti-bacterial drugs.

1. Introduction. 2. *Escherichia coli* Dsb system. 2.1. Characteristic of the *E. coli* thiol oxidoreductase – DsbA. 2.2. Izomerization / reduction pathway proteins. 3. Classification of the monomeric DsbAs. 3.1. Physicochemical features of different classes of DsbAs. 4. DsbA interactions with redox partner and substrates. 4.1. DsbA interactions with redox partner. 4.2. DsbA interactions with substrates. 5. Dimeric Dsb proteins with oxidative activity. 6. Conclusions. 7. References

**Słowa kluczowe:** białka Dsb, dimeryczne oksydazy Dsb, EcDsbA, klasyfikacja DsbA, mostki disiarczkowe

**Key words:** Dsb proteins, dimeric Dsb oxidases, EcDsbA, DsbA classification, disulfide bonds

### 1. Wstęp

Procesy utleniania i redukcji reszt cysteinowych białek odgrywają istotną rolę w wielu procesach zachodzących w komórkach, pełniąc rolę strukturalną, katalityczną oraz sygnalizacyjną. Generowanie mostków disiarczkowych, będących kowalencyjnymi wiązaniami wytwarzanymi w reakcji utleniania reszt cysteinowych

białek, jest istotnym elementem procesu dojrzewania protein zapewniającym ich funkcjonalność poprzez wpływ na ich konformację i stabilność. W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces ten zachodzi w utleniających warunkach przestrzeni peryplazmatycznej i jest katalizowany przez zespół białek Dsb (disulfide bond). W strukturze przestrzennej białek Dsb wyróżnia się domenę tioredoksyny (TRX) ze ściśle konserwowanym,

\* Autor korespondencyjny: prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

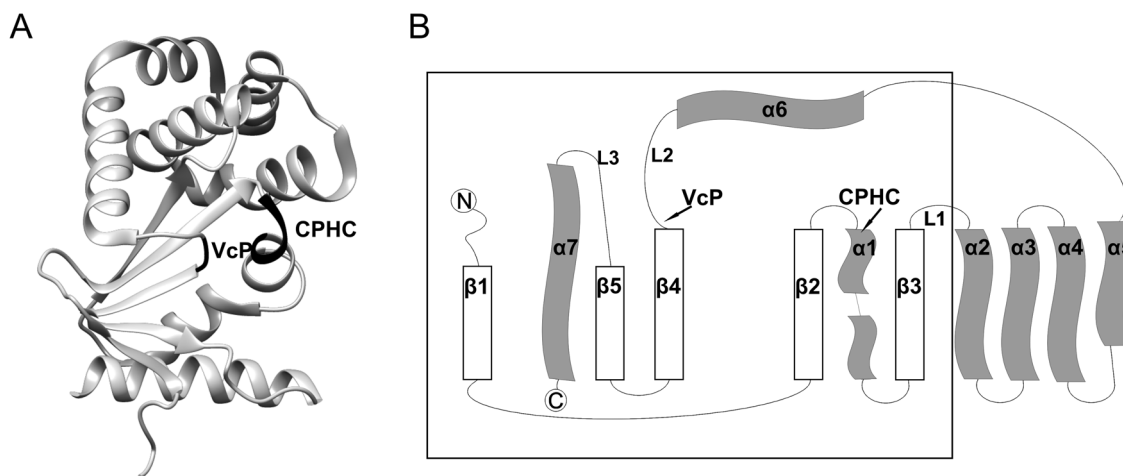
aktywnym motywem CXXC oraz tak zwaną pętlę prolinową (reszta cis-proliny w strukturze przestrzennej białka sąsiadująca z motywem CXXC i oddziałująca z cysteiną aktywną w reakcji redoks). Oba te elementy odgrywają istotną rolę w oddziaływaniach białek Dsb z ich partnerami redoks i substratami. Ponieważ czynniki wirulencji wielu patogennych bakterii to białka pozacytoplazmatyczne, które dla osiągnięcia właściwej struktury wymagają wprowadzenia mostków disiarczkowych, aktywność systemów Dsb jest istotną determinantą zjadliwości mikroorganizmów. Rozwiązanie struktur białek Dsb oraz zrozumienie mechanizmów ich działania zapoczątkowało badania zmierzające do wykorzystania ich jako celów leków antybakteryjnych [6, 58]. Wykorzystanie różnorodnych strategii (mikrobiologicznych, biochemicznych, biofizycznych, bioinformatycznych czy proteomicznych) zaowocowało w ostatnich latach szczegółową charakterystyką funkcjonowania sieci Dsb modelowej bakterii *Escherichia coli* (EcDsb). Dane te przedstawia wiele znakomitych publikacji przeglądowych. Ostatnio opublikowane to między innymi [3, 40, 43]. Doskonalenie metod sekwencjonowania materiału genetycznego ujawniło różnorodność systemów Dsb w świecie mikroorganizmów. Różnice dotyczą liczby białek Dsb konkretnej kategorii, ich wzajemnych interakcji oraz struktur i obserwowane są nie tylko pomiędzy przedstawicielami różnych rodzajów czy gatunków, ale także czasami pomiędzy szczepami tego samego gatunku bakterii [8, 18, 42]. Prezentowana praca przeglądowa przedstawia charakterystykę białek DsbA bezpośrednio odpowiedzialnych za wprowadzanie mostków disiarczkowych do białek pozacytoplazmatycznych bakterii Gram-ujemnych. Koncentruje się na uzyskanych w ostatnich latach danych dotyczących ich struktur, filogenezy oraz oddziaływań z partnerami redoks i substratami.

## 2. System białek Dsb *Escherichia coli*

### 2.1. Charakterystyka tiolowej oksydoreduktazy *Escherichia coli* – białka DsbA

Modelowym i najdokładniej scharakteryzowanym w wielu aspektach białkiem DsbA jest EcDsbA. Zostało ono zidentyfikowane w roku 1991 a jego strukturę rozwiązano w roku 1993 [5, 44]. EcDsbA (21 kDa) jest monomerem składającym się z dwóch domen: tioredoksynowej i helikalnej (Ryc. 1). Domena tioredoksynowa (około 90 reszt aminokwasowych) zawiera pięć  $\beta$ -kartek/harmonijek połączonych trzema  $\alpha$ -helisami (H1, H6 i H7). Helisy H2-H5 tworzą domenę helikalną. Cechą charakterystyczną EcDsbA jest obecność  $\alpha$ -heliakalnej domeny wewnątrz domeny tioredoksynowej. Centrum katalityczne tworzy motyw CXXC (CPHC) zlokalizowany na N-końcu helisy H1, otoczony trzema pętlami. Pętla pierwsza (L1) łączy harmonijkę  $\beta$ 3 i helisę H2, pętla druga (L2) określana jako pętla cisPro (cisPro loop) łączy fragmenty H6 i  $\beta$ 4, a pętla 3 (L3) łączy fragmenty  $\beta$ 5 i H7. Wytworzony na powierzchni EcDsbA, powyżej aktywnego motywu, hydrofobowy rowek oraz ładunek powierzchniowy decydują o aktywności enzymatycznej białka, jego oddziaływaniach z substratami, zarówno partnerem redoks jak i białkami do których wprowadzane są mostki disiarczkowe [57]. W przeciwieństwie do większości białek peryplazmatycznych przenoszonych do peryplazmy po zakończeniu procesu translacji, DsbA jest transportowane przez błonę wewnętrzną komórki kotranslacyjnie, w sposób zależny od SRP (signal recognition particle) z wykorzystaniem translokonu SecYEG [56].

DsbA katalizuje tworzenie wiązań disiarczkowych bezpośrednio po transporcie białka do peryplazmy, a jego substraty mogą być na różnych etapach związania.



Ryc. 1. Struktura białka DsbA pochodzącego z *Escherichia coli*

A) Struktura przestrzenna białka DsbA *E. coli* (PDB, 1FVK [20]). W kolorze czarnym zaznaczono lokalizację motywów katalitycznych CPHC oraz VcP. (B) Schematyczne ułożenie elementów strukturalnych białka EcDsbA. W ramce zaznaczono domenę tioredoksynową (opis w tekście).  $\beta$ -kartki są reprezentowane przez prostokąty,  $\alpha$ -helisy – przez faliste czworokąty.

W warunkach *in vivo* proces ten wymaga współdziałania kilku oksydoreduktaz warunkujących transport elektronów. Proces rozpoczyna się od nukleofilowego ataku zredukowanej cysteiny białka, które jest substratem dla DsbA. Atak dokonywany jest na N-terminalną, zlokalizowaną na powierzchni białka cysteinę C30 motywu CPHC DsbA. Ukryta we wnętrzu DsbA cysteina C33 nie bierze udziału w tym procesie. W wyniku tej reakcji powstaje przejściowy kompleks pomiędzy DsbA i substratem. W następnym etapie, kolejna cysteina białka substratowego przeprowadza atak na cysteinę połączoną z DsbA. Następuje utlenienie substratu i redukcja białka DsbA [13].

Partnerem redoks DsbA, odpowiadającym za odtworzenie jego utlenionej aktywnej formy, jest białko błony wewnętrznej EcDsbB. W jego sekwencji aminokwasowej obecne jest sześć reszt cysteinowych, spośród których cztery są niezbędne do ponownego utlenienia DsbA. W strukturze przestrzennej EcDsbB wyróżniono cztery helisy transmembranowe (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne P1 i P2, w obrębie których występują dwie aktywne pary cystein: Cys41-Cys44 w pętli P1 oraz Cys104-Cys130 w pętli P2 [23]. Reakcja ponownego utlenienia białka EcDsbA przez białko EcDsbB rozpoczyna się od nukleofilowego ataku Cys30 motywu katalitycznego białka DsbA na disiarczek Cys104-Cys130 białka DsbB. Skutkuje to powstaniem przejściowego mostka disiarczkowego pomiędzy Cys30 (EcDsbA) a Cys104 (EcDsbB) i przeniesieniem wiązania na EcDsbA. Powstałe grupy tiolowe Cys104 i Cys130 EcDsbB są ponownie utleniane przez parę reszt cysteinowych pętli pierwszej (Cys41-44), a elektrony są przekazywane na chinon, a następnie na tlen (warunki tlenowe) lub fumaran/azotan (warunki beztlenowe) [24].

## 2.2. Białka szlaku izomeryzacji-redukcji

Białko DsbA skutecznie i szybko katalizuje reakcje powstawania wiązań disiarczkowych pomiędzy cysteinami białka transportowanego do peryplazmy. Utlenianie reszt cysteinowych zachodzi w sposób zgodny z ich kolejnością w łańcuchu aminokwasowym. Białka, które wymagają wprowadzania wiązań disiarczkowych pomiędzy niesąsiedującymi resztami cysteinowymi, w takiej sytuacji nabywają złą konformację. Są one degradowane przez proteazy peryplazmatyczne albo izomeryzowane z powrotem do prawidłowego utlenionego stanu, przez izomerazę disiarczkową EcDsbC [43, 44]. EcDsbC (23 kDa) jest homodimerem o V-kształtnej strukturze. Każdy monomer złożony jest z dwóch domen: C-koniec zawiera domenę TRX z motywem CXXC (Cys98 i Cys101), o właściwościach katalitycznych, natomiast N-koniec domenę dimeryzacyjną [45]. Aktywną formą EcDsbC jest jego forma zredukowana. Proces dimeryzacji białka DsbC jest kluczowy w jego

aktywności, zapobiega bowiem jego utlenianiu przez EcDsbB [2]. EcDsbC jest utrzymywane w zredukowanej formie przez aktywność błonowego EcDsbD, transportującego w wieloetapowym procesie elektrony z cytoplazmy. EcDsbD, zawierające w sekwencji aminokwasowej sześć reszt cysteinowych, składa się z ośmiu transbłonowych segmentów (domena  $\beta$ ) i dwóch domen peryplazmatycznych (N- i C-koniec białka, nazywane odpowiednio  $\alpha$  i  $\gamma$  domenami). Cysteiny EcDsbD są niezbędne do transportu elektronów z cytoplazmatycznej tioredoksyny, poprzez domeny  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\alpha$  EcDsbD do peryplazmatycznych tiolowych oksydoreduktaz [11, 31]. Poza EcDsbC, substratami EcDsbD są EcDsbG oraz EcCcmG. EcDsbG (26 kDa) to dimeryczna peryplazmatyczna tiolowa oksydoreduktaza o strukturze podobnej do EcDsbC lecz odmiennej funkcji. Jej aktywność redukująca chroni białka posiadające pojedyncze cysteiny przed utlenieniem do kwasu sulfonowego [14, 21]. EcCcmG (cytochrome c maturation system) jest błonowym białkiem biorącym udział w procesie biogenezy cytochromu c [52].

## 3. Klasyfikacja monomerycznych białek DsbA

Przez ostatnie trzy dekady opisano wiele białek rodziny DsbA, obecnych w proteomach różnych gatunków bakterii, przedstawicieli typów Proteobacteria, Firmicutes czy Actinobacteria. Struktury rozwiązano dla ponad dwudziestu. Wszystkie białka homologi DsbA, pomimo często niskiej identyczności sekwencji aminokwasowej, posiadają podobną architekturę – domenę tioredoksynową z wbudowaną domeną heliakalną. Badania strukturalne, prowadzone zarówno metodą klasycznej rentgenowskiej krystalografii jak i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR-nuclear magnetic resonance), w połączeniu z analizami cech biochemicznych i biofizycznych białek umożliwiły podział tej rodziny na dwie klasy: klasa DsbA-I z podziałem na DsbA-Ia i DsbA-Ib oraz klasa DsbA-II. Prawdopodobnie, po poznaniu struktur większej liczby białek, w klasie II również będzie konieczne wyróżnienie kilku podklas [47]. Podział białek DsbA w oparciu o analizy filogenetyczne pokrywa się z podziałem bazującym na analizach strukturalnych [59]. W tych badaniach wyróżniono trzy klady. Pierwszy z nich grupuje białka Dsb blisko spokrewnione z EcDsbA z komórek Gammaproteobacteria, takich jak np. *Klebsiella pneumoniae* (KpDsbA), *Shigella flexnerii* (SfDsbA), *Salmonella enterica* (SeDsbA i SeSgrA) czy *Proteus mirabilis* (PmDsbA) i odpowiada poprzednio opisaną grupie DsbA-Ia [35, 36, 60, 66]. Białka o wysokiej (około 80%) identyczności sekwencji aminokwasowej do EcDsbA (z wyjątkiem PmDsbA – 59% identyczności) należące do tej grupy, posiadają podobnie jak EcDsbA długi

hydrofobowy rowek otaczający motyw aktywny, który jest identyczny jak ten w EcDsbA (CPHC oraz cis-prolina poprzedzona walina).

Do kładu pierwszego zaliczane są też białko DsbA z *Vibrio cholerae* (VcDsbA – 40% identyczności sekwencji aminokwasowej z EcDsbA) oraz białka DsbL (dodatkowe białka DsbA występujące w niektórych szczepach *E. coli* czy *S. enterica*). Motyw aktywny oraz potencjał redoks VcDsbA są zbliżone do wartości charakterystycznych dla EcDsbA ale jego struktura posiada cechy charakterystyczne dla grupy DsbA – Ib (patrz niżej) [63]. W wypadku białek DsbL zarówno ich właściwości (potencjał redoks, specyficzność substratowa) jak i architektura (skrócony hydrofobowy rowek oraz ładunek powierzchniowy) odbiegają od cech EcDsbA [18, 22].

Przedstawicielami kładu drugiego (uprzednio nazwany DsbA-Ib) są białka DsbA Gamma- oraz Betaproteobakteria np. *Pseudomonas aeruginosa* PaDsbA1, *Neisseria meningitidis* NmDsbA1 i NmDsbA3 czy *Burkholderia pseudomallei* BpDsbA [26, 38, 46, 61, 62]. Ta grupa nie jest tak homogenna jak wyżej opisana i pod różnymi aspektami odbiega od prototypowego białka EcDsbA. Identyczność sekwencji aminokwasowej do EcDsbA dla przedstawicieli tej grupy waha się w przedziale 20–30%. Różnice dotyczą między innymi cech motywu katalitycznego. Spotykany jest motyw CPHC sparowany z Val-cisPro jak i inne motywy np. NmDsbA3 posiada motyw CVHC połączony z Thr-cisPro. Różnice strukturalne dotyczą długości hydrofobowego rowka, ładunku powierzchniowego oraz motywu katalitycznego.

Trzeci kład tworzą homologi EcDsbA należące do różnych grup taksonomicznych, które znacząco odbiegają od prototypowego EcDsbA, zarówno pod względem identyczności sekwencji aminokwasowej jak i struktury przestrzennej. Do najdokładniej scharakteryzowanych należą DsbA przedstawicieli *Actinobacteria* (MtDsbA z *Mycobacterium tuberculosis*, CdMdbA z *Corynebacterium diphtheriae*), Gram-dodatnich Firmicutes (BsBdbD z *Bacillus subtilis* czy SaDsbA z *Staphylococcus aureus*) a także *Proteobacteria* zarówno Alphaproteobacteria (WpDsbA z *Wolbachia pipientis*) jak i Gammaproteobacteria (PaDsbA2 z *Pseudomonas aeruginosa*). Do tego kładu zaliczane jest także białko DsbA *Chlamydia trachomatis* (CtDsbA), Gram-ujemnego mikroorganizmu należącego do klasy *Chlamydia* [1, 10, 12, 37, 59]. Główna różnica strukturalna pomiędzy klasą DsbA-I i DsbA-II dotyczy ułożenia harmonijki  $\beta 1$ . Dodatkowo w sekwencji aminokwasowej białka grupy DsbA-II zawierają drugą parę reszt cysteinowych powiązanych mostkiem, która nie pełni funkcji katalitycznej choć może odgrywać rolę w procesach regulacyjnych, co udokumentowano w odniesieniu do WpDsbA [37]. Białka tej grupy różnią ich motywy katalityczne [3].

### 3.1. Fizyczno-chemiczne właściwości różnych grup DsbA

Jedną z istotnych cech białek Dsb odzwierciedlających rodzaj i siłę ich aktywności jest potencjał redoks oraz  $pK_a$  N-końcowej cysteiny motywu CXXC. Generalnie pod kątem potencjału redoks można je podzielić na trzy grupy; te o wysokim potencjale (około – 100 mV i powyżej), te o pośrednim potencjale (około – 200 mV) oraz białka o niskim potencjale (poniżej – 200 mV). Niski potencjał jest charakterystyczny dla cytoplazmatycznych tioredoksyn o aktywności redukującej, pośredni dla białek o aktywności izomeryzacyjnej, odpowiedzialnych za przebudowę żele wprowadzonych mostków. Wysoki potencjał redoks charakteryzuje pozacytoplazmatyczne białka Dsb o aktywności oksydacyjnej, a więc białka z rodziny DsbA. Potencjał redoks EcDsbA wynosi – 122 mV [44]. Zbliżoną wartość wykazują białka DsbA z grupy Ia (od – 154 mV do – 116 mV). Białka z grupy Ib mają zdecydowanie wyższy potencjał (od – 80 mV do – 94 mV) a te z grupy II są pod względem ich potencjałów redoks grupą wysoce niejednorodną, np. wartość potencjału redoks PaDsbA2 to –67 mV a CtDsbA to –229 mV [3]. Wartość  $pK_a$  cysteiny pozwala określić w jakim pH cysteina występuje w równowadze w formie uprotonowanej (SH) i w formie anionu tiolowego (S<sup>-</sup>). Standardowe  $pK_a$  dla wolnej cysteiny wynosi 8,3/8,6. Wartość  $pK_a$  wyeksponowanych na powierzchni białek DsbA N-końcowych cystein motywu CXXC jest dużo niższa niż ta dla wolnej cysteiny i waha się od około 3,0 do 5,0. Występuje korelacja pomiędzy wartością  $pK_a$  a potencjałem redukcyjnym białka Dsb – im niższa wartość  $pK_a$  N-terminalnej cysteiny motywu CXXC tym wyższy potencjał redukcyjny (wartość  $pK_a$  dla cytoplazmatycznych tioredoksyn wynosi około 7) [53].

Testy biochemiczne określające poziom aktywności oksydacyjnej białek DsbA to test redukcji insuliny, testy utleniania białek zawierających mostki disiarczkowe (RNaza, hirudyna) czy zdolność do utleniania syntetycznego charakteryzującego się fluorescencją peptydu. W tych testach białka przedstawiciele należące do grupy DsbA-Ia (głównie SeDsbA i KpDsbA) wykazują właściwości prawie identyczne jak EcDsbA [8, 36, 59]. Właściwości innych DsbA, nawet tych z grupy DsbA-Ib odbiegają od cech charakterystycznych dla EcDsbA co jest efektem, czasami nawet niewielkich, zmian strukturalnych.

### 4. Oddziaływanie DsbA z dwiema grupami partnerów – partnerami redoks i substratami

Różnice struktury, często nawet niewielkie mają wpływ na rodzaj i liczbę substratów białek DsbA. Te tiolowe oksydoreduktazy oddziałują z dwoma rodzajami

substratów: w stanie utlenionym z białkami do których wprowadzane są mostki pomiędzy grupami – SH reszt cysteinowych, w stanie zredukowanym z jednym substratem – białkami homologami EcDsbB, co prowadzi do reutlenia DsbA.

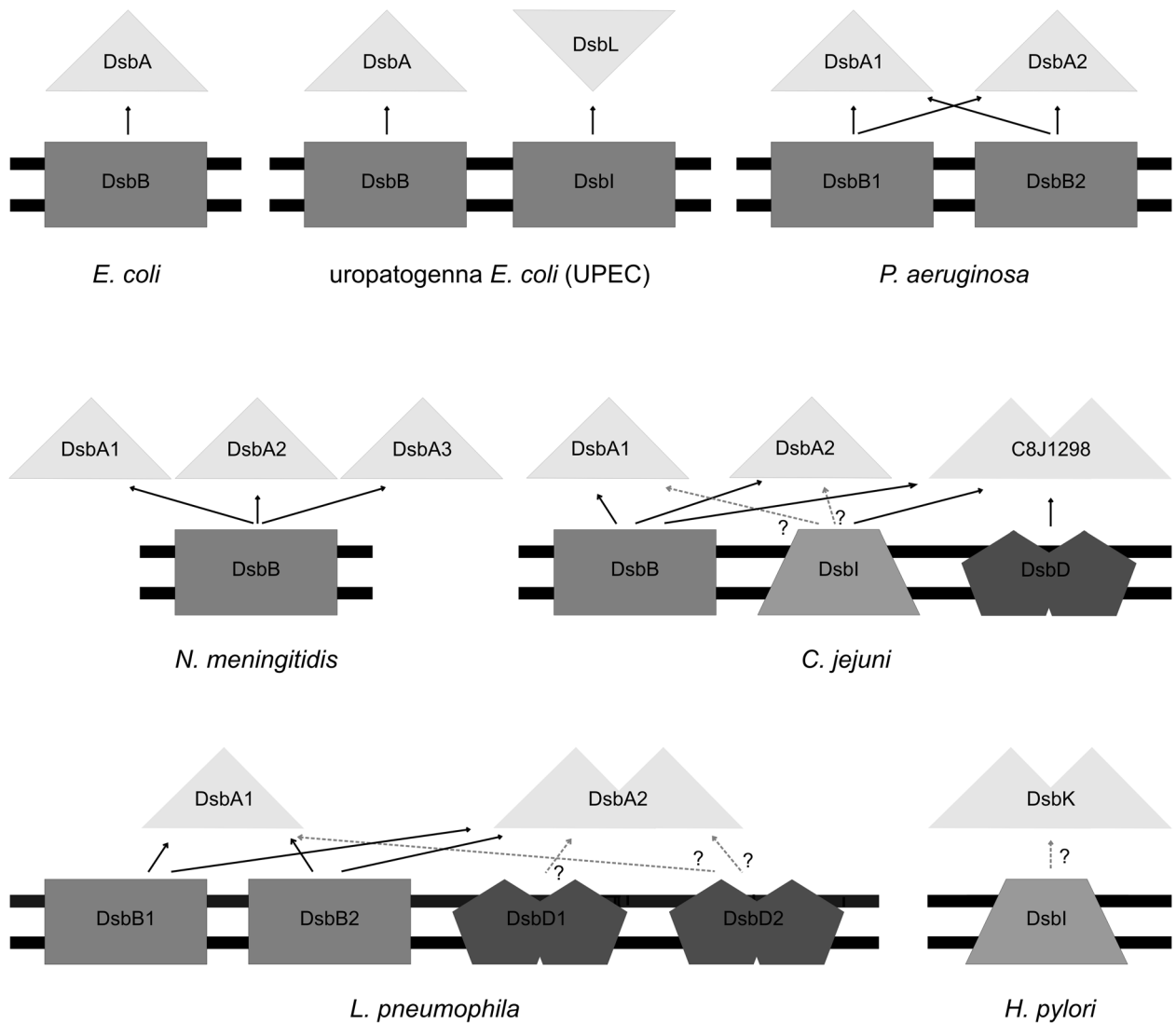
#### 4.1. Oddziaływanie z partnerami redoks

Rozwiązanie struktury kompleksu EcDsbA z EcDsbB doprowadziło do określenia sekwencji aminokwasowej krótkiego peptydu (<sup>96</sup>PSPFATCDFM<sup>106</sup>) z drugiej peryplazmatycznej pętli EcDsbB oddziałującego z EcDsbA w procesie transferu elektronów [25, 35, 68]. Ta sekwencja aminokwasowa jest identyczna lub prawie identyczna w białkach DsbB będących partnerami redoks DsbA z grupy Ia. Zgodnie z tym DsbA Ia oddziałują w testach *in vitro* z EcDsbB a *in vivo* komplementują brak EcDsbA w sposób zależny od EcDsbB [35, 36]. Sekwencje aminokwasowe peptydów białek DsbB biorących udział w reutlenianiu DsbA z grup Ib i II różnią się znacząco, zarówno między sobą jak i w porównaniu do EcDsbB. Tylko nieliczni przedstawiciele grupy Ib (NmDsbA1, PaDsbA1) wykazują zdolność do częściowej komplementacji braku EcDsbA (test ruchliwości) a białka DsbA z grupy II najbardziej strukturalnie odbiegające od EcDsbA nie są też funkcjonalnymi odpowiednikami EcDsbA. Ciekawe są interakcje pomiędzy białkami DsbA i DsbB w komórkach bakterii posiadających więcej niż jedno białko DsbA, które przeważnie należą do różnych grup strukturalnych. Genom *Pseudomonas aeruginosa* koduje dwa białka DsbA (PaDsbA1 i PaDsbA2) o różnej funkcji/specyficzności substratowej i strukturze oraz dwa białka DsbB (PaDsbB1 i PaDsbB2). PaDsbA1 odpowiedzialne za wprowadzanie mostków disiarczkowych do wielu czynników wirulencji jest zaliczane do grupy Ib. PaDsbA2 produkowane prawdopodobnie tylko w specyficznych warunkach posiada odmienną strukturę, jest przedstawicielem grupy II. Obydwa PaDsbA są reutleniane zarówno przez PaDsbB1 jak i PaDsbB2, dopiero brak obu PaDsbB wpływa na stan redoks DsbA1 i zakłóca jego funkcjonowanie. Przyczyna obecności dwóch białek o nakładających się funkcjach nie jest wyjaśniona. Wyznaczona *in silico* sekwencja aminokwasowa otaczająca resztę cysteinową drugiej pętli peryplazmatycznej jest identyczna w obu PaDsbB (AQGMGSKM) i znacząco różna od tej obecnej w EcDsbB, chociaż oba PaDsbB komplementują brak EcDsbB w teście ruchliwości [1]. W komórkach uropatogennych szczepów *Escherichia coli* oraz niektórych szczepach *Salmonella enterica* poza główną parą EcDsbA/EcDsbB czy SeDsbA/SeDsbB funkcjonuje druga para tiolowych oksydaz DsbL/DsbI o wysokiej specyficzności substratowej. Oba białka DsbL (EcDsbL i SeDsbL) o wysokiej identyczności sekwencji aminokwasowej (93%)

charakteryzują się wysokim podobieństwem struktur lecz znacząco różnią się od EcDsbA zarówno strukturalnie jak i funkcjonalnie. Białka DsbL są reutleniane przez tworzące z nimi parę redoks białka, homologi EcDsbB, nazwane DsbI, o odmiennej od EcDsbB sekwencji aminokwasowej peptydu wchodzącego w interakcje z partnerem generującym wiązania disiarczkowe. Sekwencja aminokwasowa tego peptydu to LFGVQGCST (analiza *in silico*) [3]. W komórkach *N. meningitidis* funkcjonują trzy białka DsbA: NmDsbA1, NmDsbA2 i NmDsbA3. Dwa z nich (NmDsbA1 i NmDsbA2) są lipoproteinami a jedno (NmDsbA3) jest białkiem peryplazmatycznym. Pomimo istniejących między nimi różnic strukturalnych wszystkie współpracują z jednym białkiem DsbB, które jest też zdolne *in vitro* do reutlenia EcDsbA. Sekwencja aminokwasowa jego aktywnego peptydu (TAPSCGAP) jest odmienna od tej wyznaczonej dla EcDsbB [38, 61, 62]. Procesy reutlenia dimerycznych tiolowych oksydoreduktaz generujących mostki disiarczkowe (patrz niżej) jak dotąd pozostają niewyjaśnione. DsbK (HP0231) *H. pylori* jest obecne w komórce typu dzikiego w stanie utlenionym a na jego stan redoks tylko w nieznacznym stopniu wpływa brak białka DsbI (nietypowy homolog EcDsbB) [8]. W komórkach *E. coli* HP0231 komplementuje brak EcDsbA w kilku testach (wrażliwość na DTT, ruchliwość i aktywność alkalicznej fosfatazy) w sposób niezależny od EcDsbB [55]. Dane te dokumentują aktywność HP0231 jako oksydazy, reutlenienie tego białka po przekazaniu mostka na odpowiedni substrat prawdopodobnie umożliwia jego dimeryczną strukturę. Mechanizmy regulujące aktywność dwufunkcyjnych dimerycznych tiolowych oksydoreduktaz *L. pneumophilla* i *C. jejuni* (odpowiednio LpDsbA2 i C8J\_1298) również nie zostały poznane. Rycina 2 przedstawia przykłady oddziaływań pomiędzy białkami DsbA i DsbB u różnych gatunków bakterii, natomiast rycina 3 topologię wybranych białek DsbB z zaznaczonymi aminokwasami istotnymi dla interakcji z DsbA.

#### 4.2. Oddziaływanie z substratami

Różnice strukturalne pomiędzy białkami DsbA mają wpływ na rodzaj i liczbę ich substratów – białek do których wprowadzane są mostki disiarczkowe. Ponieważ kompleksy tworzone przez DsbA z substratami są nietrwałe, odpowiednie substraty identyfikowane są poprzez porównywanie subproteomów peryplazmatycznych szczepów dzikich z subproteomami mutantów w genach *dsbA* lub z zastosowaniem odpowiednich mutantów punktowych opóźniających lub uniemożliwiających rozwiązanie kompleksów [6, 27]. Zidentyfikowano dużą liczbę substratów białek DsbA, często istotnych czynników wirulencji [6, 40]. Niektóre białka DsbA jak np. EcDsbL charakteryzują się bardzo wysoką

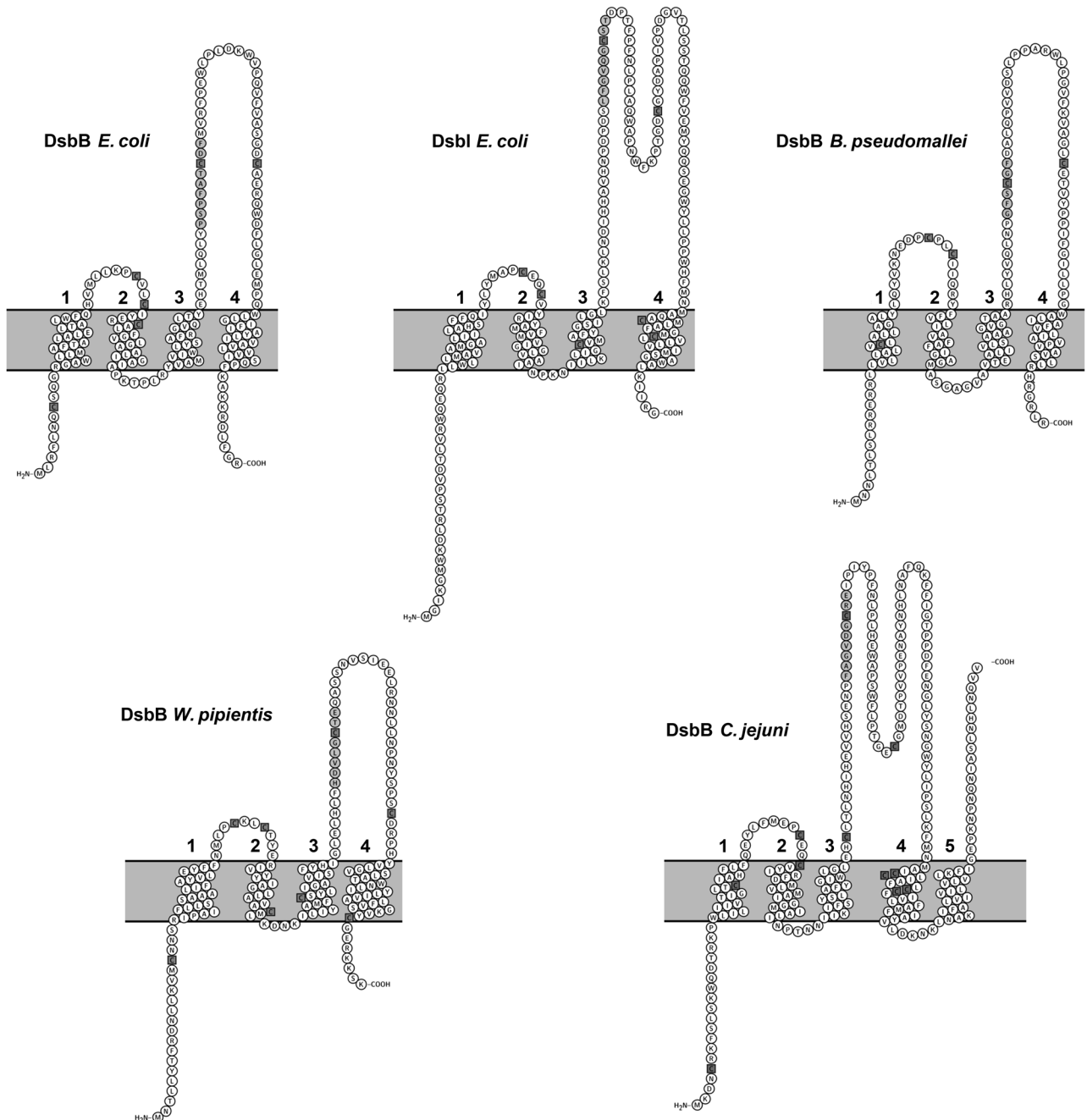


Ryc. 2. Oddziaływania pomiędzy białkami DsbA i DsbB

Przykłady dotyczące wybranych gatunków bakterii Gram-ujemnych. Za wprowadzanie mostków disiarczkowych w komórkach *Escherichia coli* K12 odpowiedzialne jest monomeryczne białko DsbA oraz reutleniające je błonowe białko DsbB; w komórkach uropatogennych szczepów *E. coli* (UPEC) funkcjonuje dodatkowa para białek DsbL-DsbI. *Pseudomonas aeruginosa* koduje dwa białka DsbA (DsbA1, DsbA2) oraz dwa błonowe DsbB (DsbB1, DsbB2). W komórkach *Neisseria meningitidis* kodowane są trzy białka DsbA (DsbA1, DsbA2, DsbA3) oraz tylko jedno białko DsbB. Dwa białka DsbA (DsbA1, DsbA2) oraz dwa błonowe białka DsbB i DsbI kodowane są w genomie *Campylobacter jejuni* 81116. DsbI kodowane w genomie *C. jejuni* 81116 oraz w genomie UPEC to dwa różne białka [49]. Oprócz monomerycznych białek DsbA1/2 we wprowadzanie mostków disiarczkowych zaangażowana jest także dimeryczna oksydoreduktaza C8J\_1298, która oddziałuje zarówno z białkami DsbB, DsbI jak i białkiem szlaku izomeryzacji redukcji – DsbD. W komórkach *Legionella pneumophila* kodowane są monomeryczne DsbA1, dimeryczne DsbA2 a także dwa DsbB (DsbB1, DsbB2) oraz dwa DsbD (DsbD1, DsbD2). *Helicobacter pylori* nie koduje w genomie klasycznej pary białek DsbA-DsbB, za wprowadzanie mostków disiarczkowych odpowiedzialna jest dimeryczna oksydaza DsbK, kodowane jest również DsbI – homolog CjDsbI. Oddziaływania pomiędzy białkami zostały na rysunku przedstawione w postaci strzałek; przerywaną szarą linią zaznaczono potencjalne oddziaływania, które nie zostały udowodnione w eksperymentach *in vivo* *in vitro*.

specyficznością substratową, podczas gdy inne reagują z wieloma substratami. W komórkach niektórych mikroorganizmów np. *N. meningitidis* czy *S. enterica* funkcjonuje zwiokrotniona liczba białek DsbA, które posiadają zarówno nakładające się, jak i odmienne substraty. Jak dotąd pozostają niewyjaśnione dokładnie oddziaływania utlenionych DsbA z ich substratami. Być może mechanizm tych oddziaływań nie jest identyczny dla wszystkich białek DsbA. Analiza pierwszorzędkowych sekwencji aminokwasowych, otaczających reszty cysteinowe pomiędzy którymi wytwarzane są

mostki disiarczkowe, kilkudziesięciu białek nie wykazała istnienia pomiędzy nimi istotnych podobieństw. Analiza właściwości mutantów punktowych oraz fakt, że mutanty o zamienionej prolinie na treoninę w pętli cisPro (L2) sugerują, że ta pętla pełni kluczową rolę w wiązaniu substratów przez utlenioną formę EcDsbA. Rozwiązanie struktury kompleksu EcDsbA z peptydem białka SigA *S. flexnerii*, zawierającym reszty cysteinowe pomiędzy którymi wytwarzany jest mostek, wskazało, że peptyd nie wiąże się do regionu hydrofobowego rowka, który jest miejscem oddziaływania z EcDsbB.



Ryc. 3. Topologia DsbB w błonie

Porównanie białek DsbB oddziałujących z białkami DsbA, zaliczonymi do różnych klas – por. rozdział 3 (*Escherichia coli* – klasa Ia; *Burkholderia pseudomallei* – klasa Ib; *Wolbachia pipientis* – klasa II; *Campylobacter jejuni* – ?). Przewidywania topologii białek DsbB w błonie wykonano z wykorzystaniem programu Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/#>) [48]. Reszty cysteinowe w obrębie białek zostały zaznaczone kolorem ciemnoszarym. Sekwencje aminokwasowe wytypowane jako motywy biorące udział w oddziaływaniu z białkiem DsbA zaznaczono kolorem jasnoszarym.

Tak więc można postawić hipotezę że hydrofobowy rowek determinuje oddziaływanie DsbA z partnerem redoks a nie z substratami [50].

## 5. Dimeryczne białka o aktywności oksydacyjnej

W komórkach niektórych gatunków mikroorganizmów funkcjonują dimeryczne tiolowe oksydoreduktazy, o strukturach zbliżonych do EcDsbC lub EcDsbG, ale

odgrywające role w generowaniu mostków disiarczkowych. Niektóre z nich są enzymami dwufunkcyjnymi, funkcjonują zarówno jako oksydazy reszt cysteinowych jak i izomerazy, często zależnie od tła genetycznego. W świecie mikroorganizmów spotykamy gatunki gdzie tego typu oksydazy funkcjonują razem z typowymi monomerycznymi DsbA (np. rodzaj *Campylobacter* czy *Legionella pneumophila*) oraz gatunki w komórkach których są one jedynymi enzymami utleniającymi reszty cysteinowe (np. *Helicobacter pylori*).

*Campylobacter* i *Helicobacter* to przedstawiciele klasy *Epsilonproteobacteria*, mikroorganizmy będące ludzkimi patogenami. Infekcja *Campylobacter jejuni* skutkuje stanami zapalnymi jelit. *Helicobacter pylori* jest czynnikiem etiologicznym poważnych objawów chorobowych górnego odcinka przewodu pokarmowego takich jak – stan zapalny błony śluzowej żołądka, choroba wrzodowa żołądka/dwunastnicy czy choroba nowotworowa. Rodzaj symptomów chorobowych jest zależny od genotypu szczepu patogenu, genotypu gospodarza oraz czynników środowiskowych.

W proteomie *H. pylori* nie stwierdzono ani obecności białek DsbA/DsbB ani DsbC/DsbD. Zidentyfikowano 149 białek zawierających motyw CXXC, ale tylko cztery z nich posiadają charakterystyczny zwój tioredoksynowy, a więc należą do klasy tiolowych oksydoreduktaz. Dwa z nich to cytoplazmatyczne tioredoksyny a dwa (HP0231 i HP0377) to białka pozacytoplazmatyczne. [30]. Ich struktura została rozwiązana [64, 65]. HP0377 jest nietypowym białkiem CcmG (*cytochrome c maturation*), które poza zdolnością do redukcji apocytochromu c, w testach *in vitro* wykazuje aktywność izomeryzacyjną. HP0377 utrzymywane jest w stanie zredukowanym przez błonowe białko HP0265 – CcdA, będące skróconą wersją klasycznego DsbD [54]. HP0231 to dimeryczna oksydoreduktaza odpowiedzialna za generowanie mostków disiarczkowych i wpływająca na wiele aspektów procesu wirulencji. W proteomie *H. pylori* obecne jest dodatkowo białko HP0595 (DsbI) – nietypowy homolog EcDsbB – o dokładnie nieokreślonej funkcji.

HP0231 (DsbK) o strukturze zbliżonej, ale nie identycznej jak EcDsbG, posiada domenę katalityczną charakterystyczną dla klasy DsbA-II, z motywem aktywnym identycznym jak EcDsbA (CPHC sparowany z VcP). Obecność domeny dimeryzacyjnej warunkuje aktywność enzymu w komórkach naturalnego gospodarza. Eksperymenty mutagenyzy specyficznej co do miejsca analizujące aminokwasy centrum katalitycznego wykazały, że zamiana waliny na treoninę w tzw. pętli prolinowej (VcP na TcP) całkowicie znosi aktywność białka [7, 9, 41, 55]. Proces reutlenia HP0231 nadal jest niejasny. System Dsb ma istotny wpływ na procesy wirulencji *H. pylori*. Brak białka HP0595 w znaczący sposób obniża poziom kolonizacji błony śluzowej żołądka myszy [16]. Szczep *H. pylori* zmutowany w genie *hp0231* charakteryzuje się obniżonym poziomem translokacji do komórek eukariotycznych białka CagA, głównej determinanty procesu nowotworzenia [67]. Celem działania HP0231 jest między innym białko błony zewnętrznej HopQ zawierające trzy mostki disiarczkowe. HopQ jest adhezyną *H. pylori* rozpoznająca na powierzchni komórek eukariotycznych cząsteczki CEACAM (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) [29, 32]. Brak HopQ lub jego zmieniona struktura w znaczący sposób

hamuje proces translokacji CagA oraz indukcję szlaków przekazywania sygnałów [19].

WHO zaklasyfikowało *H. pylori* jako jeden z 12 ludzkich patogenów przeciwko któremu niezbędne jest szybkie opracowanie nowych leków. HP0231 ze względu na istotny wpływ na proces wirulencji, nietypową strukturę oraz peryplazmatyczną lokalizację spełnia wymagania stawiane celom terapii antybakteryjnych. Potencjalne inhibitory HP0231 nie powinny hamować aktywności białek Dsb innych gatunków bakterii wchodzących w skład ludzkiej mikrobioty jak i nie powinny mieć wpływu na funkcjonowanie systemu wprowadzania mostków disiarczkowych funkcjonujących w komórkach eukariotycznych. Badania dotyczące wykorzystania białek systemu Dsb *E. coli* jako celów terapeutycznych są prowadzone w kilku światowych laboratoriach [15, 39, 58].

Szlak oksydacyjny Dsb *C. jejuni* jest bardziej złożony niż ten obecny w komórkach modelowej bakterii *E. coli* K-12. W zależności od szczepu, wyróżnia się w nim trzy lub cztery enzymy. Dwa z nich (DsbB i DsbI) zlokalizowane są w błonie wewnętrznej, jeden lub dwa w peryplazmie (DsbA1 i DsbA2). Dodatkowo analizy *in silico* wytypowały dwa homologii białek *E. coli* szlaku izomeryzacyjnego: C8J\_1298 i C8J\_0565 – podane numery dotyczą genomu szczepu *C. jejuni* 81116 (odpowiednio homologii EcDsbC i EcDsbD). Oksydoreduktazy CjDsbA1 i CjDsbA2 posiadają klasyczne sekwencje sygnałowe, które zapewniają ich transport przez błonę cytoplazmatyczną do peryplazmy. Identyfikacja sekwencji aminokwasowych pomiędzy CjDsbA1 i CjDsbA2 wynosi 47%. Białka te, wykazują odpowiednio 24% i 28% identyczności sekwencji aminokwasowych z EcDsbA oraz 28,5% i 39% z EcDsbL. Różnice pomiędzy nimi jak i między DsbA *C. jejuni* a DsbA *E. coli* dotyczą centrów aktywnych oraz struktur tych oksydoreduktaz. Reszta izoleucyny w aktywnym motywie CIHC CjDsbA1 zastąpiona jest resztą treoninową (CTHC) CjDsbA2. Zatem te motywy, są różne od motywu EcDsbA (CPHC) i EcDsbL (CPFC). W obydwu CjDsbA pętla cis-Pro, poprzedzona jest resztą treoniny (tworzącej motyw TcP), w przeciwieństwie do reszty waliny (motyw VcP) obecnej w EcDsbA i EcDsbL. Modelowanie strukturalne wskazuje, że oba CjDsbA1 i CjDsbA2 są zbliżone bardziej do EcDsbL, niż do EcDsbA, choć istnieją istotne różnice strukturalne między nimi. Odpowiednikiem EcDsbL jest raczej CjDsbA2. Różnice strukturalne pomiędzy oksydoreduktazami CjDsbA wpływają na cechy fenotypowe bakterii warunkowane aktywnością tych enzymów. Substratem CjDsbA1 jest fosfataza alkaliczna CjPhoX, a aktywność CjDsbA2 kluczowa jest dla aktywności sulfotransferazy arylosulfatu CjAstA. Różnice strukturalne pomiędzy CjDsbA1 a CjDsbA2 widoczne są także w ich aktywności w komórkach *E. coli*. CjDsbA1, w przeciwieństwie



do CjDsbA2, komplementuje brak EcDsbA w sposób zależny od EcDsbB. Obie tiolowe oksydoreduktazy są reutleniające przez ten sam błonowy enzym CjDsbB [17]. Rola CjDsbI nie jest wyjaśniona. Udowodniono, że CjDsbI nie oddziałuje ani z CjDsbA1 ani z CjDsbA2, ale odgrywa rolę w obronie komórek przed stresem oksydacyjnym, działa zatem raczej w szlaku redukcyjnym [4, 51]. Nietypowym białkiem Dsb bakterii rodzaju *Campylobacter* jest produkt genu *c8j\_1298* (numeracja ze szczepu 81116). Początkowo, na podstawie analiz *in silico* został on zaklasyfikowany jako izomeraza Dsb, homolog EcDsbC. Rzeczywiście C8J\_1298 jest homodimerem wykazującym w testach *in vitro* cechy zbliżone do EcDsbC. Jednak w komórkach występuje nietypowo zarówno w formie utlenionej jak i zredukowanej, a funkcja tego białka jest uzależniona od tła genetycznego. W komórkach typu dzikiego pełni prawdopodobnie rolę EcDsbG, a przy braku CjDsbA1 jest tiolową oksydoreduktazą o aktywności utleniającej. Filogenetycznie białko C8J\_1298 jest spokrewnione bliżej z dimeryczną oksydoreduktazą *H. pylori* (HP0231) niż EcDsbC [4].

Dimeryczna dwufunkcyjna tiolowa oksydoreduktaza występuje też w komórkach *Legionella pneumophila*, patogenu górnych dróg oddechowych, czynnika etiologicznego tzw. choroby legionistów. System Dsb tego mikroorganizmu jest wyjątkowo skomplikowany. W genomie *L. pneumophila* zidentyfikowano dwa geny kodujące oksydoreduktazy tiolowe, oznaczone LpDsbA1 i LpDsbA2, dwa geny kodujące białka homologii EcDsbB oraz dwa geny kodujące homologii EcDsbD. Monomeryczne LpDsbA1 komplementuje mutację  $\Delta dsbA$  *E. coli*, a jego brak w komórkach *L. pneumophila* nie skutkuje obserwowalną zmianą fenotypu mutantu. Podobnie jak zaobserwowano w wypadku C8J\_1298, aktywność LpDsbA2 jest zależna od tła genetycznego. LpDsbA2 w komórkach *L. pneumophila* odpowiedzialne jest za utlenianie cystein kilku białek, składników IV systemu sekrecji T4SS a w komórkach *E. coli* funkcjonuje jako izomeraza [28, 33, 34].

## 6. Podsumowanie

Badania nad systemami Dsb w komórkach różnych gatunków bakterii przybliżają nas do wprowadzenia nowych terapii antybakteryjnych. W pierwszej kolejności najbardziej prawdopodobne jest wprowadzenie tych terapii przeciwko patogenom posiadającym białka DsbA zaliczane do klasy DsbA-Ia (m.in. EcDsbA, SeDsbA, KpDsbA). Jednak opracowanie terapii wymaga wcześniejszego poznania systemów Dsb działających w komórkach naszej mikroflory. Dodatkowym wyzwaniem jest zaprojektowanie skutecznych metod dostarczania takich leków. Przeprowadzone dotąd badania pokazują, że do tego etapu jeszcze daleka droga.

## Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki NCN 2018/29/B/NZ1/00140.

## Piśmiennictwo

1. Arts I.S., Collet J.F. i wsp.: Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. **4**, e00912-00913 (2013)
2. Bader M.W., Hiniker A., Regeimbal J., Goldstone D., Haebel P.W., Riemer J., Metcalf P., Bardwell J.C.: Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *EMBO J*. **20**, 1555–1562 (2001)
3. Banas A.M., Bocian-Ostrzycka K.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Engineering of the Dsb (disulfide bond) proteins – contribution towards understanding their mechanism of action and their applications in biotechnology and medicine. *Crit. Rev. Microbiol.* **45**, 433–450 (2019)
4. Banas A.M., Bocian-Ostrzycka K.M., Plichta M., Dunin-Horkawicz S., Ludwiczak J., Placzekiewicz J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: C8J\_1298, a bifunctional thiol oxidoreductase of *Campylobacter jejuni*, affects Dsb (disulfide bond) network functioning. *PLoS One*, **15**, e0230366 (2020)
5. Bardwell J.C., McGovern K., Beckwith J.: Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell*, **67**, 581–589 (1991)
6. Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Banas A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Bacterial thiol oxidoreductases – from basic research to new antibacterial strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3977–3989 (2017)
7. Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Banas A.M., Jastrzab K., Pisarczyk K., Kolarzyk A., Lasica A.M., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Engineering of *Helicobacter pylori* Dimeric Oxidoreductase DsbK (HP0231). *Front. Microbiol.* **7**, 1158 (2016)
8. Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Dziewit L., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Diversity of the *Epsilonproteobacteria* Dsb (disulfide bond) systems. *Front. Microbiol.* **6**, 570 (2015)
9. Bocian-Ostrzycka K.M., Lasica A.M., Dunin-Horkawicz S., Grzeszczuk M.J., Drabik K., Dobosz A.M., Godlewska R., Nowak E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Functional and evolutionary analyses of *Helicobacter pylori* HP0231 (DsbK) protein with strong oxidative and chaperone activity characterized by a highly diverged dimerization domain. *Front. Microbiol.* **6**, 1065 (2015)
10. Christensen S., Groftehaug M.K., Byriel K., Huston W.M., Furlong E., Heras B., Martin J.L., McMahon R.M.: Structural and biochemical characterization of *Chlamydia trachomatis* DsbA reveals a cysteine-rich and weakly oxidising oxidoreductase. *PLoS One*, **11**, e0168485 (2016)
11. Collet J.F., Riemer J., Bader M.W., Bardwell J.C.: Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J. Biol. Chem.* **277**, 26886–26892 (2002)
12. 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)
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. 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)

15. Duprez W., Premkumar L., Halili M.A., Lindahl F., Reid R.C., Fairlie D.P., Martin J.L.: Peptide inhibitors of the *Escherichia coli* DsbA oxidative machinery essential for bacterial virulence. *J. Med. Chem.* **58**, 577–587 (2015)
16. Godlewska R., Dzwonek A., Mikula 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)
17. 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**, e106247 (2014)
18. Grimshaw J.P., Stirnimann C.U., Brozzo M.S., Malojcic G., Grutter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **380**, 667–680 (2008)
19. Grzeszczuk M.J., Bocian-Ostrzycka K.M., Banas A.M., Roszczenko-Jasinska P., Malinowska A., Stralova H., Haas R., Meyer T.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Thioloxydoreductase HP0231 of *Helicobacter pylori* impacts HopQ-dependent CagA translocation. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 977–985 (2018)
20. Guddat L.W., Bardwell J.C., Zander T., Martin J.L.: The uncharged surface features surrounding the active site of *Escherichia coli* DsbA are conserved and are implicated in peptide binding. *Protein Sci.* **6**, 1148–1156 (1997)
21. Heras B., Edeling M.A., Schirra H.J., Raina S., Martin J.L.: Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8876–8881 (2004)
22. 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)
23. Inaba K., Ito K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 520–529 (2008)
24. 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)
25. 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)
26. Ireland P.M., McMahon R.M., Marshall L.E., Halili M., Furlong E., Tay S., Martin J.L., Sarkar-Tyson M.: Disarming *Burkholderia pseudomallei*: structural and functional characterization of a disulfide oxidoreductase (DsbA) required for virulence *in vivo*. *Antioxid. Redox Sign.* **20**, 606–617 (2014)
27. Jagusztyn-Krynicka E. K. Banaś A.M., Grzeszczuk M. J.: Strategie badań tiolowych oksydoreduktaz. *Post. Mikrobiol.* **56**, 326–334 (2017)
28. Jameson-Lee M., Garduno R.A., Hoffman P.S.: DsbA2 (27 kDa Com1-like protein) of *Legionella pneumophila* catalyses extracytoplasmic disulphide-bond formation in proteins including the Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **80**, 835–852 (2011)
29. Javaheri A., Gerhard M. i wsp.: *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat. Microbiol.* **2**, 16189 (2016)
30. 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)
31. Katzen F., Beckwith J.: Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, **103**, 769–779 (2000)
32. Koniger V., Haas R. i wsp.: *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat. Microbiol.* **2**, 16188 (2016)
33. Kpadeh Z.Z., Day S.R., Mills B.W., Hoffman P.S.: *Legionella pneumophila* utilizes a single-player disulfide-bond oxidoreductase system to manage disulfide bond formation and isomerization. *Mol. Microbiol.* **95**, 1054–1069 (2015)
34. 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)
35. 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)
36. Kurth F., Martin, J.L. i wsp.: Comparative sequence, structure and redox analyses of *Klebsiella pneumoniae* DsbA show that anti-virulence target DsbA enzymes fall into distinct classes. *PLoS One*, **8**, e80210 (2013)
37. Kurz M., Iturbe-Ormaetxe I., Jarrott R., Shouldice S.R., Wouters M.A., Frei P., Glockshuber R., O'Neill S.L., Heras B., Martin J.L.: Structural and functional characterization of the oxidoreductase alpha-DsbA1 from *Wolbachia pipientis*. *Antioxid. Redox Sign.* **11**, 1485–1500 (2009)
38. 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)
39. Landeta C., Boyd D. i wsp.: Compounds targeting disulfide bond forming enzyme DsbB of Gram-negative bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 292–298 (2015)
40. Landeta C., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes. *Nat. Microbiol.* **3**, 270–280 (2018)
41. Lester J., Kichler S., Oickle B., Fairweather S., Oberc A., Chahal J., Ratnayake D., Creuzenet C.: Characterization of *Helicobacter pylori* HP0231 (DsbK): role in disulfide bond formation, redox homeostasis and production of *Helicobacter* cysteine-rich protein HcpE. *Mol. Microbiol.* **96**, 110–133 (2015)
42. Lin D., Kim B., Slauch J.M.: DsbL and DsbI contribute to periplasmic disulfide bond formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, **155**, 4014–4024 (2009)
43. Manta B., Boyd D., Berkmen M.: Disulfide bond formation in the periplasm of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, **8**, DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2018 (2019)
44. Martin J.L., Bardwell J.C., Kuriyan J.: Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature*, **365**, 464–468 (1993)
45. McCarthy A.A., Haebel P.W., Torronen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P.: Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 196–199 (2000)
46. McMahon R.M., Coincon M., Tay S., Heras B., Morton C.J., Scanlon M.J., Martin J.L.: Sent packing: protein engineering generates a new crystal form of *Pseudomonas aeruginosa* DsbA1 with increased catalytic surface accessibility. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2386–2395 (2015)
47. 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)

48. Omasits U., Ahrens C.H., Muller S., Wollscheid B.: Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, **30**, 884–886 (2014)
49. Pawlowski M., Lasica 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)
50. Paxman J.J., Scanlon M.J. i wsp.: The structure of the bacterial oxidoreductase enzyme DsbA in complex with a peptide reveals a basis for substrate specificity in the catalytic cycle of DsbA enzymes. *J. Biol. Chem.* **284**, 17835–17845 (2009)
51. Raczko A.M., Bujnicki J.M., Pawlowski M., Godlewska R., Lewandowska M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria. *Microbiology*. **151**, 219–231 (2005)
52. Reid E., Cole J., Eaves D.J.: The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem. J.* **355**, 51–58 (2001)
53. Roos G., Foloppe N., Messens J.: Understanding the pK(a) of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding. *Antioxid. Redox. Signal.* **18**, 94–127 (2013)
54. Roszczenko P., Grzeszczuk M., Kobierecka P., Wywiał E., Urbanowicz P., Wincek P., Nowak E., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* HP0377, a member of the Dsb family, is an untypical multifunctional CcmG that cooperates with dimeric thioldisulfide oxidase HP0231. *BMC Microbiol.* **15**, 135 (2015)
55. Roszczenko P., Radomska K.A., Wywiał E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: A novel insight into the oxidoreductase activity of *Helicobacter pylori* HP0231 protein. *PLoS One*, **7**, e46563 (2012)
56. Schierle C.F., Berkmen M., Huber D., Kumamoto C., Boyd D., Beckwith J.: The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway. *J. Bacteriol.* **185**, 5706–5713 (2003)
57. Shouldice S.R., Heras B., Walden P.M., Totsika M., Schembri M.A., Martin J.L.: Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**, 1729–1760 (2011)
58. Smith R.P., Paxman J.J., Scanlon M.J., Heras B.: Targeting Bacterial Dsb Proteins for the Development of Anti-Virulence Agents. *Molecules*, **21**, DOI: 10.3390/molecules21070811 (2016)
59. Totsika M., Vagenas D., Paxman J.J., Wang G., Dhoub R., Sharma P., Martin J.L., Scanlon M.J., Heras B.: Inhibition of Diverse DsbA Enzymes in Multi-DsbA Encoding Pathogens. *Antioxid. Redox. Signal.* **29**, 653–666 (2018)
60. Turcot I., Ponnampalam T.V., Bouwman C.W., Martin N.L.: Isolation and characterization of a chromosomally encoded disulphide oxidoreductase from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Can. J. Microbiol.* **47**, 711–721 (2001)
61. 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)
62. 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)
63. Walden P.M., Heras B., Chen K.E., Halili M.A., Rimmer K., Sharma P., Scanlon M.J., Martin J.L.: The 1.2 Å resolution crystal structure of TcpG, the *Vibrio cholerae* DsbA disulfide-forming protein required for pilus and cholera-toxin production. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 1290–1302 (2012)
64. Yoon J.Y., Suh S.W. i wsp.: Structural and functional characterization of HP0377, a thioredoxin-fold protein from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 735–746 (2013)
65. 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)
66. Yu J.: Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **66**, 3909–3917 (1998)
67. Zhong Y., Anderl E., Kruse T., Schindele F., Jagusztyn-Krynicka E.K., Fischer W., Gerhard M., Mejias-Luque R.: *Helicobacter pylori* HP0231 Influences Bacterial Virulence and Is Essential for Gastric Colonization. *PLoS One*, **11**, e0154643 (2016)
68. Zhou Y., Cierpicki T., Jimenez R.H., Lukasik S.M., Ellena J.F., Cafiso D.S., Kadokura H., Beckwith J., Bushweller J.H.: NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation. *Mol. Cell.* **31**, 896–908 (2008)