

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Veronika Klápšťová

Struktura a funkce mitochondriálního sekretinu
Structure and function of mitochondrial secretin

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. 4. 2017

Veronika Klápštová

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, bez jejichž podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Především děkuji svému školiteli Pavlu Doležalovi, za to, že mě přivedl k tomuto zajímavému výzkumnému projektu a neztrácel optimismus, přestože mé výsledky nebyly vždy „super“.

Děkuji členům naší laboratoře za cennou pomoc a rady – Evě, že mě bezpečně provedla laboratorními začátky, Lubošovi za jeho trpělivost s mými četnými dotazy, Markétě, že mě seznámila s naegleriemi, Vladce za mnohá uklidňující slova, Bětce za spolupráci a spolutrápení s importy a všem ostatním za vytváření milého pracovního prostředí.

Děkuji svým rodičům, že mi poskytli zázemí během studia a neustále mě podporovali.

Děkuji také Josefu K., za to, že ochotně naslouchal mým vysvětlením, proč mi experimenty opět neposkytly odpověď na mé otázky.

V neposlední řadě pak děkuji kocouru Lvu Nikolajevičovi za přiložení pomocné tlapky k dílu a vepsání mnoha cenných poznámek jako například: „úplšúúmkj<ll.úúšú))k,mlllllllllllúšúp))klm,,,m, km,llllllllll.“

Omlouvám se všem bakteriím, kvasinkám a naegleriím, které padly za obětí mé touze po poznání.

Abstrakt

Sekreční systém typu II (T2SS) je jedním ze sekrečních systémů, pomocí nichž gramnegativní bakterie transportují některé ze svých proteinů přes vnější membránu. Vlastní přechod přes membránu je zprostředkován pórem tvořeným několika kopiemi proteinu zvaného GspD neboli sekretin. Ten byl objeven spolu se třemi dalšími podjednotkami T2SS v genomu některých prvoků, například u *Naegleria gruberi*, *Andalucia godoyi*, *Reclinomonas americana*, *Neovahlkampfia damariscottae* či u dvou zástupců rodu *Malawimonas*. Bylo zjištěno, že tyto proteiny lokalizují do mitochondrie. Pokud by byla zachována původní funkce i orientace T2SS, jednalo by se o naprosto unikátní systém, neboť export proteinů z mitochondrií doposud nebyl popsán. Sekretin je zcela esenciální podjednotkou T2SS, která neplní pouze roli pasivního membránového kanálu, ale účastní se aktivně i rozpoznávání substrátu. Studium eukaryotického sekretinu by tedy mohlo přinést cenné poznatky o funkci mitochondriálního T2SS. Experimentální část této diplomové práce se proto zaměřuje na charakterizaci eukaryotického GspD, zabývá se skládáním sekretinového kanálu v bakteriích a umělých membránách, popisem jeho interakcí s dalšími podjednotkami a mechanismem importu sekretinového monomeru do mitochondrií.

Klíčová slova

Sekreční systém typu II, mitochondrie, proteinový transport, sekretin, *Naegleria gruberi*, *Malawimonas*, endosymbióza.

Abstract

Type II secretion system (T2SS) is one of the secretion systems found in gram-negative bacteria that provides transport of some bacterial proteins across the outer membrane. The passage through the membrane is mediated by a pore assembled from subunits called GspD or secretin. Together with three other components of T2SS, GspD was discovered in the genome of several protists including *Naegleria gruberi*, *Andalucia godoyi*, *Reclinomonas americana*, *Neovahlkampfia damariscottae* or in several species of genus *Malawimonas*. Previously it was found out that these proteins localize into the mitochondria. If found functional and with analogous topology to the bacterial system, the eukaryotic T2SS would represent unique mitochondrial protein export system. Secretin is essential subunit of T2SS which is not only the passive membrane channel, but also participates in the recognition of the substrate. Therefore, the research of the eukaryotic secretin could bring a valuable knowledge about the function of the mitochondrial T2SS. The experimental part of this thesis tries to characterize the eukaryotic secretin and it focuses on (i) the assembly of the secretin channel, in both, the bacteria and in the artificial membranes, (ii) the interactions of GspD with the other subunits of T2SS and (iii) the mechanism of import of the secretin monomer into the mitochondrial outer membrane.

Keywords

Type II secretion system, mitochondria, protein transport, secretin, *Naegleria gruberi*, *Malawimonas*, endosymbiosis.

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled.....	9
2.1	Rodina sekretinů	9
2.2	Systémy využívající sekretin	9
2.2.1	Sekreční systém typu II (T2SS).....	9
2.2.2	Systém pro skládání pilu typu IV	20
2.2.3	Systém pro přirozenou transformaci	22
2.2.4	Sekreční systém typu III	23
2.2.5	Systém pro export filamentárních bakteriofágů.....	24
2.3	Evoluce rodiny sekretinů.....	25
2.4	Import β -barelových proteinů do vnější mitochondriální membrány	26
2.5	T2SS v mitochondriích eukaryot	27
3	Cíle práce.....	29
4	Materiál a metody.....	30
4.1	Bioinformatické metody	30
4.1.1	Alignment proteinových sekvencí.....	30
4.1.2	Fylogenetická analýza proteinové sekvence	30
4.1.3	Predikce struktury proteinu	30
4.2	Kultivace organismů a používaná média.....	30
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	30
4.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.2.3	<i>Naegleria gruberi</i>	33
4.3	Plazmidy	34
4.4	Amplifikace genů.....	34
4.5	Klonování DNA fragmentů	37
4.6	Transformace <i>E. coli</i>	37
4.7	Testování bakterií na přítomnost žádaného plazmidu	37
4.8	SDS-PAGE	38
4.9	Western blot	39
4.10	Detekce PspA odpovědi	40
4.10.1	Příprava kompetentních bakterií PAP105	40
4.10.2	Transformace a kultivace PAP105.....	40
4.10.3	Příprava buněčného lyzátu na SDS-PAGE.....	41

4.11	Purifikace sekretinu M249 GspD z <i>E. coli</i>	41
4.12	Test toxicity sekretinu	42
4.12.1	Kultivace bakterií BL21 (DE3) pro růstové pokusy	42
4.12.2	Barvení bakterií pro fluorescenční mikroskopii	42
4.12.3	Barvení bakterií pro průtokovou cytometrii	43
4.13	Import proteinu do mitochondrií.....	44
4.13.1	<i>In vitro</i> translace.....	44
4.13.2	Izolace mitochondrií <i>S. cerevisiae</i>	44
4.13.3	Izolace mitochondrií z <i>N. gruberi</i>	46
4.13.4	Import sekretinu do mitochondrií.....	47
4.13.5	Vysoušení a vyvolávání radioaktivně značených gelů.....	48
4.14	Vkládání proteinu do lecitinových lipozómů.....	49
4.14.1	Příprava lecitinových lipozómů	49
4.14.2	<i>In vitro</i> translace v přítomnosti lecitinových lipozómů.....	49
4.14.3	Příprava vzorků na Blue Native PAGE	49
4.14.4	Posttranslační vkládání proteinu do lecitinových lipozómů	50
4.15	Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2HS)	51
5	Výsledky	52
5.1	Bioinformatická analýza GspD	52
5.1.1	Alignments proteinových sekvencí GspD a GspND.....	52
5.1.2	Fylogenetická analýza sekretinu	53
5.1.3	Predikce struktury eukaryotického sekretinu	55
5.2	Detekce PspA odpovědi	58
5.3	Purifikace sekretinu M249 GspD z <i>E. coli</i>	59
5.4	Test toxicity sekretinu	60
5.4.1	Růstové pokusy	60
5.4.2	Fluorescenční mikroskopie.....	62
5.4.3	Průtoková cytometrie	63
5.5	Skládání sekretinu <i>in vitro</i>	66
5.6	Importy sekretinu do mitochondrií.....	67
5.7	Stanovení interakcí Ng GspD pomocí Y2HS.....	69
6	Diskuze	72
6.1	Bioinformatická analýza sekretinů.....	72
6.2	Skládání a vlastnosti eukaryotických sekretinových multimerů	73
6.3	Import sekretinu do mitochondrií.....	75
6.4	Interakce mitochondriálního sekretinu s ostatními podjednotkami T2SS.....	76

7	Závěr.....	78
8	Seznam zkratek	79
9	Použitá literatura.....	81

1 Úvod

Sekretiny jsou proteiny, které vytvářejí β -barelové kanály ve vnější membráně některých gramnegativních bakterií. Umožňují transport proteinů, DNA a fágových partikulí přes tuto membránu a také výstavbu pilu typu IV na povrchu bakterií.

Jedním ze systémů využívajících sekretin je sekreční systém typu II (T2SS), jenž zajišťuje export některých bakteriálních proteinů, například toxinů či enzymů, do vnějšího prostředí. Je složen ze čtyř hlavních částí - komplexu vnější membrány, jehož centrální komponentou je právě sekretin, pseudopilin, sekreční ATPázy a komplexu vnitřní membrány.

Čtyři podjednotky tohoto sekrečního systému byly objeveny v genomech některých jednobuněčných eukaryot. U *Naegleria gruberi*, *Naegleria fowleri*, *Andalucia godoyi*, *Reclinomonas americana*, *Neovahlkampfia damariscottae*, *Malawimonas jakobiformis* a *Malawimonas sp. str. 249* byly nalezeny geny pro sekretin, sekreční ATPázu, pseudopilin a jeden z proteinů komplexu vnitřní membrány. Ukázalo se, že tyto podjednotky jsou lokalizovány v mitochondrii. Je tedy možné, že se zde skládají v období bakteriálního T2SS. Takový systém by byl sice značně redukovaný, obsahoval by však všechny klíčové komponenty a mohl by tedy být zcela funkční. Pokud by navíc bylo prokázáno, že s bakteriálním T2SS sdílí funkci i orientaci a že zajišťuje transport proteinů z mitochondrie, jednalo by se o zcela unikátní transportní systém. Mitochondrie, které by kromě nezbytného importu proteinů dokázaly proteiny i exportovat, totiž doposud nebyly objeveny. Navíc je možné, že geny pro T2SS pochází již od bakteriálního předka současných mitochondrií. Pak by uvedení prvoci obsahovali evoluční mezistupeň mezi bakterií a mitochondrií a přítomnost tohoto sekrečního systému by mohla být zajímavým důkazem endosymbiotického původu mitochondrie.

Vzhledem k podobnosti eukaryotického sekretinu se sekretinem z T2SS je literární úvod zaměřen především na tento sekreční systém, navíc však krátce představuje i ostatní systémy využívající sekretin. Zmíněn je i současný model evoluce zástupců rodiny sekretinů a mechanismus importu β -barelových proteinů do mitochondrií. V závěrečné podkapitole rešerše jsou shrnuty dosavadní poznatky o eukaryotickém T2SS. Cílem experimentální části práce je charakterizovat mitochondriální sekretin, především pak otestovat jeho schopnost vytvářet póry podobným těm bakteriálním, pozorovat jeho import do izolovaných mitochondrií a popsat interakce sekretinu s ostatními podjednotkami eukaryotického T2SS.

2 Literární přehled

2.1 Rodina sekretinů

Proteiny z rodiny sekretinů se vyznačují schopností tvořit multipodjednotkové kanály ve vnější membráně gramnegativních bakterií. V rámci sekrečních systémů typu II a III slouží k transportu proteinů v nativní konformaci, podílejí se na výstavbě pilu typu IV na povrchu některých bakterií nebo jsou využívány některými filamentárními bakteriofágy k opuštění hostitelské buňky (Korotkov et al., 2011). Sekretiny obsahují konzervovanou C-koncovou membránovou doménu (Genin and Boucher, 1994), které předchází dvě až pět N-koncových solubilních domén. Při strukturních studiích bylo zjištěno, že sekretinové póry v membráně vykazují zpravidla symetrii mezi C12 a C20 a šířku 50 – 80 Å (Korotkov et al., 2011). Dalším znakem sekretinových komplexů je jejich vysoká stabilita a odolnost vůči působení SDS. Ochranu proti proteolytickému štěpení poskytují u některých typů sekretinů specifické chaperony, tzv. pilotiny, které zároveň zajišťují správnou lokalizaci tohoto proteinu do vnější membrány (Hardie et al., 1996).

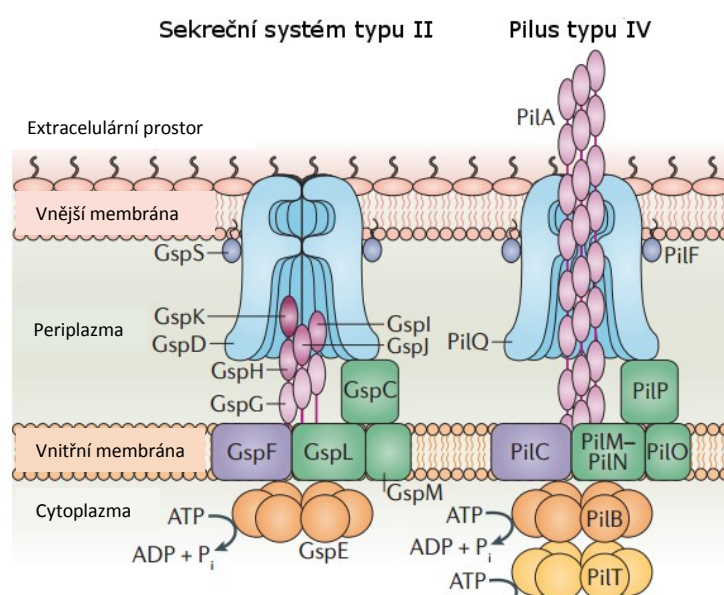
2.2 Systémy využívající sekretin

2.2.1 Sekreční systém typu II (T2SS)

Funkční sekreční systém typu II (T2SS) byl popsán u mnoha druhů gramnegativních bakterií, mezi něž můžeme zařadit i několik nebezpečných patogenů člověka. Přestože právě schopnost sekretovat toxiny a virulenční faktory učinila z T2SS zajímavý objekt studia, většinu substrátů tohoto sekrečního systému lze zařadit spíše do kategorie enzymů sloužících k zisku živin. Jeden z takových substrátů, pullulanáza, lipoprotein vylučovaný bakterií *Klebsiella pneumoniae*, sehrál klíčovou roli při výzkumu T2SS. Bylo totiž zjištěno, že geny nacházející se v okolí genu pro tento amylolytický enzym, jsou nezbytné pro jeho sekreci do vnějšího prostředí (Enfert et al., 1987). Postupně bylo prokázáno, že tento sekreční systém není zdaleka zodpovědný jen za transport pullulanázy. Z významných substrátů lze jmenovat například cholera toxin *Vibrio cholerae* (Sandkvist et al., 1997) nebo termolabilní toxin *Escherichia coli* (Tauschek et al., 2002), které jsou oba přímou příčinou závažných průjemových onemocnění u člověka (Clements and Finkelstein, 1979; Finkelstein et al., 1964). Nemalý význam, tentokrát hospodářský, mají i pektát-lyázy *Dickeya dadantii*, které této bakterii umožňují štěpit rostlinné buněčné stěny a tím i proniknout do rostlinných pletiv (Tardy et al., 1997).

Podjednotky T2SS bývají nazývány různě, podle druhu bakterie, jemuž přísluší, například Pul u *K. pneumoniae* nebo Eps u *V. cholerae*. Někdy také bývá používáno označení proteinů pomocí zkratky Gsp, která je odkazem na obecnou sekretorickou dráhu (general secretory pathway), za jejíž hlavní terminální větev je T2SS považován (Korotkov et al., 2012). Ve své práci budu používat tuto souhrnnou nomenklaturu – zkratku Gsp následovanou velkým písmenem specifikujícím konkrétní podjednotku.

T2SS se skládá z 12 – 15 podjednotek, které bývají kódovány v jednom operonu (Sandkvist, 2001). Lze ho rozdělit na 4 hlavní části. Dominantou komplexu vnější membrány je sekretinový pór složený z mnoha kopií proteinu GspD. U některých druhů bývá sekretin doprovázen ještě lipoproteinem pilotinem (GspS), který slouží k jeho navedení do membrány. energii pro transport poskytuje sekreční ATPáza (GspE). Ta svou činností zajišťuje polymeraci takzvaného pseudopilu, který se formuje v periplazmě z pěti druhů pseudopilinů (GspG, GspH, GspI, GspJ a GspK) a poté vynáší substráty skrz sekretinový pór do extracelulárního prostředí. Protože sekreční ATPáza (vyskytující se v cytoplazmě) a pseudopilus (vznikající v periplazmatickém prostoru) jsou odděleny membránou, je potřebná přítomnost poslední, čtvrté části T2SS – komplexu cytoplazmatické membrány. Ten zpravidla obsahuje čtyři proteiny (GspL, GspM, GspC a GspF) a jeho hlavní funkcí je zajistit propojení sekreční ATPázy a pseudopilu. Kromě těchto hlavních podjednotek se u některých druhů vyskytují ještě další proteiny, například GspA a B sloužící k vazbě peptidoglykanu nebo GspN, jehož funkce doposud nebyla vysvětlena. Ty ovšem nejsou esenciální pro sekreci (Korotkov et al., 2012; Nivaskumar and Francetic, 2014).



Obrázek 1: **Podobnost sekrečního systému typu II a systému pro stavbu pilu typu IV.** T2SS a T4PS obsahují následující homologní proteiny: GspD a PilQ, GspE a PilB, pseudopiliny a PilA, GspF a PilC. Podobnost ostatních proteinů je strukturní. Převzato z Korotkov et al., 2012.

Pseudopiliny získaly svůj název poté, co byla objevena jejich homologie s pilinem – základní stavební složkou bakteriálního pilu typu IV (Bally et al., 1992). Sekvenční homologie s proteiny zajišťujícími výstavbu tohoto pilu byla následně prokázána i u některých dalších podjednotek T2SS – prepilin peptidázy (GspO), sekreční ATPázy (GspE), sekretinu (GspD) a jednoho z proteinů komplexu cytoplazmatické membrány (GspF). U dalších

podjednotek těchto systémů lze pozorovat podobnost strukturní, jak je vidět na obrázku č. 1. T2SS a systém pro výstavbu pilu typu IV (T4PS) jsou tedy s největší pravděpodobností evolučně příbuzné (Hobbs and Mattick, 1993; Peabody, 2003).

2.2.1.1 *Pseudopilus*

Po objevení konzervované pilinové domény v pseudopilinu byla prověřována možnost, zda jsou i pseudopiliny schopné tvořit vláknité struktury. Ukázalo se, že ano. Pokud jsou exprimovány v *E. coli* z vysokokopiových vektorů, lze na povrchu bakterií pozorovat dlouhá vlákna sestávající se z pseudopilinu GspG (Sauvonnnet et al., 2000). I v pseudopilu se vyskytuje ze všech pseudopilinů v nejvyšší koncentraci právě GspG, který bývá označován jako hlavní pseudopilin. Zastoupení ostatních, vedlejších pseudopilinů je v pseudopilu výrazně nižší, jsou však klíčové pro správnou výstavbu pseudopilu. Komplex složený ze čtyř vedlejších pseudopilinů se pravděpodobně nachází na samé špičce pseudopilu. Jednou z jeho funkcí je i zabránit tvorbě nepřiměřeně dlouhých vláken na povrchu buněk. Za přirozených podmínek se díky nim pseudopilus nachází pouze v prostoru mezi dvěma bakteriálními membránami. Vnější membránu překonává tehdy, pokud je exprese pseudopilinů nepřiměřeně vysoká a mezi stavebními jednotkami pseudopilu vzniká stechiometrická nerovnováha (Douzi et al., 2009; Nunn and Lory, 1993). Stejný efekt má i snížení produkce GspK. Naopak zvýšená exprese tohoto vedlejšího pseudopilinu má za následek zkrácení pseudopilu. Zdá se tedy, že GspK je přímým regulátorem jeho délky (Durand et al., 2005). Komplex pseudopilinů GspI, GspJ a GspK zakrývá špičku pseudopilu v takovém úhlu, že není možná vazba dalších pseudopilinových podjednotek. Nejvýše ze všech pseudopilinů v tomto heterotrimeru se pak nachází právě GspK (Korotkov and Hol, 2008). K propojení tohoto komplexu s GspG pravděpodobně dochází přes poslední vedlejší pseudopilin, GspH (Douzi et al., 2009).

Stejně jako piliny jsou i pseudopiliny syntetizovány ve formě prekurzorů, tzv. prepilinů (Bally et al., 1992; Nunn and Lory, 1991). Ty využívají SRP dráhu ke kotranslační inzerci do bakteriální cytoplazmatické membrány, kde jsou rozpoznány prepilin peptidázou (Francetic et al., 2007). Tento enzym odštěpuje z prepilinu N-koncovou hydrofobní sekvenci, čímž vzniká maturovaný pilin či pseudopilin (Nunn and Lory, 1991).

2.2.1.2 *Sekreční ATPáza a komplex vnitřní membrány*

Energii pro sekreci poskytuje sekreční ATPáza, GspE. Patří do stejné proteinové rodiny jako oba typy ATPáz pilu typu IV nebo některé archeální ATPázy (Planet et al., 2001). Lokalizuje na vnitřní stranu cytoplazmatické membrány, kde interaguje s cytoplazmatickou doménou proteinu GspL. Štěpení ATP pomocí sekreční ATPázy je nezbytné pro polymeraci pseudopilu (Sandkvist et al., 1995).

Funkci spojky mezi GspE a pseudopilem plní nejspíš právě GspL. Ten svými podjednotkami překlenuje vnitřní membránu a interaguje jak s GspE, tak i s hlavním pseudopilem GspG. Po vazbě ATPázy změní GspL svoji konformaci, čímž zprostředkovává přenos energie k pseudopilinovým podjednotkám. (Gray et al., 2011; Py et al., 1999). Přestože se předpokládá, že stejně jako příbuzné proteiny pracuje i GspE jako hexamer, nikdy se ho v této podobě nepodařilo izolovat. Za pomoci asistenčního hexameru se však i GspE sestavuje do hexamerní formy, jejíž ATPázová aktivita je přibližně 20x vyšší než u monomeru (Lu et al., 2013). Ukázalo se, že ATPázová aktivita GspE je zesilována v přítomnosti GspL. Děje se tak nejspíš právě proto, že GspL podporuje vznik jeho účinnější, oligomerní formy (Camberg et al., 2006).

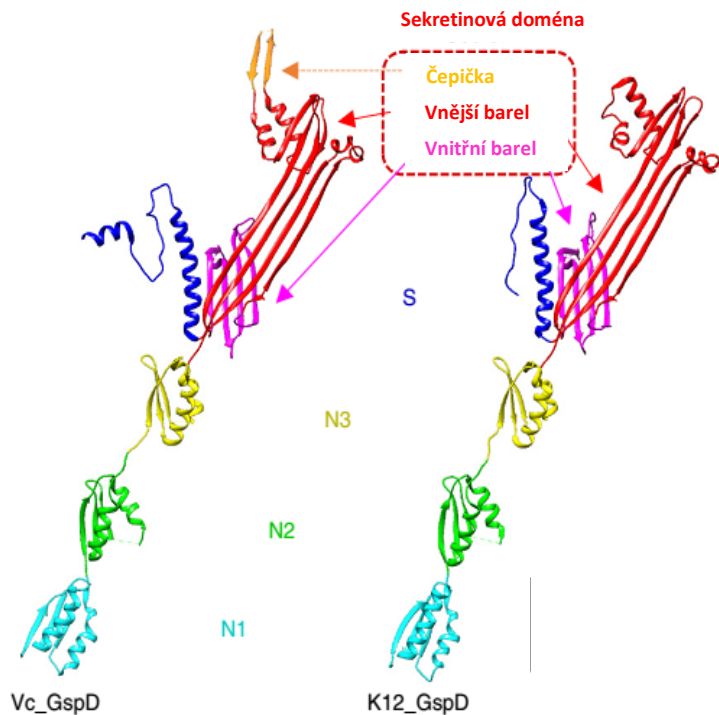
Kromě zmíněných podjednotek T2SS interaguje GspL s dalším proteinem z komplexu vnitřní membrány, GspM. Jak GspL, tak i GspM prochází jedenkrát přes membránu a oba tyto transmembránové proteiny jsou schopné tvořit homodimery. Zároveň ale tvoří společně heterodimer (Sandkvist et al., 1999). Vazebná místa pro tvorbu homodimeru a heterodimeru se však u těchto proteinů překrývají. Při sekreci pomocí T2SS by mohlo docházet k neustálému přepínání mezi těmito dvěma stavy. Změna konformace GspL závislé na činnosti sekreční ATPázy by způsobovala záměnu jednoho typu vazby za druhý. Tím by se pseudopilus potočil a uvolnilo by se místo pro zabudování dalšího pseudopilinu (Lallemant et al., 2013). Komplex GspL a sekreční ATPázy interaguje dále s membránovým proteinem GspF, který je díky této interakci stabilizován (Py et al., 2001).

Poslední z proteinů vnitřní membrány, GspC, má jednu doménu transmembránovou a dvě dlouhé domény periplazmatické, díky nimž může působit jako spojka mezi komplexy vnitřní a vnější membrány (Bleves et al., 1999). Zatímco jeho N-koncová transmembránová doména váže GspL a GspM, na C-konci je schopen interagovat s periplazmatickým vestibulem sekretinového kanálu (Korotkov et al., 2006). Periplazmatické domény GspC se navíc pravděpodobně uplatňují v rozpoznávání substrátu sekretovaného pomocí T2SS (Pineau et al., 2014).

2.2.1.3 *Struktura sekretinu a sekretinového póru*

Centrální komponentou komplexu vnější membrány je sekretinový pór. Jak je patrné z obrázku č. 2, sekretin z T2SS obsahuje kromě konzervované C-koncové sekretinové domény, také čtyři domény N-koncové, N0 – N3. Zatímco N1 – N3 jsou sekvenčně homologní a vyznačují se týmhž strukturním motivem (dva až tři α -helixy, následované 3 vlákny β -listu), N0, nacházející se až na samém N-konci proteinu, se od nich liší. Podle krystalové struktury se N0 skládá ze dvou α -helixů obklopených z jedné strany třemi vlákny a z druhé dvěma vlákny β -listu. Tato struktura odpovídá motivu ze signální domény TonB-dependentního receptoru, který je schopen navázat β -list jiného proteinu. To by mohlo naznačovat, že i N0 se mohla uplatňovat v protein-proteinových interakcích,

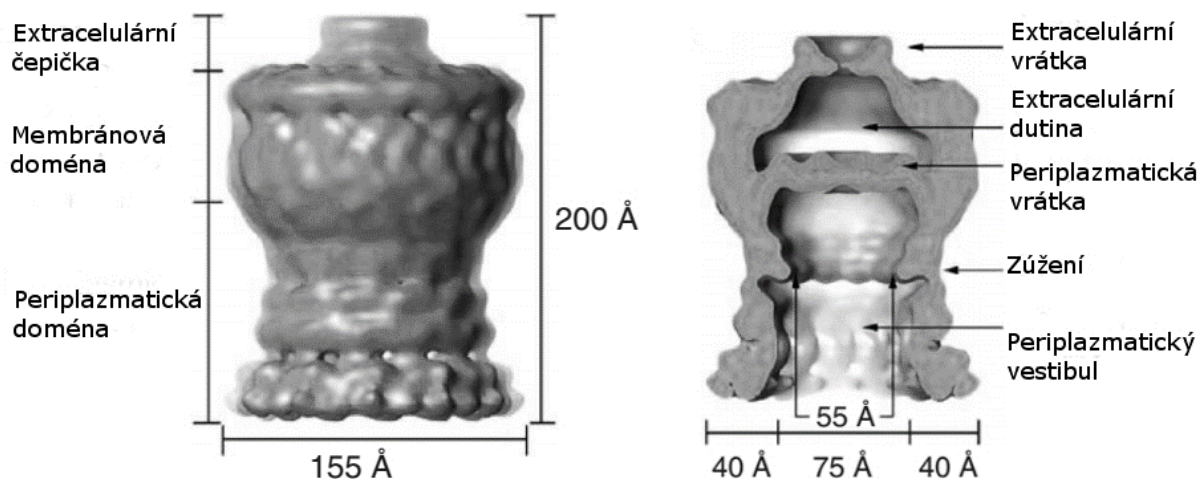
například se substrátem nebo s jinou komponentou T2SS (Korotkov et al., 2010). Sekretinová doména obsahuje 10 antiparalelních β -listů a 4 krátké α -helixy (Yan et al., 2017). Na úplném C-konci proteinu se nachází ještě S-doména, jež je specifická pouze pro sekretiny z T2SS (Reichow et al., 2010). Tato doména slouží k interakci s chaperonem pilotinem, pokud je u daného druhu kódován. Po navázání pilotinu se tato předtím nestrukturovaná doména zformuje do podoby α -helixy (Gu et al., 2012).



Obrázek 2: **Struktura monomeru GspD z *V. cholerae* a *E. coli* kmene K12.** Sekretin z T2SS se skládá ze 4 N-koncových subdomén N0 – N3 (doména N0 v modelu chybí), konzervované sekretinové domény (která přispívá ke vzniku vnitřního a vnějšího β -barelu) a S-domény. Sekretinový kanál z *V. cholerae* se navíc vyznačuje čepičkou, která je tvořena krátkou β -vlásečkou sekretinové domény. Převzato z Yan et al., 2017

Sekretinový pór je jedním

z vůbec největších komplexů bakteriální vnější membrány. Dosahuje hmotnosti kolem 1 MDa, výšky přibližně 200 Å a šířky okolo 155 Å. Jak je patrné z obrázku č. 3, sekretinový komplex z *V. cholerae* se skládá ze tří částí, které jsou navzájem odděleny vrátky. Vlastní kanál ve vnější membráně je tvořen konzervovanými C-koncovými doménami. Na něj na jedné straně navazuje periplazmatická doména, na druhé pak extracelulární čepička. Periplazmatická doména, složená z N-koncových domén, ukrývá prostorný periplazmatický vestibul, jenž přibližně ve dvou třetinách obsahuje místo zúžení. Následují periplazmatická a extracelulární vrátka, která mezi sebou uzavírají extracelulární dutinu. Periplazmatický vestibul je dostatečně velký, aby dokázal pojmout protein takových rozměrů, jaké má například cholera toxin. Zúžení, které je tvořené kruhem z N3 domén, však dalšímu průchodu proteinu zabrání, pokud nenastane výrazná konformační změna celého komplexu. Interakce substrátu s N3 doménami by tak mohla indukovat právě tuto konformační změnu, která by navíc způsobila otevření periplazmatických vrátek (Reichow et al., 2010). Sekretinový kanál z *E. coli* kmene K12 postrádá extracelulární doménu i s extracelulárními vrátky. Pro přenos proteinu mimo bakteriální buňku tedy stačí otevřít pouze periplazmatická vrátka. Jinak je tomu však u póru z *V. cholerae*. Přestavba kanálu vyvolaná interakcí substrátu a N3 domény by pravděpodobně nebyla dostačující pro to, aby kromě periplazmatických vrátek otevřela ještě druhá,



Obrázek 3: **Struktura sekretinového kanálu.** Model vytvořený na základě výsledků kryoelektronové mikroskopie prováděné na dodekameru GspD z *V. cholerae*. Převzato z Reichow et al., 2010 a upraveno.

extracelulární vrátka. Vnější β -barel a extracelulární doména jsou totiž propojené pouze relativně volnými smyčkami, a proto jsou na sobě pravděpodobně nezávislé. Úplné otevření kanálu by tak mohl zajistit až mechanický tlak pseudopilu na extracelulární vrátka (Yan et al., 2017).

Podle dřívějších studií, využívajících kryoelektronové mikroskopie k vytvoření modelu struktury sekretinu u *K. oxytoca* nebo *V. cholerae*, se zdálo, že sekretinový komplex je dodekamer (Chami et al., 2005; Reichow et al., 2010). Novější výzkum sekretinů z *V. cholerae* a *E. coli* kmene K12 však přinesl překvapivý výsledek: místo dvanácti kopií GspD jich sekretinový pór obsahuje spíše patnáct (Yan et al., 2017). Je však možné, že se počet podjednotek bude u různých druhů bakterií lišit – tak, jako tomu je například i u sekretinů z T3SS (Korotkov et al., 2011).

Kryoelektronová mikroskopie s rozlišením na atomové úrovni dále odhalila, že sekretinové domény zauímají v komplexu neobvyklou strukturu dvojitého β -barelu. Vnitřní β -barel je složen ze čtyř krátkých β -listů, ten vnější pak ze čtyř dlouhých a dvou krátkých β -listů. Kontaktní plocha vnitřního a vnějšího β -barelu je velmi bohatá na hydrofobní aminokyselinové zbytky, což umožňuje jejich propojení pomocí četných hydrofobních interakcí. Na stabilizaci kanálu se podílí i S-doména, která interaguje dvěma α -helixy se sousedícími protomery – a to i tehdy, není-li přítomen pilotin. (Yan et al., 2017). Toto zjištění je rovněž překvapivé. Zásadně se totiž liší od představ o neuspořádané S-doméně, která zaujme α -helikální strukturu až po interakci s GspS. Ačkoliv by na neuspořádanost S-domény poukazovaly výsledky získané pomocí více nezávislých metod, jako je například cirkulární dichroismus či nukleární magnetická rezonance, podle nového modelu by se GspS měl vázat spíše do místa, kde se propojují α -helixy ze dvou sousedních S-domén (Nickerson et al., 2011).

GspS vykazuje α -helikální strukturu a interaguje s S-doménou sekretinu pomocí hydrofobního žlábků (Tosi et al., 2011). V buňkách *E. coli* transformovaných pouze genem pro sekretin lze detekovat mnohem více degradačních produktů sekretinu, než u bakterií produkujících sekretin a pilotin zároveň. Analýza těchto peptidových fragmentů ukázala, že pocházejí jak z formy monomerní, tak i z formy multimerní a že degradace začíná od C-koncové domény. Poměr monomerní a multimerní formy se u bakterií deficientních na PulS nijak nemění; pilotin tedy nijak neovlivňuje schopnost sekretinu vytvářet komplexy. Sekretin však potřebuje být exprimován spolu s GspS pro správné vložení do vnější membrány. Nepřítomnost pilotinu totiž způsobuje chybnou lokalizaci vzniklých komplexů do vnitřní bakteriální membrány (Guilvout et al., 2006; Hardie et al., 1996). Stejný fenotyp vykazuje i delece S-koncové domény sekretinu (Daefler et al., 1997). Pilotin zůstává na sekretin navázán nejspíš i po jeho zabudování do membrány – GspD a GspS lze purifikovat společně, v přibližném poměru 1:1 (Nouwen et al., 1999).

S-doménu můžeme nalézt pouze u sekretinů z T2SS. Sekretinům jiných typů, jako je například sekretin z bakteriofága f1, S-doména chybí. Pokud je takový sekretin s S-doménou uměle spojen, je poté výrazně náchylnější k proteolýze než bez S-domény. Je-li však tento chimérický protein exprimován společně s pilotinem, dochází k jeho opětovné stabilizaci. V případě, že se tento sekretin vkládá rovnoměrně jak do vnitřní, tak do vnější bakteriální membrány (jako tomu je i u zmiňovaného fágového sekretinu), lokalizuje po fúzi s S-doménou preferenčně do membrány vnější (Daefler et al., 1997).

2.2.1.4 Skládání sekretinového komplexu a jeho vkládání do membrány

GspD obsahuje N-koncovou signální sekvenci, která zajišťuje jeho transport do periplazmatického prostoru pomocí Sec dráhy a následně je odštěpena signální peptidázou (Enfert et al., 1989). Z mnoha studií prováděných na sekretinu z T2SS vyplynulo, že tento protein nevyžaduje žádný asistenční komplex pro multimerizaci a že je schopen sám se vložit do lipidové dvojvrstvy. Hlavní rolí asistujících proteinů je proto nasměrování sekretinů do správné membrány. Jak již bylo zmíněno výše, lokalizace sekretinu do vnější membrány je zajištěna chaperonem pilotinem. V případě, že je pilotin ze systému odstraněn, vkládá se sekretin po průchodu Sec translokou do té nejbližší, tedy cytoplazmatické membrány (Guilvout et al., 2006). Zároveň v buňce indukuje tzv. odpověď na fágový šok, která se projevuje mimo jiné nárůstem hladiny proteinu PspA (Hardie et al., 1996). Tato signální dráha se spouští v reakci na různé události způsobující zvýšenou permeabilitu vnitřní membrány. Zdá se však, že v případě sekretinů není tato odpověď zahájena proto, že by skrze nepatříčně umístěný sekretinový pór unikaly z buňky nějaké důležité molekuly. Bakterie spíše detekuje nezvyklý protein ve své vnitřní membráně, přepadně její

zvláštní zakřivení, způsobené zvýšenou přítomností membránových proteinů (Flores-Kim and Darwin, 2016).

Pokud je uměle odstraněna signální sekvence pro obecnou sekretorickou dráhu, vkládá se sekretin také do cytoplazmatické membrány, ovšem z její vnitřní strany. Po indukci exprese takto upraveného proteinu buňky téměř okamžitě přestávají růst a v jejich vnitřní membráně lze detekovat stopové množství sekretinových multimerů. Tyto komplexy vložené do membrány z vnitřní strany jsou tak pro bakterie zjevně toxické. Na rozdíl od případu, kdy se sekretin vkládá do vnitřní membrány z periplazmy, se však v buňkách neobjevuje zvýšené množství PspA proteinu (Guilvout et al., 2008).

Sekretin se také vkládá do uměle připravených lipozómů a tvoří v nich póry, stavbou odpovídající těm, které byly izolovány z bakteriálních membrán (Guilvout et al., 2008). Před inzercí do lipidové dvojvrstvy sekretin vytváří s membránou asociované multimery, tzv. prepóry, které následně projdou konformační změnou a zanoří se do membrány (Huysmans et al., 2013). Experimenty zabývající se kinetikou tohoto procesu ukázaly, že rychlost vkládání je výrazně ovlivněna složením lipozómů. Sekretin preferuje fosfolipidy, které se přirozeně vyskytují v bakteriálních membránách, před lecitinem, jenž bakteriím většinou chybí. *In vivo* tak pravděpodobně zajišťují efektivní vkládání sekretinu do membrány právě lipidy (Huysmans et al., 2015).

2.2.1.5 Mechanismus inzerce sekretinu do vnější membrány

Přestože je výsledný sekretinový komplex β -barelovou strukturou, vkládá se do membrány nezávisle na β -barel assembly machinery (BAM) komplexu, který u bakterií obvykle zodpovídá za správnou lokalizaci takových proteinů do vnější membrány (Collin et al., 2007). Jedním z vůbec prvních objevených substrátů BAM-komplexu byl sekretin PilQ uplatňující se v systému pro skládání pilu typu IV u *Neisseria meningitidis* (Voulhoux et al., 2003), který je sekretinu z T2SS blízce příbuzný (Martin et al., 1993). To, že u *E. coli* se sníženou produkcí proteinu BamA, klíčové podjednotky BAM dráhy, zůstává schopnost sekretinu tvořit komplexy ve vnější membráně nedotčená, bylo proto velmi překvapivým zjištěním (Collin et al., 2007).

Ačkoliv za inzerci sekretinu do vnější membrány zodpovídá chaperon pilotin, pouhá jeho přítomnost není pro navedení sekretinu do této membrány dostatečná. Pilotin z *K. oxytoca* je lipoprotein, který obsahuje signál pro Lol dráhu (Collin et al., 2011). Právě tato dráha, jež v bakteriích napomáhá správnému vkládání lipoproteinů do vnější membrány, se podílí na targetování sekretinu.

Bakteriální lipoproteiny procházejí do periplazmatického prostoru Sec translokonem a zůstávají asociované s vnitřní membránou pomocí lipidické kotvy. První komponenta Lol dráhy, transportér LolCDE, zajišťuje odštěpení lipoproteinu od membrány. Na podjednotku LolC se naváže chaperon LolA, jenž si poté převezme substrát od podjednotky LolE. LolD je ATPáza, která pro tento proces poskytuje energii. Pomocí LolA je substrát naveden na protein vnější membrány LolB, jenž zprostředkuje jeho zabudování do vnější membrány. Pilotin tedy v periplazmě neváže jen samotný sekretinový monomer, ale i chaperon LolA. Tento komplex poté putuje periplazmatickým prostorem až z k vnější membráně (Huysmans, 2016). Způsob, jakým se sekretin dostává do této membrány, je prozatím nejasný. Pilotin a Lol dráha však nejspíš vkládají do membrány jednotlivé monomery GspD, které tvoří multimery až poté. Je nepravděpodobné, že by objemné sekretinové póry procházely již složené přes síť peptidoglykanu. Navíc pokud je v bakteriích exprimován GspD bez S-domény, který tak není schopen vázat pilotin, zároveň s nemutovanou variantou GspD, zůstávají molekuly sekretinu bez S-domény ve vnitřní membráně. Pokud by periplazmou procházely celé sekretinové komplexy, mutantní sekretin by se v nich dostal až k vnější membráně. Další funkcí LolA je tedy nejspíš zabránit multimerizaci sekretinu, dokud nedojde k jeho přenosu na LolB. Potřebu vázby pilotinu lze částečně obejít, pokud je sekretin postrádající S-doménu uměle acylován na N-konci a sám se tak stává lipoproteinem. Takto upravený sekretin dokáže projít periplazmou a vkládá se do vnější membrány, acylace však, na rozdíl od pilotinu, neochrání sekretin před degradací. Bakterie exprimující modifikovaný sekretin navíc nejsou schopné sekretovat pullulunázu – buď z důvodu zvýšené degradace GspD, nebo proto, že lipidická kotva blokuje jeho N-terminální doménu v membráně (Collin et al., 2011). Právě část N-koncové domény, konkrétně subdoména N3, totiž pravděpodobně indukuje multimerizaci sekretinu a jeho vkládání do membrány (Guilvout et al., 2016).

Kombinaci lipoproteinového chaperonu a Lol dráhy využívá GspD nejspíš kvůli své schopnosti multimerizovat v membránách pouze za pomoci přítomných lipidů. Tím se zásadně liší od sekretinu ze systému pro skládání pilu typu IV (T4PS), který je známým substrátem BAM komplexu a který tuto schopnost postrádá. Protože nehrozí jeho chybná lokalizace do vnitřní membrány, ať už z cytoplazmy či z periplazmatického prostoru, může sekretin z T4PS využít obvyklého mechanismu vkládání přes BAM komplex (Huysmans, 2016).

2.2.1.6 Inzerce sekretinu do vnější membrány v T2SS bez GspS

V genomu *V. cholerae* a některých dalších bakterií nebyl nalezen homolog GspS. Bioinformatické studie však ukázaly, že se u těchto bakterií vyvinul strukturně zcela jiný typ pilotinu, jenž je schopen vázat S-doménu sekretinu a plnit obdobnou funkci. Tento nový pilotin, nazvaný AspS (Alternate Secretin Pathway subunit S, alternativní S-podjednotka ze sekretinové dráhy), byl

kromě bakterií rodu *Vibrio* objeven například u enteropatogenní *E. coli* (EPEC) či některých zástupců rodu *Shigella*. Bylo zjištěno, že T2SS u zmíněných druhů bakterií mají společný evoluční původ a byly rozšířeny horizontálním genovým přenosem z genomu *V. cholerae*. Fylogenetická analýza sekretinů a jejich S-domén dále ukázala, že sekretiny z T2SS se dělí do tří samostatných skupin, korespondujících s přidruženým typem pilotinu. Zatímco sekretiny typu *Klebsiella*, které lze dále najít u rodů *Aeromonas*, *Dickeya*, *Yersinia*, *Erwinia* a nepatogenních kmenů *E. coli*, využívají pilotin GspS, rozšíření sekretinů typu *Vibrio* odpovídá bakteriálním kmenům, které kódují pilotin AspS. Třetí skupinou jsou pak sekretiny typu *Pseudomonas*, u nichž byly popsány alternativní postupy vkládání do membrány (Dunstan et al., 2013).

U *E. coli* se vyskytují dva sekreční systémy typu II, označované jako T2SS α a T2SS β . Zatímco některé kmeny, například uropatogenní *E. coli* (UPEC), využívají oba tyto sekreční systémy, u enterotoxigenních kmenů (ETEC) je kódován pouze T2SS β , který zde slouží k sekreci termolabilního enterotoxinu. V genomu nepatogenního kmene K-12 lze sice také objevit geny pro oba tyto sekreční systémy, kvůli rozsáhlé deleci v operonu pro T2SS β však tento systém není funkční. Při fylogenetické analýze sekretinů se ukázalo, že tyto dva sekreční systémy nemají společný evoluční původ – GspD z T2SS α se řadí mezi sekretiny typu *Klebsiella*, sekretin z T2SS β je naopak blízce příbuzný sekretinům z *V. cholerae*. Toto tvrzení je podpořeno i tím, že společně s oběma sekretiny je kódován vždy odpovídající druh pilotinu. Kmeny s T2SS α obsahují pilotin homologní k GspS a kmeny kódující T2SS β nesou homolog pilotinu AspS (Dunstan et al., 2013; Strozen et al., 2012).

Také *Pseudomonas aeruginosa* využívá k sekreci svých proteinů dva sekreční systémy typu II. Jeden, označovaný jako Xcp, zajišťuje například sekreci exotoxinu A, druhý, nazvaný Hxc, slouží k transportu alkalické fosfatázy. Tento enzym odštěpuje fosfát z organických sloučenin a je ho zapotřebí tehdy, když má buňka fosfátu nedostatek. Právě tehdy se spouští exprese genů pro Hxc sekreční systém (Ball et al., 2002; Lazdunski et al., 1990). Ani jeden z těchto sekrečních systémů nejspíš nevyužívá pilotin homologní k GspS. Studie provedená na sekretinu HxcQ z fosfát dependentního sekrečního systému ukázala, že obsahuje na N-konci lipidickou kotvu, která pravděpodobně pilotin zastupuje. Pokud je odstraněna, vkládá se HxcQ do cytoplazmatické membrány – vykazuje tedy stejný fenotyp, jako sekretin z *K. oxytoca* v případě, že je exprimován bez pilotinu (Viarre et al., 2009). Jeden z proteinů *P. aeruginosa* je však strukturně velmi podobný alternativnímu pilotinu AspS. V jeho sekvenci se sice nevyskytuje motiv pro acylaci, a proto nejspíše nebude navádět sekretin do vnější membrány, mohl by se však na sekretin vázat a chránit ho proti degradaci (Dunstan et al., 2013).

V genomu *Aeromonas hydrophila* bioinformatické studie homolog žádného z pilotinů neodhalily (Dunstan et al., 2013). Jeho úlohu však částečně zastává GspAB, proteinový komplex cytoplazmatické membrány. Pokud je inaktivován, hromadí se v buňkách monomery sekretinu a sekreční systém není funkční. Tento defekt však lze kompenzovat zvýšením exprese GspD, ačkoliv se takto vzniklé multimery vkládají rovnoměrně do vnitřní i vnější membrány (Ast et al., 2002). Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému byla prokázána interakce mezi GspD a GspB, který by mohl sloužit jako platforma pro multimerizaci sekretinu. Zároveň by zajistil jeho propojení s GspA, jenž sám není vazby sekretinu schopen (Vanderlinde et al., 2014). GspA je ATPáza vážící peptidoglykan, která by se mohla uplatňovat při remodelaci tohoto bakteriálního polymeru. Pokud by totiž sekretin z *A. hydrophila* skutečně tvořil póry již u cytoplazmatické membrány, bylo by zapotřebí zajistit, aby tak veliký proteinový komplex sítě peptidoglykanu vůbec dokázal projít. Bakterie mutantní v GspAB komplexu sice skutečně obsahují méně multimerní formy sekretinu, vlastní sekrece proteinů však zůstává nedotčena (Strozen et al., 2011).

2.2.1.7 Skládání T2SS

Výstavba celého T2SS začíná pravděpodobně od sekretinového póru. Zatímco sekretin nevyžaduje pro své vložení do vnější membrány žádnou další strukturní podjednotku T2SS, pro správnou lokalizaci GspC je nutná alespoň přítomnost sekretinu. GspC pak řídí správné uspořádání komplexu vnitřní membrány, jehož podjednotky se navzájem stabilizují. GspL z tohoto komplexu poté převede energii od sekreční ATPázy do periplazmatického prostoru, kde dochází k polymeraci pseudopilinů z maturovaných pseudopilinů (Gray et al., 2011; Lybarger et al., 2009). Polymerace pseudopilinů však může probíhat do jisté míry nezávisle – k iniciaci vzniku pseudopilinových vláken v periplazmě jsou dostačující vedlejší pseudopiliny GspI a GspJ (Cisneros et al., 2012).

2.2.1.8 Sekrece pomocí T2SS

Přestože T2SS svými podjednotkami zasahuje do obou bakteriálních membrán, transportuje proteiny pouze přes tu vnější (Korotkov et al., 2012). Substrát tedy musí nejprve překonat cytoplazmatickou membránu a dostat se do periplazmatického prostoru. Do sekrece je proto kromě T2SS zapojena také obecná sekretorická (Sec), nebo Tat dráha. Sec dráha, transportující proteiny nesbalené, je v tomto případě využívána majoritně (Voulhoux et al., 2001). Aby byl substrát správně identifikován, musí obsahovat N-koncovou signální sekvenci, s níž interaguje signál rozpoznávající částice (SRP) nebo chaperon SecB. Těmi je protein naveden k SecYEG, membránovému kanálu, jenž zajistí vlastní průchod membránou (Van den Berg et al., 2004; Pugsley, 1993). Energií pro transport poskytuje ATPáza SecA a protonmotivní síla (Schiebel et al., 1991). Tat dráha (neboli Twin-arginin translokázový systém) oproti tomu přenáší proteiny již sbalené. Signálem pro translokaci jsou zde dva za sebou jdoucí argininy, nacházející se opět v N-

terminálním signálním peptidu (Sargent et al., 1998). Substrát membránu překonává za pomoci protonmotivní síly a tří proteinů, TatA, TatB a TatC (Bolhuis et al., 2001; Santini et al., 1998). Ať už je k transportu použita Sec nebo Tat dráha, je v periplazmatickém prostoru ze substrátu odštěpena signální sekvence (Paetzel et al., 2000). V případě, že byl protein transportován Sec dráhou, musí zaujmout nativní konformaci, aby ho mohl T2SS rozpoznat. T2SS tedy přenáší proteiny sbalené (Hirst et al., 1987). To poskytuje výhodu například tehdy, když protein pro svou funkci vyžaduje kofaktor, který se nevyskytuje v dostatečné koncentraci vně buňky.

Substráty T2SS jsou velmi rozmanité a doposud se v jejich sekvenci nepodařilo nalézt žádný konzervovaný motiv, předurčující je k transportu pomocí T2SS (Douzi et al., 2011). Bylo však zjištěno, že zaujetí nativní konformace je nutným předpokladem pro rozpoznání substrátu sekrečním systémem. Pokud se proteinům zabrání sbalit se, hromadí se v periplazmatickém prostoru (Hardie et al., 1995). Signál pro transport pomocí T2SS bude proto spíše strukturního charakteru. Na rozpoznávání substrátu se podílejí tři části sekrečního systému – obě periplazmatické domény GspC, N0 a N1 domény GspD a pseudopiliny nacházející se na špičce pseudopilu (Douzi et al., 2011; Pineau et al., 2014).

V současnosti existují dva hlavní modely popisující mechanismus transportu proteinů pomocí T2SS. První, pístový model, předpokládá, že pseudopilus se cyklicky prodlužuje a rozpadá. Polymerace pseudopilinů je spuštěna interakcí transportovaného proteinu s GspC a jeho vazbou na vedlejší pseudopiliny. Substrát je poté na špičce pseudopilu vyneseno přes sekretinový pór do vnějšího prostředí. Následuje depolymerace pseudopilu a návrat T2SS do počátečního stavu (Korotkov et al., 2012). Podle druhého, šroubovicového modelu jednou sestavený pseudopilus umožní přenos mnoha molekul substrátu. Celý proces transportu připomíná čerpání tekutiny pomocí tzv. Archimédova šroubu. Pseudopilus se skládá do tvaru pravotočivé šroubovice a po přidání každého GspG se pootočí. Substrát by se díky tomu mohl zachytávat ve žlábků vznikající šroubovice a transport by byl zajištěn samotnou rotací pseudopilu (Nivaskumar and Francetic, 2014).

2.2.2 Systém pro skládání pilu typu IV

Pily typu IV jsou vláknité organely, které se nacházejí na jednom, nebo obou pólech buněk některých bakterií. Tyto organely zajišťují mimo jiné speciální typ pohybu, tzv. škubavý pohyb (twitching motility), jenž primárně slouží k rychlému rozšiřování bakteriálních kolonií, například při tvorbě biofilmů (Kaiser, 1979; Klausen et al., 2003; Semmler et al., 1999). Pilus typu IV se během pohybu prodlouží, přichytí k povrchu a opět zkrátí, čímž dojde k posunutí buňky. Poté se cyklus

opakuje (Skerker and Berg, 2001). Protahání a retrakce pilu je řízena dvěma ATPázami, PilB a PilT, které pracují antagonisticky. Zatímco PilB se uplatňuje při tvorbě pilu, PilT zajišťuje jeho zkrácení (Jakovljevic et al., 2008). Piliny, strukturální podjednotky pilu typu IV, jsou syntetizovány jako tzv. prepiliny. Tyto prekurzory jsou transportovány do vnitřní bakteriální membrány, kde jsou procesovány enzymem prepilin peptidázou a následně použity pro stavbu pilu (Nunn and Lory, 1991).

Výstavba pilu typu IV vyžaduje kromě samotných pilinů, prepilin peptidázy a obou ATPáz ještě řadu dalších proteinů, souhrnně nazývaných jako systém pro skládání pilu typu IV (T4PS): protein vnitřní membrány PilC (homologní k GspF z T2SS), cytoplazmatický protein PilM a periplazmatický komplex PilNOP. Průchod pilu do extracelulárního prostředí zajišťuje sekretinový kanál ve vnější membráně (Korotkov et al., 2012; Maier and Wong, 2015).

Sekretiny z T4PS (PilQ) mají kromě konzervované C-koncové sekretinové domény minimálně dvě domény N-koncové, N3 a N0 (Korotkov et al., 2011). Póry tvořené PilQ vykazují rotační symetrii, stejně jako je tomu u sekretinů z ostatních systémů. Podle kryoelektronové mikroskopie se sekretinový pór z *Neisseria meningitidis* skládá z 12 kopií sekretinu. Nejedná se ovšem o klasický dodekamer, jak naznačovaly dřívější experimenty, ale o tetramer trimerů (Collins et al., 2004). Při pozorování v izolovaných bakteriálních membránách se však sekretiny z *N. meningitidis* a příbuzné *Neisseria gonorrhoeae*, skládají se do struktur s čtrnáctičetnou symetrií, které jsou navíc obklopeny periferní prstencovitou strukturou (Jain et al., 2011). Ta je tvořena nejspíše proteinem Tsap, jenž u některých T4PS ukotvuje sekretinový kanál k vrstvě peptidoglykanu. Toto uspořádání slouží pravděpodobně ke zvýšení mechanické odolnosti sekretinového komplexu během cyklického prodlužování a zkracování pilu (Siewering et al., 2014).

Sekretiny z T4PS na rozdíl od těch z T2SS nenesou na C-konci doménu pro vazbu pilotinu. Přesto se i zde podobné asistenční proteiny vyskytují, ačkoliv přesný způsob jejich vazby na sekretin zůstává neznámý (Korotkov et al., 2011). Funkce pilotinů z T4PS se navíc mezi jednotlivými bakteriálními druhy liší. U *N. meningitidis*, jejíž sekretin byl popsán jako jeden z proteinů závislých na BAM komplexu, pilotin PilW pouze stabilizuje sekretinové multimery v membráně, na jejich lokalizaci však nemá vliv (Carbonnelle et al., 2004; Voulhoux et al., 2003). Oproti tomu PilQ z *P. aeruginosa*, jehož vkládání do vnější membrány není řízeno BAM komplexem, nýbrž LOLA, vyžaduje svůj pilotin PilF jak pro stabilitu, tak i pro správnou lokalizaci. Přesto se však jeho inserce do membrány nejspíše odlišuje od sekretinů z T2SS – na rozdíl od nich totiž PilQ postrádá schopnost vkládat se do lipozómů *in vitro* (Hoang et al., 2011; Koo et al., 2008).

2.2.3 Systém pro přirozenou transformaci

Při analýze genů klíčových pro příjem cizorodé DNA z prostředí bylo zjištěno, že mnoho z nich je zároveň obsaženo v systému pro tvorbu pilu typu IV. Systém pro přirozenou transformaci je u některých bakterií velmi těsně spřažen právě s tvorbou pilů typu IV, u jiných pak pouze obsahuje některé podjednotky homologní k podjednotkám T4PS (Averhoff, 2009). Jako modelový organismus pro studium přirozené transformace byla vybrána bakterie *Thermus thermophilus*, která se vyznačuje nejvyšší transformační rychlostí vůbec (Koyama et al., 1986).

Systém pro přirozenou transformaci z *T. thermophilus* sdílí část svých podjednotek s T4PS, například sekretin PilQ, pilin PilA4 nebo proteiny vnitřní membrány PilM, PilN a PilO (Friedrich et al., 2002). Jiné piliny, PilA1, PilA2 a PilA3, se však ukázaly být specifické pouze pro příjem DNA z prostředí. Zdá se tedy, že ačkoliv jsou tyto dva systémy propojené, jsou zároveň i dostatečně funkčně oddělené (Friedrich et al., 2003).

Sekretinový pór je nezbytnou složkou tohoto systému – bez něj bakterie ztrácí schopnost vázat a přijímat DNA z vnějšího prostředí. V transformačním systému *N. meningitidis* byla prokázána velice silná interakce mezi sekretinem a DNA, piliny naopak interagovaly s DNA pouze slabě (Assalkhou et al., 2007; Schwarzenlander et al., 2009). I sekretinový komplex z *T. thermophilus* je schopen specifické vazby dvouvláknové DNA – je tedy pravděpodobné, že neplní pouze pasivní roli membránového kanálu, ale aktivně se účastní vazbou DNA z prostředí. Tento PilQ tvoří nejkompexnější strukturu ze všech známých sekretinů – dodekamer o výšce až 340 Å (Burkhardt et al., 2011). Kromě konzervované C-koncové domény nese totiž tento sekretin ještě pět N-koncových domén N4 – N0, jež nevykazují žádnou podobnost s N-koncovými doménami ostatních sekretinů. Tyto subdomény by se proto mohly uplatňovat v interakcích s proteiny specifickými pouze pro tento systém. V nepřítomnosti pilu obsahuje sekretinový pór dvoje vrátka – jedna v C-terminální doméně, druhá pak mezi doménami N1 a N2. Tato jsou opět specifickým znakem pro sekretin z *T. thermophilus* (Averhoff, 2009; Gold et al., 2015).

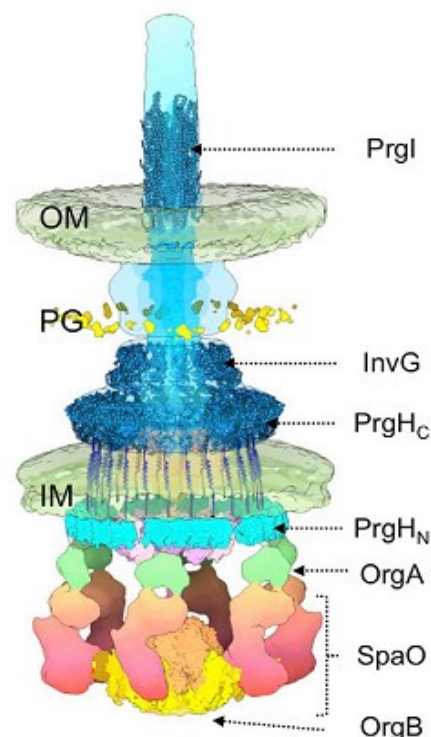
Pro správnou lokalizaci do vnější membrány vyžaduje tento sekretin unikátní asistenční protein PilW. Bakterie mutantní v PilW zcela postrádají sekretin ve vnější membráně a nejsou kompetentní k transformaci. Schopnost buněk vázat DNA se však v takovém případě nemění. Vychytávání DNA z prostředí se tedy pravděpodobně účastní kromě PilQ ještě jiný protein (Rumszauer et al., 2006; Schwarzenlander et al., 2009).

Přesný mechanismus transportu DNA přes vnější membránu zůstává prozatím neobjasněn. Předpokládá se však, že piliny PilA1, PilA2, PilA3 a PilA4 tvoří v periplazmatickém prostoru krátké

pseudopily, které způsobí otevření sekretinového kanálu a následně depolymerují, čímž vtáhnou DNA skrz sekretinový pór (Averhoff, 2009).

2.2.4 Sekreční systém typu III

Sekreční systém typu III (T3SS) byl poprvé popsán u *Yersinia enterocolitica* jako soubor proteinů zodpovědných za transport virulencních a cytotoxických faktorů (Michiels et al., 1991). Brzy poté byl objeven u různých dalších patogenů napadajících rostliny i živočichy – například u bakterií z rodů *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Salmonella* či *Shigella* (Gough et al.; Groisman and Ochman, 1993). Většina konzervovaných podjednotek T3SS je homologních k proteinům uplatňujícím se při tvorbě bakteriálního bičíku. Jednou z výjimek je pak právě sekretin, jenž se na výstavbě bičíku nijak nepodílí (Van Gijsegem et al., 1995). T3SS se strukturou podobá bazálnímu tělísku bičíku. Jak je patrné z obrázku č. 4, tento komplex spojuje vnitřní a vnější bakteriální membránu bakterií. Pracuje na principu duté jehly dopravující efektorové proteiny přes obě bakteriální membrány přímo do buňky hostitele dané patogenní bakterie. Z tohoto důvodu bývá T3SS někdy označován jako tzv. injektozóm (Kubori et al., 1998).



Obrázek 4: **Struktura T3SS ze *S. typhimurium* vytvořená pomocí kryoelektronové tomografie.** Sekretin InvG je ukotven ve vnější membráně (OM) a prochází vrstvou proteoglykanu (PG). Převzato z Hu et al., 2017

Struktura sekretinového kanálu byla stanovena pomocí elektronové mikroskopie celého T3SS komplexu. Zatímco pór ve vnější membráně *Salmonella typhimurium* je pravděpodobně tvořen 15 kopiemi sekretinu, sekretin *Shigella flexneri* tvoří spíše dodekamery (Hodgkinson et al., 2009; Schraidt and Marlovits, 2011). V uzavřeném stavu je sekretinový pór předělen periplazmatickými vrátky a v N-terminální části zúžen, podobně, jako tomu je u sekretinů z T2SS (Marlovits et al., 2004). N-terminální doménu InvG, sekretinu ze *S. typhimurium*, lze rozdělit na tři subdomény – N3, N1 a N0. Místo zúžení se pak nachází mezi první a druhou jmenovanou subdoménou. I tento znak je shodný ze sekretinem z T2SS (Korotkov et al., 2011). N-koncové domény z obou sekrečních systémů jsou podobné i strukturně – v N0 a N1 subdomény z T2SS a T3SS zaujímají tutéž sekundární strukturu (Spreter et al., 2009).

Sekretiny z T3SS nesou na samém C-konci doménu pro vazbu pilotinu. Ta však není homologní k S-doméně sekretinů z T2SS. Také přesná funkce pilotinů i jejich stavba se mezi T2SS a T3SS liší a rozdílná je dokonce i mezi jednotlivými T3SS u různých bakterií. Pilotin InvH ze *S. typhimurium* se uplatňuje pouze při navádění sekretinu do vnější membrány (Daefler and Russel, 1998). Oproti tomu nepříbuzná rodina pilotinů z *Y. enterocolitica* a *P. aeruginosa* zajišťuje jak správnou lokalizaci, tak i stabilitu sekretinu (Rau and Darwin, 2015). Pilotiny z T3SS jsou lipoproteiny, které při vkládání sekretinu do membrány spolupracují s proteiny Lol dráhy (Okon et al., 2008). Vkládání sekretinů z T3SS se tedy nejspíše děje nezávisle na BAM komplexu. Jak se ukázalo na příkladu sekretinu z *P. aeruginosa* PscC, snížení aktivity BamA nijak neovlivňuje vkládání sekretinu do membrány. Deplece LolB naopak způsobí úplné vymizení multimerů z vnější membrány a výrazné snížení množství sekretinových multimerů i monomerů v bakteriálních buňkách. Na rozdíl od sekretinů z T2SS, *in vitro* syntetizovaný PscC není schopen samostatné inzerce do membrán. Při vyřazení Lol dráhy se proto nevkládá do žádné z membrán a je degradován (Hoang et al., 2011). Další odlišností mezi těmito dvěma druhy sekretinů je, že v T3SS nemá sekretin vliv na skládání ostatních podjednotek. Z bakterií postrádajících sekretin lze stále izolovat nezměněnou jehlovitou strukturu injektozómu (Schraidt et al., 2010).

2.2.5 Systém pro export filamentárních bakteriofágů

Filamentární bakteriofágové napadají buňky *E. coli*, ale na rozdíl od ostatních fágů nezpůsobují lyzi bakterií, nýbrž jejich trvalou infekci. Nakažené bakterie v takovém případě dlouhodobě produkují virové partikule (Butler, 1976). Kromě genů kódujících strukturní a replikační proteiny fága jsou v jeho genomu obsaženy další tři geny, jejichž produkty nelze ve virových partikulách detekovat, které jsou však nezbytné pro úspěšný export fágových proteinů z bakteriální buňky (Russel, 1991). Jedním z nich je pIV, jenž nese konzervovanou sekretinovou doménu a formuje odolné komplexy ve vnější membráně infikovaných buněk. Export fágových částic je díky němu podobný bakteriální sekreci (Brissette and Russel, 1990; Russel et al., 1997). K úspěšnému vytvoření fágové partikule jsou nutné i oba zbylé proteiny, pI a pIX, které lokalizují do vnitřní membrány a interagují s N-koncovými doménami pIV (Feng et al., 1999).

Fágový sekretin se skládá z C-koncové sekretinové domény a dvou N-koncových subdomén, N3 a N0 (Korotkov et al., 2011). Jako ostatní sekretiny, i pIV obsahuje štěpitelnou signální sekvenci pro Sec dráhu, pomocí níž se dostává do periplazmatického prostoru (Rapoza and Webster, 1993). Odtud se poté vkládá do vnější membrány. Pro tvorbu multimerů pravděpodobně nepotřebuje žádný pomocný protein (Kazmierczak et al., 1994) a je také schopen samovolné inzerce do umělých

lipozómů (Nickerson et al., 2012). Póry fágového exportního systému jsou složeny ze 14 kopií pIV a v membránové doméně obsahují vrátka, stejně jako ostatní sekretinové kanály (Opalka et al., 2003). Vestibul tohoto sekretinového kanálu je navíc zúžen, podobně, jako je tomu u kanálu z T2SS. Protože průměr zúžení je menší než průměr fágové partikule, mohla by se jeho interakce se substrátem uplatňovat při otevírání kanálu (Korotkov et al., 2011).

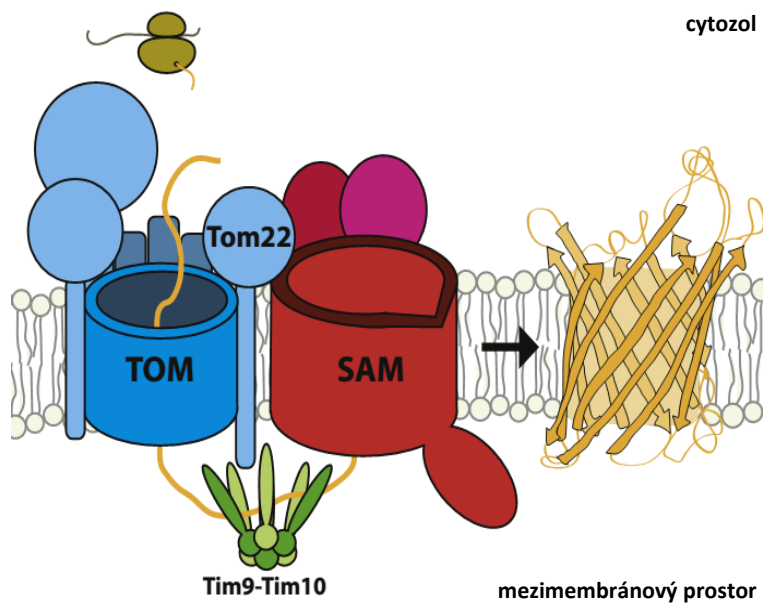
2.3 Evoluce rodiny sekretinů

Schopnost samostatné multimerizace a vkládání do membrány by mohla být dobrým kritériem pro stanovení příbuznosti sekretinů z jednotlivých systémů. Sekretiny by se tím rozdělily do dvou velkých skupin – na ty, které jsou schopné inzerce do membrány (sekretiny z T2SS a filamentárních fágů), a ty, které k tomu vyžadují asistenci dalších proteinů (sekretiny z T3SS a T4PS). To, jaký typ sekretinu je původnější, fylogenetická analýza sice neumožnila zjistit, jednoznačně však podpořila navrženou klasifikaci do těchto dvou skupin (Nickerson et al., 2012).

Záměnou jediné aminokyseliny v konzervované C-koncové doméně PilQ z T4PS lze zapříčinit vznik schopnosti neasistovaného vkládání do membrán i u tohoto sekretinu. Účinnost procesu sice zůstává poměrně nízká, avšak k vytvoření zcela samostatně multimerizujícího sekretinu by nejspíš bylo zapotřebí jen několika takových záměn. Lze tedy předpokládat, že samostatná inzerce sekretinů je pokročilejším evolučním znakem. V takovém případě by byl nejpůvodnější sekretin z T4PS, sekretiny z T2SS a filamentárních fágů by naopak byly odvozené. Nabízí se možnost, že viry přejaly gen pro sekretinový kanál z T2SS hostitelských bakterií (Nickerson et al., 2012). Tato teorie by pak byla podpořena například existencí bakteriofága CTX-Phi, jenž v genomu nenesení gen pro pIV a k opuštění bakteriální buňky využívá sekretinový kanál svého hostitele, *V. cholerae* (Davis et al., 2000). Zatímco však geny pro podjednotky T2SS bývají uspořádány do klastrů, které se mezi jednotlivými bakteriálními druhy nemění, sekretiny využívají pro navádění do membrány různé pilotiny (Dunstan et al., 2013). To by naznačovalo, že fágový sekretin bude původnější a že se pomocné proteiny zabraňující vložení sekretinu do nesprávné membrány objevily v evoluci jako poslední (Nickerson et al., 2012). Vznik pilotinů úzce souvisí i s evolucí S-domény sekretinů. Jak ukázaly pokusy s chimérickými proteiny, umělé připojení S-domény sekretin destabilizuje – pokud však není přítomen pilotin vázající tuto doménu. V případě, že se však v systému vykytuje zároveň S-doména i pilotin, dochází ke stabilizaci sekretinu a zpřesnění jeho lokalizace (Daefler et al., 1997).

2.4 Import β -barelových proteinů do vnější mitochondriální membrány

β -barely jsou integrální membránové proteiny, které se skládají z jednotlivých β -listů propojených do cylindrické struktury pomocí vodíkových vazeb. Některé z nich jsou součástí důležitých transportních systémů, jiné mohou tvořit nespecificky propustné kanály, disponovat enzymatickou aktivitou či sloužit jako toxiny (Wimley, 2003). Vyskytují se výlučně ve vnější membráně gramnegativních bakterií a organel endosymbiotického původu, tedy mitochondrií a chloroplastů (Ulrich and Rapaport, 2015).



Obrázek 5: Mechanismus skládání β -barelů ve vnější mitochondriální membráně. Protein prochází z cytozolu přes kanál Tom40. V mezipembránovém prostoru je rozpoznán Tim proteiny a naveden k SAM komplexu, který zajistí jeho inserci do vnější membrány. Převzato z Höhr et al., 2015

Bakteriální β -barelové proteiny využívají pro transport tzv. BAM dráhy. Protein směřovaný do vnější bakteriální membrány je transportován obecnou sekretorickou drahou do periplazmatického prostoru (Huysmans, 2016). Zde se naváže na některý z chaperonů specifických pro BAM dráhu a s jeho pomocí je naveden k BAM komplexu (Sklar et al., 2007). Ten se u *E. coli* skládá z integrálního

membránového proteinu BamA a čtyř lipoproteinů. Existují dvě hlavní hypotézy, jak BamA, který je sám β -barelem, asistuje vkládání proteinu do membrány – buď se během inserce podélně otevírá a nechá substrát do membrány vycestovat, nebo dovolí proteinu, aby se do membrány zanořil těsně vedle něj (Huysmans, 2016).

V průběhu evoluce se geny pro většinu mitochondriálních proteinů přesunuly do jádra. V mitochondriích zůstalo kódováno přibližně 1% z mitochondriálního proteomu, většina proteinů tak do nich musí být importována (Timmis et al., 2004). Eukaryotické β -barelové proteiny by se teoreticky mohly vkládat z cytoplazmy přímo do vnější mitochondriální membrány, zachovávají však stejnou orientaci vkládání, jaká se vyskytuje v bakteriích (Höhr et al., 2015). Na obrázku č. 5 je schematicky znázorněna cesta β -barelových proteinů do vnější membrány mitochondrií. Ty nejdříve procházejí skrz Tom40, hlavní importní kanál vnější mitochondriální membrány. V mezipembránovém prostoru jsou pak rozpoznány dvěma komplexy malých Tim proteinů,

Tim9/Tim10 a Tim8/Tim13, které jsou nezbytné pro navedení budoucího membránového proteinu k SAM (sorting and assembly machinery) komplexu (Wiedemann et al., 2004). Ten zajišťuje vlastní inzerci proteinu do lipidové dvojvrstvy. Skládá se ze tří podjednotek – Sam50, Sam37 a Sam35 (Ishikawa et al., 2004; Kozjak et al., 2003). Sam50 je β -barelovým proteinem vnější membrány a zároveň homologem bakteriálního BamA (Gentle et al., 2004). Je schopen zajistit inzerci nejen mitochondriálních, ale i některých bakteriálních β -barelů. Lze tedy předpokládat, že oba tyto proteiny jsou vysoce konzervovány nejen strukturně, nýbrž i funkčně (Kozjak-Pavlovic et al., 2011). Sam35 však hraje neméně důležitou roli – účastní se rozlišování toho, který protein má být SAM komplexem integrován do membrány. Váže tzv. β -signál, konzervovaný aminokyselinový motiv, nacházející se na C-konci všech β -barelových proteinů (Kutik et al., 2008).

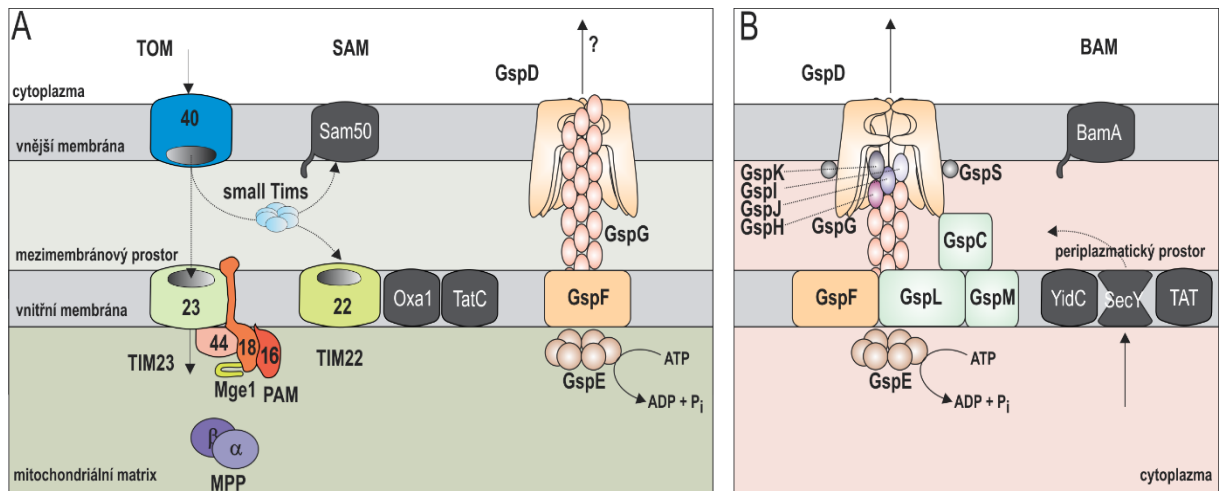
2.5 T2SS v mitochondriích eukaryot

Pomocí bioinformatických studií bylo v naší laboratoři zjištěno, že v genomech některých protistů je kódováno několik podjednotek T2SS – sekretin, sekreční ATPáza, pseudopilin a jeden z proteinů komplexu cytoplazmatické membrány, GspF. Tyto geny byly objeveny u *Naegleria gruberi*, *Naegleria fowleri*, *Neovahlkampfia damariscottae*, *Reclinomonas americana*, *Andalucia godoyi*, *Malawimonas jakobiformis* a *Malawimonas sp. str. 249*. Většina těchto organismů spadá do superskupiny Excavata, konkrétně mezi Discoba, v rámci této skupiny však patří do různých vývojových větví - rody *Reclinomonas* a *Andalucia* mezi Jakobida, *Naegleria* a *Neovahlkampfia* pak mezi Heterolobosea. Poslední z uvedených rodů, *Malawimonas*, je z evolučního hlediska poněkud problematický. Zpočátku byl podle morfologie řazen mezi jakobidy, nejspíše však nespadá ani do superskupiny Excavata (Hampl et al., 2009; Katz and Grant, 2015).

Ačkoliv tyto rody nejsou blízce příbuzné, podjednotky T2SS u nich mají pravděpodobně společný evoluční původ. U *N. gruberi* bylo navíc prokázáno, že tyto proteiny lokalizují do mitochondrie. Mohlo by se tedy jednat o pozůstatek po původním bakteriálním endosymbiontovi. Pokud by si navíc eukaryotický sekreční systém zachoval svou původní funkci i orientaci, tedy export proteinů přes vnější membránu, šlo by o zcela unikátní transportní dráhu. Jak ukazuje obrázek č. 6, mitochondrie těchto prvoků by pak obsahovaly kombinaci původních bakteriálních a nově vzniklých eukaryotních transportních systémů.

Sekretiny z bakteriálního T2SS obsahují C-koncovou doménu, formující vlastní membránový pór, a N-koncové domény, které tvoří periplazmatický vestibul kanálu. U mitochondriálních sekretinů došlo k oddělení těchto dvou domén. V eukaryotním genomu jsou tedy sekretiny

kódovány jako dva samostatné proteiny – GspD, jež obsahuje konzervovanou sekretinovou doménu, a GspND, homologní k N-koncovým doménám bakteriálního sekretinu.



Obrázek 6: Srovnání T2SS u *Naegleria sp.* (A) a gramnegativních bakterií (B). U *N. gruberi* byly objeveny pouze čtyři z podjednotek T2SS – sekretin, pseudopilin, sekreční ATPáza a GspF. Pokud by však byl tento zjednodušený T2SS funkční, vyskytoval by se u těchto prvoků zároveň s transportními systémy typickými pro mitochondrie, jako je transportér vnější (TOM) a vnitřní mitochondriální membrány (TIM). Transportní komplexy s prokázaným bakteriálním původem jsou v obrázku vyznačeny černou barvou. Vytvořeno podle Korotkov et al., 2012.

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo ze strukturního a funkčního hlediska charakterizovat eukaryotický sekretin z *Naegleria gruberi* a *Malawimonas sp.* str. 249 a porovnat jeho vlastnosti s vlastnostmi sekretinu bakteriálního.

Praktické cíle:

1. Charakterizovat strukturu eukaryotního sekretinu pomocí bioinformatických metod.
2. Otestovat schopnost eukaryotického sekretinu tvořit multimery.
3. Sledovat import sekretinu do izolovaných mitochondrií *Saccharomyces cerevisiae* a *N. gruberi*.
4. Popsat interakce sekretinu z *N. gruberi* s ostatními podjednotkami eukaryotického T2SS pomocí kvasinkového dvouhybridního systému.

4 Materiál a metody

4.1 Bioinformatické metody

4.1.1 Alignment proteinových sekvencí

Alignment vybraných proteinových sekvencí byl vytvořen pomocí online verze programu MAFFT (Kato et al., 2002). Byly použity veškeré výchozí parametry a skórovací matrice BLOSUM62. Alignment byl poté do grafické podoby upraven v programu Bioedit.

4.1.2 Fylogenetická analýza proteinové sekvence

Pro fylogenetickou analýzu bylo použito 34 aminokyselinových sekvencí. Alignment těchto sekvencí byl vytvořen v programu MEGA7 (Kumar et al., 2016), pomocí algoritmu MUSCLE (Edgar, 2004) a manuálně upraven. Bylo ponecháno 228 pozic. Fylogenetický strom byl vytvořen metodou maximální pravděpodobnosti založenou na modelu LG (Le and Gascuel, 2008). Pro modelování evolučních rozdílů mezi pozicemi byla použita Gamma distribuce o 5 kategoriích a bylo provedeno 500 bootstrapových opakování. Všechny pozice obsahující mezery byly eliminovány.

Grafická podoba fylogenetického stromu byla vytvořena v programu FigTree.

4.1.3 Predikce struktury proteinu

Struktura fúzního proteinu skládající se z C- a N-koncové domény eukaryotického sekretinu byla predikována za použití serveru I-TASSER, který vytváří modely proteinů na základě strukturně podobných templátů z Protein Data Bank (Yang and Zhang, 2015).

Struktura konzervovaných motivů a potenciálního sekretinového komplexu byla predikována pomocí programu Swiss-Model, jenž pracuje na principu homologního modelování (Biasini et al., 2014).

4.2 Kultivace organismů a používaná média

4.2.1 *Escherichia coli*

Pro namnožení rekombinantních plazmidů byl používán kmen *E. coli* TOP10. Tyto bakterie byly pěstovány při 37°C v tekutém LB médiu nebo na LB plotnách se selekčním antibiotikem specifickým pro daný plazmid – ampicilinem o finální koncentraci 100 µg/ml nebo kanamycinem o finální koncentraci 50 µg/ml.

K detekci proteinu PspA sloužil kmen *E. coli* PAP105, obsahující tetracyklinovou rezistenci. Bakterie PAP105 byly pěstovány při 30 či 37°C, buď na LB plotnách, nebo v tekutém LB médiu. Média obsahovala tetracyklin o finální koncentraci 10 µg/ml a selekční antibiotikum příslušné pro plazmid, kterým byly bakterie transformovány (ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml nebo kanamycin o finální koncentraci 50 µg/ml).

K testování toxicity mitochondriálního sekretinu byl použit expresní kmen *E. coli* BL21 (DE3), který byl pěstován při 37°C na LB plotnách nebo v tekutém LB médiu se selekčním antibiotikem pro plazmid, v němž byl sekretin zaklonován – ampicilinem o finální koncentraci 100 µg/ml nebo kanamycinem o finální koncentraci 50 µg/ml.

Expese sekretinu pro purifikaci probíhala v kmenech BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 Tuner, Rosetta Gami 2 (DE3) a C43. Tyto bakterie byly pěstovány při 37°C na LB plotnách či v LB médiu s kanamycinem (o finální koncentraci 50 µg/ml), k selekci bakterií BL21 (DE3) pLysS a Rosetta Gami 2 (DE3) sloužil chloramfenikol o finální koncentraci 34 µg/ml.

Transformované bakterie byly uchovávány v tekutém LB médiu s 20% glycerolem při -80°C.

Média

LB médium

LB (Sigma)	20 g
dH ₂ O	500 ml

LB plotny

LB s agarem (Sigma)	17 g
dH ₂ O	500 ml

Antibiotika

- Ampicilin – zásobní roztok ampicilinu (Sigma) v dH₂O o koncentraci 100 mg/ml
- Kanamycin – zásobní roztok kanamycinu (Sigma) v dH₂O o koncentraci 50 mg/ml
- Tetracyklin – zásobní roztok tetracyklinu (Sigma) v ethanolu o koncentraci 10 mg/ml
- Chloramfenikol – zásobní roztok chloramfenikolu (Sigma) v dH₂O o koncentraci 50 mg/ml

4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Pro izolaci mitochondrií byly použity kvasinky kmene YPH499. Pro kvasinkový dvouhybridní systém (Yeast Two Hybrid, Y2H) byl použit kmen AH109. Kvasinky *S. cerevisiae* byly pěstovány při

30°C v tekutých médiích nebo na plotnách s antibiotikem proti kontaminaci bakteriemi (ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml nebo kanamycin o finální koncentraci 50 µg/ml).

Kvasinky *S. cerevisiae* byly uchovávány v YPD médiu s 20% glycerolem při -80°C. Z těchto zamražených vzorků byly kvasinky v případě potřeby naočkovány na YPD plotny, pěstovány při 30°C a přeočkovávány každé 2 – 3 týdny. Kvasinkový kmen YPH499 byl pro izolaci mitochondrií pěstován v YPG médiu. Kvasinky AH109 byly před transformací kultivovány v 2x YPAD médiu, selekce správně transformovaných kvasinek pro Y2H probíhala na SD -Trp/-Leu plotnách nebo v SD -Trp/-Leu médiu a k detekci proteinových interakcí pomocí Y2H byly používány SD -Trp/-Leu/-His plotny.

Média

YPG médium

Yeast extract (Oxoid)	10 g
Pepton (Oxoid)	20 g
Glycerol (Lach-Ner)	30 ml
dH ₂ O	do 1 l

YPG médium bylo pufrováno laktátem do pH = 5

YPD plotny

Yeast extract	5 g
Pepton	10 g
D-glukóza (Sigma)	10 g
Agar (Amresco)	6 g
dH ₂ O	500 ml

2x YPAD médium

Yeast extract	8 g
Pepton	10 g
D-glukóza (Sigma)	16 g
Adenin-hemisulfát (Sigma)	40 g
dH ₂ O	400 ml

SD -Trp/-Leu médium

Yeast nitrogen base (Sigma)	3,35 g
Drop out -Trp/-Leu (Sigma)	0,77 g
D-glukóza	10 g
dH ₂ O	500 ml

SD -Trp/-Leu plotny

Yeast nitrogen base	3,35 g
Drop out -Trp/-Leu (Sigma)	0,77 g
D-glukóza	10 g
Agar	6 g
dH ₂ O	500 ml

SD -Trp/-Leu/-His plotny (detekce proteinových interakcí v Y2H)

Yeast nitrogen base	3,35 g
Drop out -Trp/-Leu/-His (Sigma)	0,73 g
D-glukóza	10 g
Agar	6 g
dH ₂ O	500 ml

4.2.3 *Naegleria gruberi*

Kultura *N. gruberi* byla použita pro izolaci mitochondrií. Buňky byly kultivovány při 27°C v médiu M7.

M7 médium

L-methionin (Sigma)	45 mg
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (Sigma)	1,26 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0,362 g
Yeast extract	5 g
D-glukóza	5,4 g
Fetální bovinní sérum	100 ml
dH ₂ O	900 ml

Fetální bovinní sérum bylo před přidáním do média inaktivováno po dobu 30 min při 56°C.

<i>Naegleria gruberi</i> GspD + His-tag, NcoI , HindIII	
forward	AGCT CCATGG ATGGAAAACACCCTGCAACCG
reverse	AGCT AAAGCTTTT AATGGTGGTGGTGATGATGATCATTTCAGGCTCGC

2. Primery pro tvorbu konstruktů pro test toxicity sekretinu

<i>Malawimonas sp. str. 249</i> GspD, NdeI , XhoI	
forward	AGCT CATATGG CGAGCTGCAGCGCGGAG
reverse	AGCT CTCGAGTTA ATGCAGCGCGGTTTGCACCGG

<i>Naegleria gruberi</i> GspD, NdeI , XhoI	
forward	AGCT CATATGG AAAACACCCTGCAACCG
reverse	AGCT CTCGAGTTA ATCATTTCAGGCTCGC

3. Primery pro tvorbu konstruktů pro in vitro translaci

<i>Malawimonas sp. str. 249</i> GspD, NdeI , BamHI	
forward	AGCT CATATGG CGAGCTGCAGCGCGGAG
reverse	AGCT GGATCCTT AATGCAGCGCGGTTTGCACCGG

<i>Naegleria gruberi</i> GspD, NdeI , BamHI	
forward	AGCT CATATGG AAAACACCCTGCAACCG
reverse	AGCT GGATCCTT AATCATTTCAGGCTCGC

4. Primery pro tvorbu konstruktů pro Y2H

<i>Naegleria gruberi</i> GspD, NdeI , BamHI	
forward	AGCT CATATGG AAAACACCCTGCAACCG
reverse	AGCT GGATCCTT AATCATTTCAGGCTCGC

<i>Naegleria gruberi</i> GspDN, NdeI , BamHI	
forward	AGCT CATATG AGTAAACAACAACT
reverse	AGCT GGATCCTT AAAAATTGAAATTATTGT

<i>Naegleria gruberi</i> GspG1, NdeI , BamHI	
forward	ACT GCATATG CATCATTTGAGTATGATTGAA
reverse	ACT GGATCCTT ATTCTCCACCACCTGATGC

<i>Naegleria gruberi</i> GspZ, NdeI, BamHI	
forward	AGCT CATATGA AGGCTTTGAGTGATAAA
reverse	AGCT GGATCCTT ATTTGGTAATCCACCAATT

Složení PCR reakce

5x Q5 reakční pufr (NEB)	5 µl
10mM dNTPs	0,5 µl
100µM forward primer	1,25 µl
100µM reverse primer	1,25 µl
templátová DNA	1 µl
5x Q5 GC enhancer (NEB)	5 µl
Q5 DNA polymeráza (NEB)	0,25 µl
dH ₂ O	do 25 µl

5x Q5 GC enhancer byl použit pouze u genů, které obsahovaly více než 50% GC párů.

PCR program

	teplota	čas
1.	98°C	30 s
2.	98°C	10 s
3.	60°C	20 s
4.	72°C	40 s
5.	30x opakování kroků 2 – 4	
6.	72°C	3 min
7.	4°C	∞

Pokud byla templátem pro amplifikaci genu genomová DNA, byl použit přednostně tzv. touchdown PCR program – teplota nasedání primerů v kroku č. 3 byla v prvním cyklu 65°C a s každým dalším cyklem se snižovala o 1°C. V případě, že se gen nepodařilo naamplifikovat pomocí těchto základních programů, byla provedena optimalizace nasedání primerů nebo prodloužení některých kroků.

Po proběhnutí PCR programu byl celý objem reakce analyzován na horizontální DNA elektroforéze v 1% agarózovém gelu (Serva), který obsahoval interkalační barvivo SYBR Safe (Invitrogen). Na gel byl nanesen jak vzorek smíchaný se 6x koncentrovaným vzorkovým pufrům (Thermo Fisher Scientific), tak i žebříček GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) obsahující DNA fragmenty o definované velikosti. Díky barvivo SYBR Safe bylo následně možno zobrazit DNA fragmenty na UV-transiluminátoru. Byl-li v gelu dobře patrný fragment žádané délky,

byl z gelu vyříznut a odtud následně izolován pomocí kitu High Pure PCR Product Isolation Kit (Roche).

4.5 Klonování DNA fragmentů

Přečištěný fragment byl naštěpen pomocí vybraných restrikčních enzymů (NEB), jejichž cílová restrikční místa byla zanesena do sekvence pomocí primerů. Stejnými enzymy byl štěpen i plazmid, do něžž bylo třeba fragment vložit. Restrikční reakce byla namíchána do 50 μ l dle protokolu, s pufrům optimálním pro oba restrikční enzymy. Při štěpení inzertu byl využit celý objem přečištěné DNA, zatímco vektoru bylo přidáno méně, 1 – 2 μ l, dle koncentrace daného plazmidu.

Plazmid bylo třeba z reakce izolovat na horizontální DNA elektroforéze v 1% agarózovém gelu, vyříznout a přečistit pomocí kitu High Pure PCR Product Isolation Kit. Oproti tomu inzert byl pouze přečištěn pomocí tohoto kitu – nežádoucí uvolněné části byly pouze několik párů bazí dlouhé a byly takto snadno odstraněny.

Inzert byl do vektoru zaligován pomocí T4 DNA ligázy. Reakce byla namíchána podle protokolu tak, aby poměr konců inzertu ku vektoru byl přibližně 3:1. Pro odhadnutí objemu rozpuštěné DNA potřebného k namíchání ligační reakce bylo malé množství inzertu a vektoru puštěno na 1% agarózový gel. Reakce byla inkubována přes noc v 16°C a následně použita k transformaci kompetentních bakterií TOP10.

4.6 Transformace *E. coli*

Na ledu byly rozmrazeny chemicky kompetentní bakterie: TOP10 v případě klonování DNA fragmentů, PAP105 při testu na přítomnost proteinu PspA nebo BL21 (DE3) tehdy, když bylo třeba v bakteriích exprimovat rekombinantní protein. K bakteriím byla přidána buď celá ligační směs, nebo 1 – 2 μ l již izolovaného plazmidu (cca 100 ng DNA). Tato směs byla ponechána 15 min na ledu a během této doby několikrát promíchána. Poté bakterie prošly tepelným šokem – byly umístěny na 30 s do 42°C – a následně na 2 minuty vráceny zpět na led. Dále bylo přidáno 250 μ l SOC média a bakterie byly třepány na třepačce při 37°C a 220 RPM. Po 60 minutách třepání byly bakterie rozetřeny na LB plotny spolu s patřičným selekčním antibiotikem a ponechány přes noc při 37°C.

4.7 Testování bakterií na přítomnost žádaného plazmidu

Několik narostlých bakteriálních kolonií bylo testováno na přítomnost plazmidu s vloženým inzertem. Kolonie byly seškrábnuty špičkou pipety a rozmíchány v 50 μ l sterilní dH₂O. 11,5 μ l vzniklé bakteriální suspenze bylo odebráno do samostatných mikrozkušavek. Tyto bakterie byly rozbity rychlou změnou teploty (deset cyklů střídání 94°C 15 s a 45°C 15 s) a uvolněná DNA poté použita

jako templát pro kontrolní PCR. K bakteriím bylo přidáno 12,5 µl směsi EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Clontech), 0,5 µl forward a 0,5 µl reverse primeru. Výsledek byl analyzován na horizontálním agarózovém gelu.

Program pro kontrolní PCR

	teplota	čas
1.	94°C	5 min
2.	94°C	30 s
3.	55°C	1 min
4.	72°C	1 min 30 s
5.	30x opakování kroků 2 – 4	
6.	72°C	5 min
7.	4°C	∞

Zbylá bakteriální suspenze z kolonií s pozitivním výsledkem byla nasazena do 5 ml LB média s příslušným antibiotikem a umístěna na třepačku, kde byla ponechána přes noc při 37°C a 220 RPM. Druhý den bylo z kultur odebráno 750 µl pro případné uskladnění transformovaných bakterií a zbytek byl stočen na centrifuze 2 min při 6000 x g. Plazmidy z bakterií byly izolovány pomocí High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid).

Plazmidy byly dále testovány pomocí kontrolní restrikce. Reakce proběhla v pufru FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific) a byla inkubována 30 min ve 37°C. Vzorky byly analyzovány na horizontální DNA elektroforéze. Pokud se z izolovaného plazmidu vyštěpil fragment žádané délky, byl výsledek ověřen sekvenováním.

Složení kontrolní restrikční reakce

plazmid	5 µl
FastDigest Green Buffer	2 µl
enzym 1	1 µl
enzym 2	1 µl
dH ₂ O	11 µl

4.8 SDS-PAGE

Proteinové vzorky byly analyzovány na 13,5 % polyakrylamidovém gelu pomocí denaturující elektroforézy v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). Do jamek gelu o tloušťce 0,75 mm bylo

naneseno 20 μ l vzorků a také 5 μ l proteinového standardu PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly rozdělovány pod napětím 90 – 160 V.

Gely byly přes noc barveny Coomassie Brilliant Blue a následně odbarvovány roztokem kyseliny octové a ethanolu, nebo vyvolány metodou western blot.

Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue (Serva)	500 mg
Kyselina octová (Lach-Ner)	100 ml
Ethanol (Lach-Ner)	450 ml
dH ₂ O	450 ml

Odbarvovací roztok

Kyselina octová	100 ml
Ethanol	250 ml
dH ₂ O	650 ml

4.9 Western blot

Proteiny z gelu byly pomocí elektrického proudu (1,5 mA/cm²) technikou western blotu přeneseny na nitrocelulóзовou blotovací membránu (Sigma). Přítomnost proteinů na membráně byla ověřena dočasným obarvením červení Ponceau S (Sigma). Proteiny byly blokovány alespoň 1 hod roztokem 5% odtučněného mléka a Tween 20. Následně byla membrána zatavena do fólie s malým množstvím blokovacího roztoku a primární protilátkou (vážící buď protein samotný, nebo připojenou značku, např. HIS-tag) ve správném ředění a ponechána na kývačce po dobu 1 hod. Poté byl blot 3 x 10 min promýván blokovacím roztokem a opět zataven do fólie s malým množstvím blokovacího roztoku a sekundární protilátkou (vážící protilátku primární). Takto byl inkubován 1 hod na kývačce a poté byl promýván 3 x 10 min v 1x PBS. Byla-li použita sekundární protilátka obsahující alkalickou fosfatázu, byl blot následně vyvolán přidáním substrátu pro tento enzym. Druhou možností bylo vyvolání pomocí křenové peroxidázy.

Blotovací roztok

10x SDS (Sigma)	100 ml
Methanol (Lach-Ner)	200 ml
dH ₂ O	700 ml

Blokovací roztok

1x PBS	300 ml
Sušené odtučněné mléko (Lactino)	15 g
20x PBS Tween 20 (Sigma)	750 μ l

4.10 Detekce PspA odpovědi

4.10.1 Příprava kompetentních bakterií PAP105

Bakterie *E. coli* kmene PAP105 byly rozetřeny na LB plotnu s 30 μ l tetracyklinu o koncentraci 10 mg/ml a inkubovány přes noc při 37°C. Z plotny byla vybrána jedna kolonie, nasazena do 5 ml tekutého LB média s 5 μ l tetracyklinu a třepána přes noc na třepačce při 37°C a 220 RPM. Další den bylo 2,5 ml kultury přidáno k 250 ml čistého LB média a znovu umístěno na třepačku. Když se hodnota optické denzity (OD_{600}) kultury pohybovala mezi 0,4 a 0,6, byly bakterie stočeny 10 min na 5000 x g. Pelet byl resuspendován v 50 ml ledově vychlazeného 0,1M roztoku $MgCl_2$ a stočen 10 min při 3000 x g. Poté byl pelet resuspendován v 50 ml ledově vychlazeného 0,1M roztoku $CaCl_2$, ponechán 20 min na ledu a znovu stočen 10 min při 3000 x g. Následně byl pelet resuspendován v 10 ml ledového uchovávacího roztoku (0,1M $CaCl_2$ se 14% glycerolem). Poté byly bakterie rozděleny po 200 μ l do sterilních mikrozkušavek, ihned zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80°C. Příprava kompetentních bakterií probíhala ve sterilním prostředí a na ledu.

Zásobní roztoky

1M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Sigma)

1M $CaCl_2$ (Sigma)

Uchovávací roztok

1M $CaCl_2$	5 ml
80% glycerol (Lach-Ner)	8,25 ml
dH_2O	do 50 ml

4.10.2 Transformace a kultivace PAP105

Připravené kompetenční buňky byly transformovány pomocí plazmidů pCHAP7010 s genem pro GspD z *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 a dále plazmidem pET42b obsahujícím GspD z *M. sp.* str. 249. Jako pozitivní kontrola byl použit plazmid pCHAP3671 s PuID, jehož exprese prokazatelně spouští produkci PspA. Transformované bakterie byly rozetřeny na LB plotnu s 500 μ l 50% roztoku glukózy,

30 μ l tetracyklinu a 30 μ l ampicilinu nebo kanamycinu (podle druhu rezistence, kterou obsahoval daný plazmid) a ponechány přes noc ve 37°C.

Z narostlých ploten bylo vybráno vždy po jedné kolonii, která byla nasazena do 5 ml LB média s příslušnými antibiotiky. Navíc byly do 5 ml LB s tetracyklinem nasazeny prázdné, netransformované buňky PAP105, sloužící jako negativní kontrola. Bakterie byly třepány přes noc při 30°C a 220 RPM.

Další den byly bakterie naředěny do 10 ml čistého LB média tak, aby hodnota OD₆₀₀ byla kolem 0,15, a umístěny na 6 hod na třepačku temperovanou na 30°C. K bakteriím transformovaným plazmidem pET42b bylo po 2 hod růstu přidán IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, Sigma) na finální koncentraci 1 mmol/l.

4.10.3 Příprava buněčného lyzátu na SDS-PAGE

5 ml takto narostlých buněk bylo stočeno 2 min při 6000 x g. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 200 μ l 1x koncentrovaného vzorkového pufru.

4.11 Purifikace sekretinu M249 GspD z *E. coli*

Bakterie vybraných expresních kmenů *E. coli* byly transformovány vektorem pET42b obsahujícím GspD z *M. sp.* str. 249 a signální peptid PelB. Z narostlých ploten byly nasazeny do 50 μ l LB média s kanamycinem a třepány přes noc na třepačce při 37°C a 220 RPM. Druhý den byla prekultura smíchána s 5 l LB média s kanamycinem a třepána do OD₆₀₀ = 0,4 – 0,8. Poté byl přidán IPTG na celkovou koncentraci 1 mmol/l. Po indukci exprese byla kultura třepána za stejných podmínek další 4 hod. Bakterie byly stočeny 15 min při 6000 x g a 4°C. Pro kontrolu obsahu proteinů byly z peletu odebrány 3 μ l, které byly smíchány se 40 μ l vzorkového pufru pro SDS PAGE a inkubovány v bločku 10 min při 80°C.

Pomocí metody western blot byl vybrán bakteriální kmen produkující největší množství sekretinu – BL21 pLysS. Pelet těchto buněk byl resuspendován ve 20 ml roztoku obsahujícího 20mM Tris, 5 mM EDTA, inhibitory proteáz a DNÁzu o finální koncentraci 5 μ g/ml. Poté byly bakterie sonikovány na sonikátoru Q125 (Qsonica) po dobu 3 minut (1 s puls, 1 s pauza) s amplitudou 60%. Suspenze byla stočena 30 min při 4000 x g a 4°C. Supernatant byl přelit do čisté zkumavky a znovu stočen, 15 min za stejných podmínek. Membrány byly poté sedimentovány na ultracentrifuze při 100000 x g po dobu 2 hod. Následně byly promyty ve 20 ml 20mM Tris (pH = 7,4) s inhibitory proteáz a znovu stočeny za stejných podmínek. Promývání bylo poté opakováno ještě jednou. Pelet membrány byl resuspendován ve 2 ml 20mM TRis (pH = 7,4) s inhibitory proteáz.

Byl stanoven obsah proteinů v suspenzi pomocí Bio-Rad Protein Assay Kit. Vzorek byl poté naředěn do koncentrace proteinů 1 mg/ml v TZN pufru obsahujícím Zwittergent 3-14. Pro solubilizaci byly resuspendované membrány ponechány 2 hod na kývačce při 4°C. Zbytky membrán byly stočeny 1 hod na ultracentrifuze při 100000 x g a 4°C. Supernatant byl přes noc inkubován na kývačce při 4°C se 2 ml agarózových Ni-NTA částic. Druhý den byl vzorek přenesen na kolonu. Jednotlivé frakce byly jímány do zvláštních zkumavek a ponechány pro následnou analýzu. Po prokapání první frakce, „flow-through“, byly agarózové částice promyty 50 ml promývacího pufru. Tato frakce byla označena jako „wash“. Následně bylo přidáno 250 µl elučního pufru. Takto bylo získáno 6 elučních frakcí, E1 – E6. Byly odebrány alikvóty jednotlivých frakcí ke stanovení obsahu proteinů pomocí western blotu.

Použité roztoky

TZN pufr: 50 mM Tris (pH = 7,4), 1% Zwittergent 3-14, 250mM NaCl

Promývací pufr: 50mM Tris (pH = 7,4), 250mM NaCl, 50mM imidazol, 1% Zwittergent 3-14

Eluční pufr: 50mM Tris (pH = 7,4), 250mM NaCl, 250mM imidazol, 1% Zwittergent 3-14

4.12 Test toxicity sekretinu

4.12.1 Kultivace bakterií BL21 (DE3) pro růstové pokusy

Bakterie kmene BL21 (DE3) byly transformovány plazmidem pET22b s geny pro GspD z *N. gruberi* a *M. sp. str 249* a rozetřeny na LB plotny s 500 µl 50% glukózy a 30 µl ampicilinu. Do druhého dne byly inkubovány při 37°C. Ráno byla z narostlých ploten nasazena vždy 1 kolonie do 20 ml LB média předeřátého na 37°C. Byl přidán ampicilin na finální koncentraci 100 µg/ml a 800 µl 50% glukózy. Bakterie byly umístěny na třepačku do 37°C a třepány při 220 RPM. Když se hodnota OD₆₀₀ kultur nacházela v intervalu mezi 0,5 a 1, byly bakterie naředěny do 100 ml čistým a předeřátým LB médiem na OD₆₀₀ kolem 0,1. Každá bakteriální kultura poté byla rozdělena po 50 ml do dvou různých nádob. Jedna vždy sloužila jako negativní kontrola, exprese sekretinu zde neprobíhala. Do druhé nádoby byl přidán IPTG na koncentraci 1 mmol/l, čímž se v bakteriích indukovala exprese GspD. Kultury byly třepány při 37°C a 220 RPM. Každých 15 min byly odebírány 1 ml alikvóty pro měření OD₆₀₀.

4.12.2 Barvení bakterií pro fluorescenční mikroskopii

K odlišení živých a mrtvých bakterií pod mikroskopem a toho, zda exprese sekretinu pouze zastavuje růst bakteriální kultury, nebo způsobuje hynutí bakterií, byl použit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific). Tento kit obsahuje dvě fluorescenční barviva,

propidium jodid a SYTO 9. SYTO 9 emituje zelené světlo (maximum spektra při 500 nm) při excitaci modrým světlem (480 nm) a dokáže vstoupit do všech buněk. Propidium jodid oproti tomu vstupuje pouze do buněk s narušenou membránou. Emituje červené světlo (635 nm) při excitaci zeleným světlem (495 nm). Propidium jodid by měl navíc oslabovat schopnost SYTO 9 vstupovat do buněk, takže zelená fluorescence mrtvých bakterií je méně jasná než fluorescence buněk živých.

Bakterie kmene BL21 (DE3) byly transformovány plazmidem pET22b s geny pro GspD z *N. gruberi* a *M. sp.* str 249 a rozetřeny na LB plotny s 500 μ l 50% glukózy a 30 μ l ampicilinu. Do druhého dne byly inkubovány při 37°C. Z narostlých ploten byla vybrána jedna kolonie, nasazena do 5 ml tekutého LB média s 5 μ l ampicilinu a 200 μ l 50% roztoku glukózy a třepána přes noc na třepačce při 37°C a 220 RPM. Další den byly bakterie naředěny do 20 ml LB s ampicilinem a 1% glukózou na $OD_{600} = 0,1$ a třepány do té doby, než naměřená hodnota OD_{600} vzrostla na 0,4. Poté byly rozděleny po 10 ml do dvou samostatných nádob. V jedné z nádob byla indukována exprese GspD pomocí 1mM IPTG, druhá sloužila jako negativní kontrola. Bakterie byly třepány dalších 30 min. Poté byl z negativní kontroly odebrán 1 ml kultury a patřičné množství (2 – 3 ml) z exprimující kultury (podle hodnoty OD_{600} tak, aby vzorek obsahoval přibližně stejné množství bakterií). Vzorky byly stočeny 2 min při 6000 x g a pelety resuspendovány ve 250 μ l 1x PBS.

Podle protokolu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit byly roztoky fluorescenčních barviv smíchány v poměru 1:1. Tato směs byla poté přidána k bakteriím v ředění 3 μ l barvy na 1 ml bakteriální suspenze. Vzorky byly dobře promíchány a inkubovány 15 min za pokojové teploty ve tmě.

Na podložní sklíčko bylo naneseno 10 μ l bakteriální suspenze a promícháno s 10 μ l rozehráté 2% low-melting agarózy (Sigma). Na vzorek bylo přiloženo krycí sklíčko a preparát byl ihned pozorován na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti.

4.12.3 Barvení bakterií pro průtokovou cytometrii

Bakterie kmene BL21 (DE3) byly transformovány plazmidem pET42b obsahujícím GspD z *M. sp.* str. 249 a dále pěstovány jako bakterie při přípravě preparátů na fluorescenční mikroskop (viz předchozí kapitola). Po přidání IPTG do jedné z kultivačních nádob byly buňky třepány 45 min. Z obou kultur byly odebrány 2 ml a stočeny 2 min na 6000 x g. Následně byly bakterie exprimující GspD resuspendovány ve 2 ml 1x PBS a buňky negativní kontroly ve 4 ml 1x PBS (to proto, že jejich koncentrace v médiu byla přibližně dvojnásobná). Poté byla přeměřena OD_{600} a bakterie byly naředěny na koncentraci přibližně $1 \cdot 10^6$ buněk/ml (tato koncentrace odpovídá hodnotám OD_{600} mezi 0,005 a 0,01).

Do měřících kyvet pro průtokový cytometr bylo odebráno 0,5 ml takto naředěných bakterií. Ty byly obarveny jednou, nebo oběma fluorescenčními barvivy podle protokolu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (tj. 1,5 μ l každého z nich na 1 ml suspenze), a inkubovány 5 min ve tmě. Vzorke byly měřeny na průtokovém cytometru BD LSRFortessa Cell Analyzer. Pro kalibraci přístroje byla použita také neobarvená suspenze bakterií.

4.13 Import proteinu do mitochondrií

4.13.1 *In vitro* translace

Pro import do mitochondrií byl sekretin *in vitro* nasyntetizován pomocí kitu PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB). Geny pro GspD z *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 byly zaklonovány do kontrolního vektoru s dihydrofolát reduktázou (DHFR) a T7 promotorem. Dále byl zaklonován gen Su9 (fúzní protein složený ze signálního peptidu podjednotky 9 kvasinkové ATPázy a DHFR), který byl použit jako pozitivní kontrola.

Translační reakce byly připravovány na ledu ve sterilních mikrozkušavkách. Následně byly inkubovány 2 hod ve 37°C.

Složení translační reakce

Roztok A	10 μ l
Roztok B	7,5 μ l
RNAasin RNase Inhibitor (Promega)	1 μ l
³⁵ S-methionin	1 μ l
Templátová DNA	250 ng
dH ₂ O bez nukleáz	do 25 μ l

4.13.2 Izolace mitochondrií *S. cerevisiae*

Mitochondrie byly izolovány z kmene *S. cerevisiae* YPH499. Byla vypěstována prekultura kvasinek ve 100 ml YPG média. Ta byla druhý den nasazena do 4l YPG média, na OD₆₀₀ = 0,05. Kvasinky byly kultivovány na třepačce po dobu 12 h při 30°C a 220 RPM. Když byla OD₆₀₀ = 1, byly buňky stočeny 10 min při 3000 x g, resuspendovány ve 20 μ l dH₂O a opět stočeny 5 min na 3000 x g. Poté byly buňky zváženy, resuspendovány ve 20 ml Tris-DTT pufru a inkubovány 15 min při 30°C za mírného třepání. Poté byly znovu stočeny 5 min při 3000 x g. Pelet byl resuspendován ve 20 ml sorbitolového pufru, jenž byl vytemperován na 30°C. Kvasinky byly opět stočeny, a resuspendovány v roztoku zymolýzy v předeřátém sorbitolovém pufru (na 1 g buněk 2,5 mg zymolýzy rozpuštěné

ve 2 ml sorbitolového pufru). Tato směs byla 30 min inkubována ve vodní lázni, při 30°C a za mírného třepání.

Buňky zbavené buněčné stěny byly stočeny 5 min při 3000 x g a 4°C. Poté byly umístěny na led, promyty v 15 ml vychlazeného sorbitolového pufru a stočeny 5 min při 3000 x g. Buňky byly znovu promyty, resuspendovány v 15 ml vychlazeného BB 6.0 pufru s rozpuštěnými inhibitory proteáz (Roche) a homogenizovány pomocí těsného Dounceova homogenizátoru. Stav buněk byl průběžně pozorován pod mikroskopem. Vzniklý homogenát byl stočen 5 min při 3000 x g a 4°C. Supernatant byl přelit do nové zkumavky a umístěn na led. Pelet byl resuspendován v 15 ml vychlazeného BB 6.0 pufru s inhibitory proteáz, znovu homogenizován a stočen. Oba supernatanty byly smíchány a stočeny 5 min při 4000 g a 4°C. Poté by supernatant přelit do čisté zkumavky a znovu stočen za stejných podmínek tak, aby bylo odstraněno co nejvíce kontaminujících membrán a zbytků buněčné stěny. Čistý supernatant byl stočen 10 min při 12000 x g a 4°C. Vzniklý pelet byl opatrně resuspendován v 0,5 ml vychlazeného BB 6.0 pufru (bez inhibitorů proteáz).

Poté bylo třeba přibližně určit koncentraci mitochondrií. Z toho důvodu odebráno 10 µl suspenze a naředěno 990 µl 0,6% SDS. Byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 280 nm proti blanku, který se sestával z 10 µl BB 6.0 pufru v 990 µl 0,6% SDS. Ze získaných hodnot byla poté koncentrace mitochondrií dopočítána ($A_{280} = 0,21$ odpovídá koncentraci asi 10 mg/ml v původní směsi).

Mitochondrie byly poté znovu stočeny 10 min při 12000 x g a 4°C. Pelet byl resuspendován v BB 7.4 podle stanoveného množství mitochondrií tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 25 mg/ml, a byl přidán BSA (bez mastných kyselin) do koncentrace 10 mg/ml. Rozpuštěné mitochondrie byly poté rozděleny po 10 µl do čistých mikrozkuvek a ihned mraženy v kapalném dusíku. Takto izolované mitochondrie byly skladovány v -80°C.

Použité pufrы

Tris-DTT pufr (pH = 9,4)

1M Tris-SO ₄ (Sigma, pH = 9,4)	10 ml
1M DTT (Sigma)	1 ml
dH ₂ O	do 100 ml

Tento pufr byl připravován vždy čerstvý, těsně před použitím. 1M Tris byl pufován na pH = 9,4 pomocí H₂SO₄ (Lachema).

Fosfátový pufr draselný (KPi, pH = 7,4)

1M K ₂ HPO ₄ (Sigma)	80,2 ml
1M KH ₂ PO ₄ (Sigma)	19,8 ml

1,2M Sorbitolový pufr

2,4M sorbitol	250 ml
1M KPi (pH = 7,4)	10 ml
dH ₂ O	do 500 ml

2,4M sorbitol byl rozmíchán v deionizované H₂O.

BB 6.0 pufr

2,4M sorbitol (Sigma)	200 ml
1M K ⁺ MES (Sigma, pH = 6,0)	16 ml
dH ₂ O	do 600 ml

pH K⁺MES bylo upraveno pomocí KOH.

BB 7.4 pufr

2,4M sorbitol	25 ml
1M K ⁺ HEPES (pH = 7,4)	2 ml
dH ₂ O	do 100 ml

pH K⁺HEPES bylo upraveno pomocí KOH.

4.13.3 Izolace mitochondrií z *N. gruberi*

Kultura *N. gruberi* byla nasazena do 1 litru M7 média rovnoměrně rozděleného do 4 kultivačních nádob o růstové ploše 250 cm² a ponechána při 27°C, dokud nebylo dno nádob pokryté souvislou vrstvou buněk. Buňky byly stočeny 10 min při 4°C a 1000 x g a resuspendovány v 50 ml PBS a znovu stočeny za stejných podmínek. Poté byly resuspendovány v 50 ml SM média a stočeny. Pelety byly resuspendovány ve 2 ml SM média s inhibitory proteáz (Roche) a DNázou (finální koncentrace 40 µg/ml).

Buňky byly lyzovány pomocí hypodermické jehly o tloušťce 33 G. Suspenze byla naředěna 10 ml SM média s inhibitory proteáz a DNázou a stočena 5 min při 1000 x g a 4°C. Supernatant byl přelit do nové zkumavky a stočen 5 min při 2000 x g a 4°C. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Výsledný supernatant byl stočen na ultracentrifuze, 30 min při 17000 x g a 4°C. Pelet byl resuspendován v 1 ml SM média s inhibitory proteáz a DNázou. Mitochondrie byly rozděleny do mikrozkuvek po 200 µl a stočeny 10 min při 4°C a 14000 x g. Supernatant byl odstraněn a suché pelety zamraženy při -80°C.

SM pufr	
Sacharóza	12,8 g
MOPS	0,63 g
dH ₂ O	150 ml

pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí NaOH.

4.13.4 Import sekretinu do mitochondrií

Pro sledování importu proteinu do mitochondrií v čase byly odebírány alikvóty mitochondrií po 0, 1, 2, 4, 8 a 16 min. Dále byl připraven vzorek 16*, který obsahoval mitochondrie s narušeným membránovým potenciálem. Poté bylo detekováno množství importovaného proteinu.

Nejdříve byly rozmrazeny mitochondrie (2 x 10 μ l na jednu importní řadu). Ty byly resuspendovány v 1 ml BSA importního pufru a stočeny 5 min při 10000 x g a 4°C. Mitochondrie byly resuspendovány v 900 μ l importního mixu a inkubovány 5 min ve 25°C. Bylo připraveno 7 mikrozkuvek se 100 μ l 2x CCCP STOP pufru, které byly označeny čísly pro jednotlivé časy a umístěny na led, a 1 mikrozkuvka s 1 μ l AVO mixu, která byla označena 16* a umístěna do 25°C. Byly smíchány 2 μ l importovaného substrátu (translační reakce) s 2 μ l 8M urey. Do zkumavek s časy 0 a 16* bylo odebráno 100 μ l mitochondrií a adekvátní díl (tj. 0,5 μ l) substrátu s ureou. Do prázdné mikrozkuvky bylo odebráno 0,2 μ l substrátu. Zbývající substrát smíchaný s ureou byl přidán k ostatním mitochondriím, které byly posléze inkubovány ve 25°C po dobu 16 min. V čase 1, 2, 4, 8 a 16 min bylo odebíráno vždy 100 μ l do příslušné zkumavky se stop pufrem. Nakonec bylo odebráno také 100 μ l mitochondrií ze vzorku 16*, jenž byl inkubován ve 25°C, a přeneseno na led do poslední zkumavky se STOP pufrem.

Ke všem vzorkům bylo přidáno 8 μ l proteinázy K (zásobní roztok o koncentraci 0,5 mg/ml). Po 10 min inkubace na ledu byly vzorky smíchány s 2 μ l 100x PMSF, čímž byla aktivita proteinázy inhibována. Vzorky byly stočeny 10 min při 16600 x g a 4°C. Pelety byly resuspendovány v 300 μ l promývacího 1x CCCP pufru a stočeny za stejných podmínek. Po odsátí supernatantu byly pelety resuspendovány v 1x koncentrovaném vzorkovém pufru pro SDS PAGE a umístěny na 10 min do 80°C.

BSA importní pufr:

BSA bez mastných kyselin	6 g
Sacharóza	17,1 g
KCl	1,19 g

MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,2 g
KH ₂ PO ₄	54 mg
Metionin	0,15 g
MOPS	0,42 g
dH ₂ O	do 200 ml

pH bylo upraveno na hodnotu 7,2 pomocí KOH

Importní mix pro 1 importní řadu:

BSA importní pufr	800 µl
0,2M ATP	10 µl
0,2M NADH	10 µl
0,1M metionin	50 µl
Kreatin kináza	10 µl
0,5M kreatin fosfát	20 µl

AVO mix

1mM valinomycin	100 µl
10mM oligomycin	200 µl
8mM antimycin	100 µl
Etanol	600 µl

2xCCCP (stop) pufr

5mM CCCP	25 µl
----------	-------

BSA importní pufr	1 ml
-------------------	------

1xCCCP (promývací) pufr

5mM CCCP	50 µl
----------	-------

BSA importní pufr	4 ml
-------------------	------

4.13.5 Vysoušení a vyvolávání radioaktivně značených gelů

Vzorky byly rozděleny ve 13,5% polyakrylamidovém gelu. Gel byl po dobu 2 hodin sušen v sušičce a poté založen do desek pro expozici radioaktivně značených vzorků. Zde byl ponechán 1 – 3 dny a poté vyvolán pomocí zobrazovacího přístroje Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

4.14 Vkládání proteinu do lecitinových lipozómů

4.14.1 Příprava lecitinových lipozómů

Byl připraven zásobní roztok sójového 1- α -lecitinu (Sigma) v chloroformu (Penta) o koncentraci 30 mg/ml. Z tohoto zásobního roztoku bylo odebráno 333 μ l do čisté mikrokumavky. Veškerý chloroform byl poté odpařen pod proudem dusíku z tlakové lahve. Lipidový film, který se usadil na stěnách mikrokumavky byl dobře resuspendován v 500 μ l dH₂O. Směs byla poté sonikována 30 min ve vodní lázni, dokud se lehce nevyčeřila a nezprůsvitněla.

4.14.2 In vitro translace v přítomnosti lecitinových lipozómů

Do 25 μ l translační reakce namíchané podle protokolu PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit (viz kapitola In vitro translace) bylo přidáno 2,5 μ l připravené suspenze (tj. 50 μ g lipozómů). Reakce byla inkubována 2 hod při 37°C. Jako negativní kontrola byla použita pouhá translace sekretinu bez lipozómů, v níž by ke vzniku vyšších komplexů nemělo docházet.

Pro odstranění všech agregátů mimo lecitinovou membránu byly lipozómy promývány 2M roztokem ury. Translační reakce obsahující lipozómy byly rozděleny na polovinu a stočeny 1 hod při 13000 x g. Jeden z peletů byl resuspendován ve 100 μ l 50mM fosfátového pufru s 2M ureou, druhý pak v čistém 50mM fosfátovém pufru. Následně byly stočeny 45 min na 13000 x g. Pelety byly promyty čistým 50mM fosfátovým pufrům a znovu stočeny 45 min na 13000 x g. Po odstranění supernatantu byly pelety resuspendovány ve 20 μ l čistého fosfátového pufru.

Zásobní roztoky

Fosfátový pufr sodný (0,1M, pH = 8)

1M Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	9,32 ml
1M NaH ₂ PO ₄ (Lachema)	0,68 ml
dH ₂ O	do 100 ml

4M urea (Serva)

Čistý 50mM fosfátový pufr a 50mM fosfátový pufr s 2M ureou byly připraveny mícháním 0,1M fosfátového pufru s dH₂O nebo se 4M ureou v poměru 1:1.

4.14.3 Příprava vzorků na Blue Native PAGE

Ke 20 μ l lipozómů ve fosfátovém pufru bylo přidáno 10 μ l vzorkového pufru NativePAGE Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific), 8 μ l 10% digitoninu a 2 μ l dH₂O. Obdobně byla

připravena i negativní kontrola, avšak vzhledem k jinému ředění a ztrátám při promývání bylo použito pouze 5 μ l z translační reakce. Vzorky byly ponechány 15 min na ledu a poté stočeny 30 min na 20000 x g při 4°C. Bylo odebráno 18 μ l supernatantu, k němuž byly přidány 2 μ l NativePAGE 5% G-250 Sample Additive (Thermo Fisher Scientific). Po řádném promíchání byly vzorky nanесeny na 4-16% polyakrylamidový gel NativePAGE Novex Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific). Pro zjištění přibližné velikosti proteinových komplexů byl na gel nanесeno také 7 μ l proteinového standardu NativeMark Unstained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly rozdělovány ve 4°C a pod napětím 50 – 150 V. Na počátku elektroforéza probíhala v tmavém katodovém pufru. Ve chvíli, kdy se barevné čelo gelu nacházelo přibližně v jedné třetině, byl tmavý pufr vyměněn za světlý. Gel byl po dobu 2 hodin sušen v sušičce a na 1 – 3 dny založen do desek pro expozici radioaktivně značených vzorků.

Použité pufrы

Anodový pufr

20x Running Buffer (Thermo Fisher Scientific)	30 ml
dH ₂ O	570 ml

Katodový pufr tmavý

20x Running Buffer	10 ml
20x Cathode Buffer Additive (Thermo Fisher Scientific)	10 ml
dH ₂ O	180 ml

Katodový pufr světlý

20x Running Buffer	10 ml
20x Cathode Buffer Additive	1 ml
dH ₂ O	189 ml

4.14.4 Posttranslační vkládání proteinu do lecitinových lipozómů

Sekretin byl syntetizován pomocí kitu PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit. Po 2 hod inkubace translační směsi ve 37°C byla reakce zastavena přidáním streptomycinu (o finální koncentraci 10 ng na 1 μ l reakce) a bylo přidáno 2,5 μ l lipozómů. Protein byl s lipozómy ponechán další 2 hod ve 37°C. Následně byly lipozómy promývány 2M ureou stejně, jako po *in vitro* translaci v přítomnosti lipozómů. Obsah proteinu v lipozómech byl poté analyzován na SDS PAGE.

4.15 Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2HS)

K detekci interakcí jednotlivých proteinů eukaryotického T2SS byla použita metoda kvasinkového dvouhybridního systému. Nejprve byly všechny testované geny zaklonovány do dvou plazmidů – pGADT7 a pGBKT7. Každý z těchto plazmidů obsahuje jednu doménu transkripčního faktoru GAL4. Pokud v buňce dochází k interakci zkoumaných proteinů, dostanou se tyto dvě domény do těsné blízkosti a spustí se transkripce reportérového genu. V tomto případě se jedná o HIS3, kódující jeden z enzymů nutných pro syntézu histidinu. Díky tomu lze kvasinky, v nichž dochází k interakci proteinů, selektovat na plotnách s minimálním médiem bez histidinu (Fields and Song, 1989).

Kvasinky kmene AH109 byly nejprve kultivovány na YPD plotně, odkud byly nasazeny do 5 ml 2x YPAD média s 5 μ l kanamycinu a třepány přes noc na třepačce při 30°C a 220 RPM. Druhý den byla kultura naředěna do 50 ml 2x YPAD média na $OD_{600} = 0,2$ a vrácena na přibližně 4 hod na třepačku. Když byla hodnota OD_{600} rovna 0,8, byly kvasinky stočeny 5 min při 3000 x g. Poté byly promyty 25 ml sterilní dH_2O , stočeny za stejných podmínek a resuspendovány v 1 ml dH_2O . Buňky byly přeneseny do mikrozkuhavky a stočeny 1 min při 3000 x g. Z peletu bylo odebráno 100 μ l, k nimž bylo přidáno 400 μ l dH_2O . Směs byla důkladně zvortexována a rozdělena po 50 μ l do mikrozkuhovek. Buňky byly opět stočeny 1 min při 3000 x g a supernatant byl odstraněn. K jednotlivým peletům poté bylo postupně přidáváno 240 μ l 50% polyethylenglykolu, 36 μ l 1M roztoku LiAc, 50 μ l denaturované salmon sperm DNA (denaturace byla provedena vysokou teplotou a následným prudkým zchlazením – SS DNA byla umístěna na 5 min do 95°C a poté umístěna na led), a 34 μ l směsi obou plazmidových DNA (5 μ l pGADT7, 5 μ l pGBKT7, 24 μ l dH_2O). Všechny transformační reakce byly 1 min vortexovány a inkubovány 40 min ve 42°C. Poté byly transformované kvasinky stočeny 1 min při 3000 x g, resuspendovány v 500 μ l dH_2O a po 250 μ l vysety na SD -Trp/ -Leu a SD -Trp/ -Leu / -His plotny. Plotny byly inkubovány 3 – 4 dny v termostatu při 30 °C.

Z pozitivních ploten byla nasazena 1 kolonie do 5 ml média SD -Trp / -Leu s ampicilinem. Buňky byly kultivovány přes noc na třepačce při 30°C a 200 RPM a poté stočeny 1 min při 3000 x g. Pelet byl resuspendován ve sterilní vodě do $OD = 0,2$. Bylo připraveno 6 zkuhovek se 160 μ l sterilní dH_2O a do první z nich bylo přidáno 40 μ l z buněčné suspenze. Po promíchání bylo z této mikrozkuhavky odebráno 40 μ l, které byly přidány do mikrozkuhavky druhé. Tímto způsobem byla připravena celá ředící řada. Vzorky byly poté po 2 μ l rozkapány na SD -Trp/ -Leu / -His plotny a inkubovány 3 – 4 dny v termostatu při 30 °C.

5 Výsledky

5.1 Bioinformatická analýza GspD

5.1.1 Alignmenty proteinových sekvencí GspD a GspND

Byly vytvořeny alignmenty proteinových sekvencí mitochondriálních GspD s C-koncovými doménami bakteriálních GspD a mitochondriálních GspND s N-koncovými doménami bakteriálních GspD. Pro alignmenty byly použity sekvence z *Escherichia coli* (Ec), entrotoxigenní *E. coli* (ETEC), *Klebsiella oxytoca* (Ko), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Reclinomonas americana* (Ra), *Naegleria gruberi* (Ng), *Naegleria fowleri* (Nf), *Neovahlkampfia damariscottae* (Nd), *Malawimonas jakobiformis* (Mj), *Malawimonas sp.* str. 249. (M249) a *Andalucia godoyi* (Ag).

Délka GspND se pohybuje mezi 100 a 150 AK, délka sekvence N-koncových domén bakteriálního sekretinu je pak přibližně kolem 350 AK. GspND tedy pokrývá pouze část z původní bakteriální sekvence. Při porovnávání sekvencí se zjistilo, že se nejvíce podobá bakteriální subdoméně N1. Subdomény N1 – N3 však i mezi sebou navzájem vykazují poměrně velkou podobnost. Nelze proto s jistotou říci, že GspND je homologní právě k subdoméně N1. Na obrázku č. 7 je znázorněn alignment těchto dvou domén – eukaryotického GspND a bakteriální N1.

Na obrázku č. 8 se pak nachází alignment eukaryotického GspD a C-koncové domény bakteriálních GspD, který ukazuje, že zatímco C-konec eukaryotického GspD je dobře konzervován, na N-konci se sekvencí podobnost s bakteriálním sekretinem nevyskytuje.

		10	20	30	40	50	60	70	80
	
Ec	121	GDEVTTRIVP	LENVPARDLA	PLLRQMMDAG	-----	--SVGNVHY	EP--SNVILL	TGRASTINKL	IEVIKRVVDVI
ETEC	103	GDEMVTKVVP	VRNVSVRELA	PIIRQMIDSA	-----	--GSGNVVNY	DP--SNVIML	TGRASVVERL	TEVIQRVDHA
Ko	116	GDEVVTRVVP	LTNVAARDLA	PLLRQLNDNA	-----	--GAGSVVHY	EP--SNVLLM	TGRAAVTKRL	LTIVERVDNA
Pa	105	-DRLETRVIQ	VQQSPVSELI	PLIRPLVPQY	-----	--GHAAV--	--PS-ANALII	SDRSANTARI	EDVIRQLDQK
Ra	62	NTTLTRAVQR	YIAAFVQHVA	GVLEPE--PP	-----G	TPSERRIVSE	LPERNGVILF	GFRSTVTRVI	YKFLTRMDTE
Ag	11	HSRLTDEVQK	YVSSFVQYIA	SIVEPD--TE	-----	--PSRRIISF	LPDRNGVILV	GFQDSTVRVI	HRFLEKMDEE
Ng	31	NSELNINLQK	YISAFVQHIA	SILEQD--AP	-----	--NIRRIVSE	LPERNGIILF	GFRSTIKVL	YSFLKSLDKK
Nf	30	NSELNINLQK	YISAFVQHIA	SILEQD--AP	-----	--NVRRIVSE	LPERNGVILF	GFRSTIKVL	YSFLKSLDQK
Nd	18	NSQLNEKLOK	YISDFIQHIA	SITEKE--ET	-----	--TTKRVISE	LPERNGIILL	GFKSSTVKVI	YHFLKKLDEE
Mj	19	NSVLDAKLQR	YIAAYVEHIA	KVLEGP--AA	DASQDPSQAQ	RVPPNRVVTE	MPERNGIILF	GFRPSTVTRVI	YRLKKLDEE
M249	23	NSVLDGNLQK	YISAYVEHIA	KTLEGP--AH	-----	---ANRVVTY	IPERNGIILF	GFQPETIRVI	YRLLOKLDEE
	
Ec	187	GTEKQQIIHL	(AA) ₁₅₁						
ETEC	169	GNRTEEVIPL	(AA) ₁₄₈						
Ko	182	GDRSVVTYPL	(AA) ₁₄₈						
Pa	168	GSHDYSVINL	(AA) ₁₄₆						
Ra	131	KRNLFHEVNL	(AA) ₁₄						
Ag	68	KRTLKFTVHL	(AA) ₁₄						
Ng	97	KNNINFEINL	(AA) ₁₄						
Nf	96	KHNINFEINL	(AA) ₁₄						
Nd	84	KRNINFEVNL	(AA) ₁₄						
Mj	97	TVNLRFEVNL	(AA) ₁₄						
M249	88	TFNLRFEVDL	(AA) ₁₄						

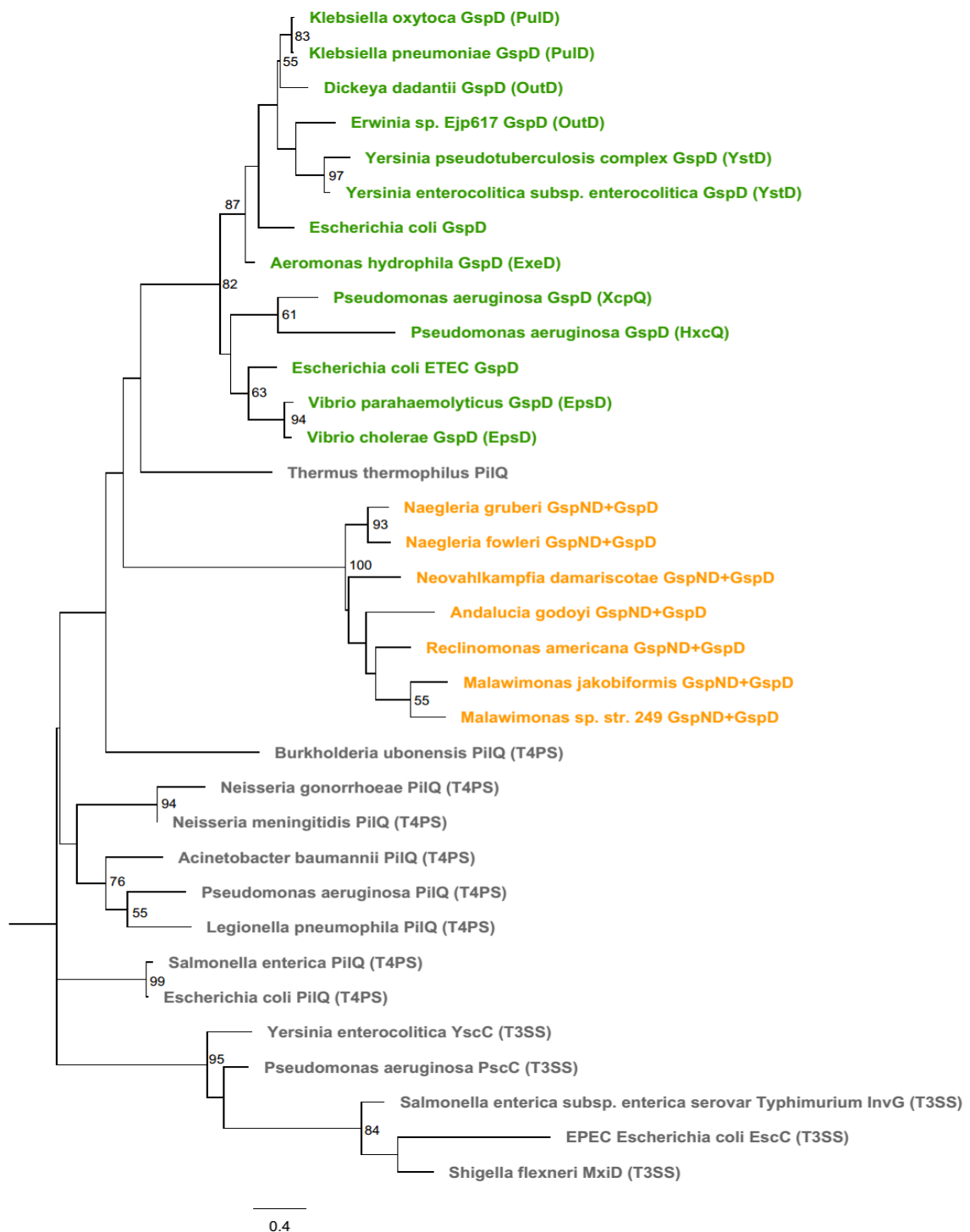
Obrázek 7: Alignment GspND s N-koncovou subdoménou N1 bakteriálního GspD. Pozice s podobnými aminokyselinami byly vyznačeny žlutě, pozice se stejnými aminokyselinami zeleně. Práh pro vyznačení byl 50%.

		10	20	30	40	50	60	70	80		
Ec	1	RLDI	-----	-----RRAQV	LVEAL	IVEVQ	DGNGLNLGVQ	WANKNVGAQQ	FTNTGLPIFN	AAQGVADYKK	
Ko	1	QLDI	-----	-----RRPQV	LVEAL	IAEVQ	DADGLNLGQI	WANKNAGMTQ	FTNSGLPIST	ATAGANQYNK	
Ra	1	N	-----	-----LP	LVQSLW	-----	-----R	W	-----	-----	
Ng	1	MENTLQPNST	NSLDFKVLNN	NVKERNNLSI	LIQRIL	-----	-----	-----	-----	-----	
Nf	1	MRNI	-----	-----FSSSTS	HSSHSSSWFM	ILKDLI	-----	-----R	F	-----	
Nd	1	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Mj	1	-----	-----S	RFGEFCYCGH	FLASE	VRSE	-----	-----H	W	-----GLAVYM	
M249	1	N	-----	-----SCS	AEAEGSGQQS	ISDQLL	-----	-----RPFRIS	WLS	-----GLAVYM	
Ag	1	N	-----	-----FA	VLYSVL	-----	-----	-----	-----	-----T	
		90	100	110	120	130	140	150	160		
Ec	60	NGGITSANPA	WDMFSAYNGM	AAGFFNGDWG	VLLTALASNN	KNDI	LATPSI	VTLDNKLASF	NVGQDVPVLS	G---SOTTSG	
Ko	60	DGTVSSSLAS	--ALISFNGI	AAGFYQGNWA	MLLTALASST	KNDI	LATPSI	VTLDNMEATF	NVGQEVPLT	G---SOTTSG	
Ra	11	-----	-----LLER	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Ng	38	-----	-----ILSVLKI	FKSN	-----	-----TNN	TNNMFKSPI	SNSGDDDSNN	TASSSF	-----ECQLSIY	
Nf	28	-----	-----VWSILSQF	IPSEWKR	---	-----GRRV	NT	---TTITTTT	DFHNTSNTNS	TTSSSLTTKQ	QQQHSOLEIN
Nd	7	-----	-----ILKIIRYI	LKIF	-----	-----NNLV	---	-----	-----	-----	-----
Mj	32	-----	-----LLGIWRFV	LRIW	---	-----PSLL	SGS	---IAALASWYI	WRINRRAPV	QPSEEMPLTK	AGQISALNMA
M249	29	-----	-----IRHAVRLL	TTSW	SGR	---	---	---	---	---	---
Ag	11	-----	-----VLIAR	-----	-----	-----	-----GLR	RRGT	V	CINERSFLCP	VAAHGVAGQA
		170	180	190	200	210	220	230	240		
Ec	137	DNVNTVERK	TV---GTLK	VTQ	-----	-----VNE	---	---	---	---	
Ko	135	DNIENIVERK	TV---GIK	VKQ	-----	-----INE	---	---	---	---	
Ra	53	ALEWSTSAVA	TVVDSDIITL	EEPE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Ng	89	SDLENQQ--V	NIDDNHQIQS	IKEN	---	-----HINH	---	---	---	---	
Nf	89	SYLESNDHHP	DISSPSLFN	TQNVVPLFS	NHHQNH	TTSV	VGDDPHQLLT	TFLIPMSNNV	EFHKC-DASS	SYLLPSSLS	
Nd	51	SNQYSNR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Mj	91	ANAFADP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M249	86	ANETGNAGT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Ag	53	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		250	260	270	280	290	300	310	320		
Ec	175	---DSSSNST	LGPTFNTRTI	QNAVLVKT-G	ETVVLGGLLD	DFSKEQVSKV	PLIGDIP--L	VGQLFRYVST	ERAKRNLV		
Ko	174	ADAASSTSSD	LGATFNTRTV	NNAVLVGS-G	ETVVVGGLLD	KSVSDIADKV	PLIGDIP--V	IGALERSTSK	KVSKRNLMLF		
Ra	97	MGASRYSAIR	IKKNF--TL	QTAMLLKE-N	VPSYAGSFAL	ATELRRVRRS	P-LSFIP--F	LERFFSR-HF	MLVKSAILVE		
Ng	140	MNSSKYEAMR	IKKHF--TT	STNLLIKEFD	KPHFVGSFAN	STELKTIKRS	P-LSFIP--F	LSDLFTRNEY	MLVKSAILVE		
Nf	168	SSSSKYQAMR	IKKHF--TA	STNLLIRLNL	TPHFVGSFAN	STELKAIRKS	P-LSFLFQF	LSQLFSRNEY	MLVKSAILVE		
Nd	72	ELKSRWESMR	LKKHF--TF	QTNVLLKP-N	QPTYVGFSS	STELQTVKRS	P-FSYLF--F	LRDLFSRKEF	MLVKSAILVE		
Mj	104	SRRSRLVSMR	IKKNF--AL	QTSVMLKE-N	QATYVGFAL	SNELKTIKRS	P-LSYIF--L	IGDLFRRDEF	MLVKSAILVE		
M249	109	ALRSRLTSMR	IKKNF--TL	QTSVMLKE-N	QATYVGFAL	ASELKTILKQ	P-LSFLF--V	VGQLFSRDEF	MLVKSAILVE		
Ag	67	VRRSRLVQGM	IKKHF--VT	QTAVRVRS-S	DSQFLGSPAL	STELRITVQ--	P-LALIF--F	LKHVFSRTEF	MLVKSAILVE		
		330	340	350	360	370	380	390			
Ec	250	LRPTIIRDDD	VYHLSLSEKY	TRYRQEQQR	IDGSKALVG	SEDL----	PV	LDENTFNSHA	PAPSSR----		
Ko	251	LRPTVIRDD	EYRQASSGQY	TAFNDAQSKQ	RGKENNDAML	SNDLLEIYPR	QDTAAFRQVS	AAIDAFNLGG	NL		
Ra	169	LRVRTAAGR	P-----	---QVTS--	-----	-----	-----	-----	---		
Ng	214	LTASLKN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---		
Nf	244	LTASLDQQQ	HDHNNMNT-	---SIGSSSI	SGGHGS----	-----	-----	-----	GG		
Nd	145	LRATYEDDKT	NQLKG----	---NVIKK--	-----	-----	-----	-----	---		
Mj	177	LRICRAERTGS	GP-----	---RLTQQQ	Q-----	-----	-----	-----	---		
M249	182	LRVFKERSQA	AA-----	---APVQTAL	-----	-----	-----	-----	---		
Ag	138	LRLLHVEPYRP	VLALN----	---DIAEQIE	D-----	-----	-----	-----	---		

Obrázek 8: **Alignment eukaryotického GspD s C-koncovou doménou bakteriálního GspD** ukazuje konzervovanost sekvence na C-konci. Pozice s podobnými aminokyselinami byly vyznačeny žlutě, pozice se stejnými aminokyselinami zeleně. Práh pro vyznačení byl 50%.

5.1.2 Fylogenetická analýza sekretinu

Pro fylogenetickou analýzu bylo použito 34 sekretinových sekvencí. Kromě 7 eukaryotických sekretinů bylo vybráno 13 sekvencí z T2SS, 5 z T3SS, 8 z T4PS a 1 ze systému pro přirozenou transformaci. Pro účely této analýzy byl eukaryotický GspD sloučen do jedné sekvence s GspND.

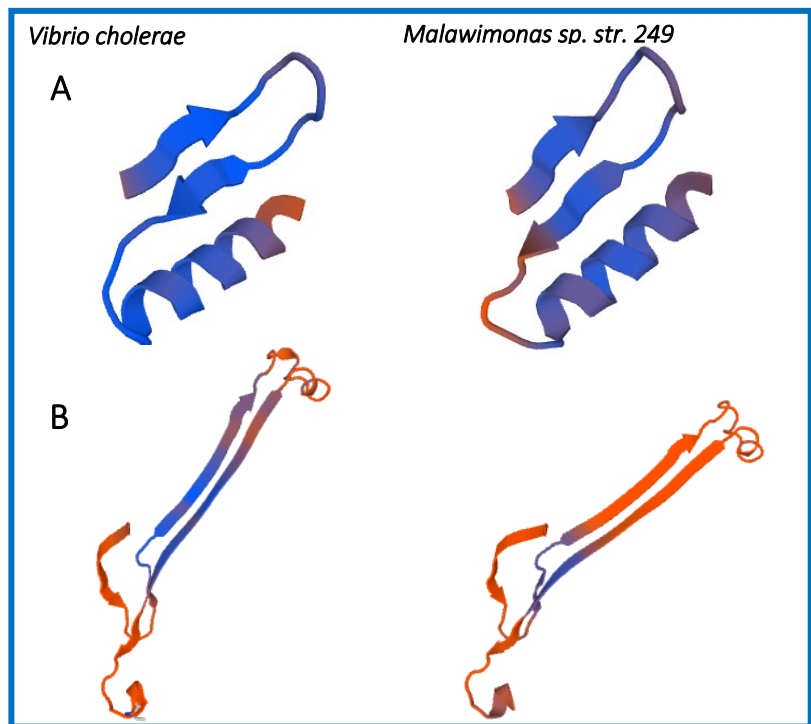


Obrázek 9: **Fylogenetická analýza sekretinů** vytvořená pomocí programu MEGA7. Eukaryotické sekretiny (vyznačeny oranžovou barvou) tvoří dobře oddělenou skupinu, která se ovšem nezařazuje mezi sekretiny z T2SS (označené zelenou barvou), nýbrž paralelně k nim. Byly zobrazeny pouze hodnoty bootstrapu nad 50%.

Obrázek č. 9 ukazuje výsledky této analýzy. Mitochondriální sekretin se překvapivě nezařadil mezi ostatní sekretiny z T2SS, ale paralelně k nim. Podle tohoto výsledku se zdá, že eukaryotní sekretiny jsou spíše sesterskou skupinou sekretinů z T2SS.

5.1.3 Predikce struktury eukaryotického sekretinu

K predikci struktury krátkých konzervovaných úseků v sekvenci eukaryotického sekretinu byl použit Swiss-Model. Struktura motivů ze sekretinové i N-koncové domény byla modelována podle sekretinu z *V. cholerae* (Yan et al., 2017). U N-koncové domény však byly nalezeny i jiné potenciální templáty – PilQ z T4PS u rodu *Myxococcus* či InvG z T3SS u rodu *Salmonella*. Skóre GMQE, které nabývá hodnot mezi



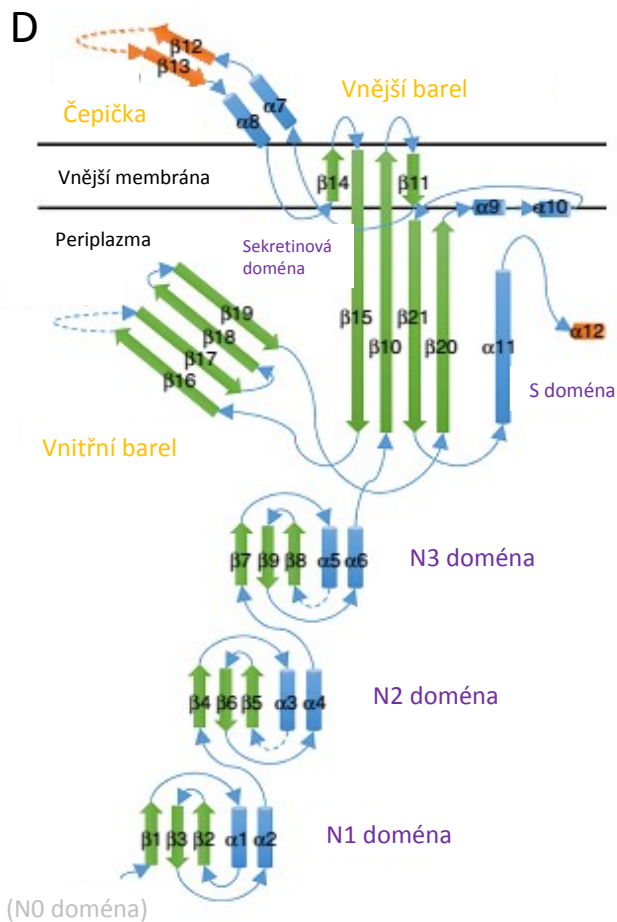
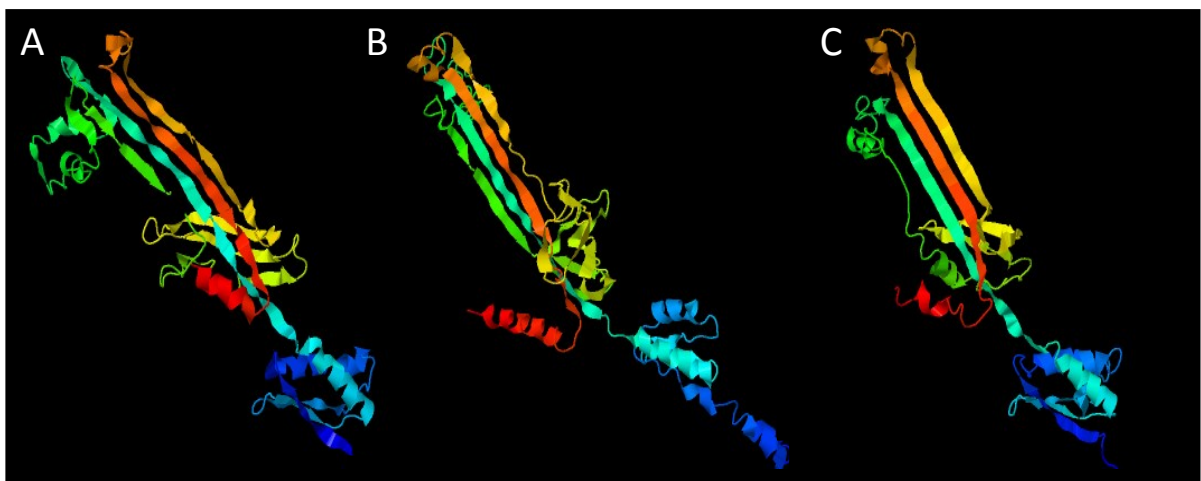
Obrázek 10: Predikce konzervovaných motivů v sekretinové struktuře. Modely úseků z GspD a GspND z *M. sp. str. 249* byly zhotoveny na základě sekvenční podobnosti se sekretinem z *V. cholerae*. Nejkonzervovanější částí GspND je motiv $\beta\beta\alpha$ (A), v GspD je pak nejvíce zachována C-koncová β -vlášenska (B).

číslly 0 a 1 a čím je vyšší, tím vyšší je i kvalita modelu (Biasini et al., 2014), se u obou těchto predikcí pohybovalo kolem hodnoty 0,5. Na obrázku č. 10 je patrné, že ze sekretinové domény zůstala konzervována β -vlášenska, jež se nachází na samém C-konci sekretinů a pokrývá β -listy $\beta 20$ a $\beta 21$, z N-koncové domény pak motiv $\beta\beta\alpha$, objevující se v subdoménách N1 – N3 (viz obrázek 11D).

Modely struktury celého eukaryotního sekretinu byly vytvořeny pomocí programu I-TASSER. Sekretiny vyobrazené na obrázku č. 11 pocházejí z *M. jakobiformis*, *M. sp. str. 249* a *N. damariscottae*, z uměle spojených sekvencí GspND a GspD. Z nabízených modelů byly vybrány vždy ty nejpravděpodobnější. Jejich C-skóre se nacházelo v intervalu -2,5 až -1,5. To může nabývat hodnot mezi -5 a 2 a značí všeobecnou přesnost modelu. Topologie struktur s C-skóre -1,5 a vyšším je pak s největší pravděpodobností správná (Yang and Zhang, 2015). Podle modelů se zdá, že sekundární struktura eukaryotických sekretinů by měla rámcově odpovídat struktuře sekretinů bakteriálních. N-koncové domény z GspND *M. sp. str. 249* a *N. damariscottae* zachovávají typický motiv, vyskytující se v bakteriálních subdoménách N1 – N3, tedy $\beta\alpha\beta\alpha$. Predikovaná struktura C-koncových domén je pak tvořena 3 – 4 dlouhými β -listy, z nichž se u bakteriálního sekretinu skládá vnější β -barel. U sekretinu z *M. sp. str. 249* lze pak pozorovat i několik kratších β -listů, které u bakterií formují vnitřní β -barel. Struktury se shodují i přítomností α -helixu na samém C-konci. Nelze

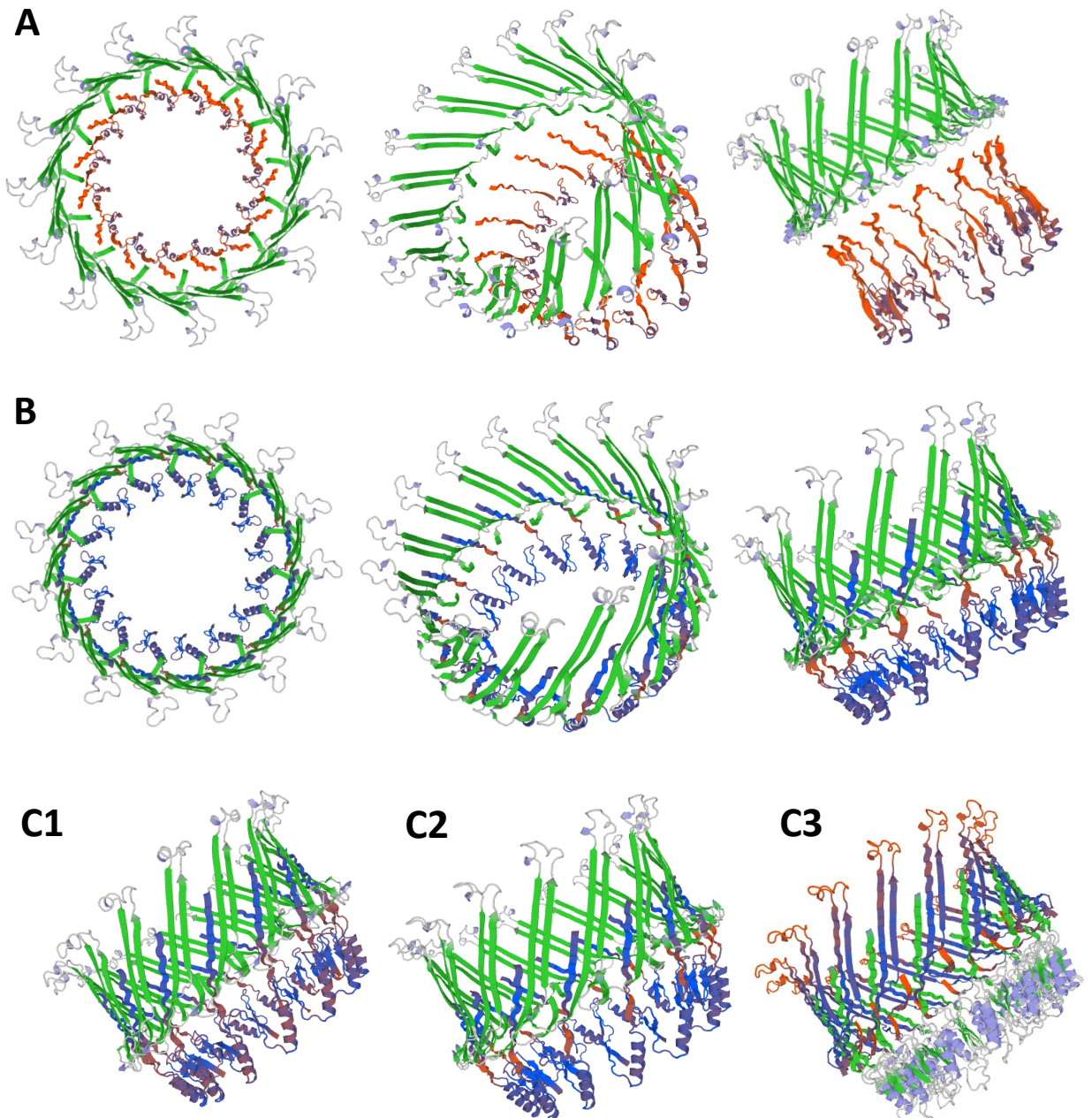
však předpokládat, že mitochondriální sekretiny nesou S-doménu. Jedná se totiž o velmi krátký a nespecifický úsek, který není sekvenčně příliš konzervován (jak je vidět z alignmentu na obrázku č. 8). Modelovány byly i ostatní eukaryotní sekretiny, u nich však nabízená predikovaná struktura neodpovídala struktuře bakteriálních sekretinů.

K zařazení konzervovaných strukturních motivů do potenciální terciární struktury sekretinového kanálu byl použit Swiss-Model Oligomer server. Ten umožňuje kombinovat dva a více proteinů do jedné heterooligomerní struktury. Pro modelování byly proto použity oddělené sekvence GspD a GspND.



Obrázek 11: Predikce struktur celých sekvencí eukaryotických sekretinů vytvořená v programu I-TASSER. Spojené sekvence GspD a GspND z *M. sp. str. 249* (A), *M. jakobiformis* (B) a *N. damariscottae* (C) podle modelů vytvářejí struktury všeobecně podobné sekretinu z *V. cholerae* (D). N-koncové domény (v obrázku vyznačeny modře) z *M. sp. str. 249* a *N. damariscottae* zachovávají typický motiv subdomén N1–N3. Struktura C-koncových domén je pak složena z 3–4 dlouhých β -listů, který u bakteriálního sekretinu tvoří vnější β -barel. U sekretinu z *M. sp. str. 249* lze pak pozorovat i několik kratších β -listů, z nichž je u bakterií formován vnitřní barel. Struktury se shodují i přítomností α -helixu na samém C-konci (u modelů vyznačen červeně). U bakterií se jedná o S-doménu, není to však tak typická struktura, aby z ní bylo možno předpokládat přítomnost S-domény i u eukaryot. Znázornění sekundární struktury sekretinového monomeru z *V. cholerae* (D) bylo převzato z Yan et al., 2017 a upraveno.

Tento program je určen k modelování úseků s vysokou homologií, do struktur proto byly zařazeny jen konzervované úseky sekvence. Jako templát sloužily struktury sekretinových pórů z *V. cholerae* a *S. typhimurium* (Worrall et al., 2016; Yan et al., 2017), vytvořené struktury mají proto patnáctičetnou symetrii.

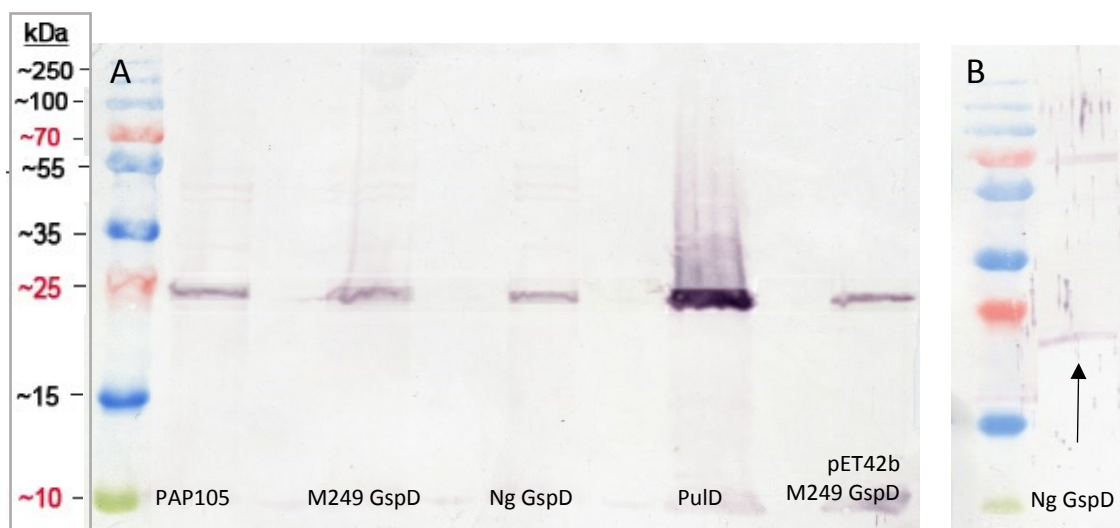


Obrázek 12: **Predikce částečné terciární struktury eukaryotického sekretinového póru** podle templátů z *V. cholerae* (T2SS) a *S. typhimurium* (T3SS), jejichž sekretinový komplex se sestává z 15 kopií tohoto proteinu. Podle predikce GspD přispívá dvěma konzervovanými β -listy do β -barelové struktury póru, GspND pak napomáhá kombinací α -helixů a β -listů ke vzniku vestibulu kanálu. Model komplexu z *M. sp. str. 249* navržený podle GspD z T2SS (A) se od ostatních modelů poněkud liší. Zatímco v modelu podle templátu InvG (B) GspDN těsně navazuje na β -barel tvořený GspD, zde N-koncová doména lokalizuje do míst vzdálenějších od GspD. Mohlo by to naznačovat, že GspND je podobný spíše některé vzdálenější N-doméně bakteriálního sekretinu, např. N1. Modely pórů z *M. jakobiformis* (C1 a C2) a *N. damariscottae* (C3) se přibližně shodují s komplexem z *M. sp. str. 249* vymodelovaným podle InvG.

Stejně jako v předešlém případě, i zde bylo možno predikovat pouze struktury sekretinů z *M. sp. str. 249*, *M. jakobiformis* a *N. damariscottae* (viz obrázek č. 12). Tyto sekretiny nejspíš budou v klíčových úsecích nejpodobnější svému bakteriálnímu homologu. Hodnota GMQE se u vytvořených modelů pohybuje kolem 0,2. Kvalita struktur tedy není příliš vysoká, pravděpodobně z důvodu, že modely obsahují vždy jen část proteinů a takové komplexy by nebyly stabilní. Také sekvenční shoda s navrženými templáty je poměrně nízká (15 – 20%).

5.2 Detekce PspA odpovědi

Při heterologní expresi v *E. coli* se sekretin PulD z *K. oxytoca* vkládá z periplazmatického prostoru do vnitřní membrány, pokud v systému není zároveň přítomen pilotin, který by ho navedl k membráně vnější. V případě této chybné lokalizace je v buňkách spuštěna odpověď na fágový šok. Tu lze prokázat detekcí proteinu PspA, který se během této odpovědi tvoří ve zvýšeném množství (Hardie et al., 1996). Tato vlastnost byla testována i u eukaryotického GspD, pro porovnání vlastností bakteriálního a mitochondriálního sekretinu. U *E. coli* kmene BL21 k PspA odpovědi nedochází. Z toho důvodu byl vybrán jiný kmen, PAP105. Ten byl transformován plazmidem obsahujícím sekretin a signální peptid. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální PulD, jako negativní kontrola netransformované buňky PAP105. Po 6 hodinách předpokládané exprese sekretinu byla metodou western blotu sledována hladina proteinu PspA. Jak je patrné na obrázku 13A, přítomnost PulD podle očekávání fágovou šokovou odpověď vyvolala, avšak při expresi sekretinu z *N. gruberi* (Ng GspD) ani *M. sp. str. 249* (M249 GspD) se hladina PspA nezvýšila oproti negativní kontrole. Nestalo se tak ani v případě použití vysokokopiového vektoru pET42b.

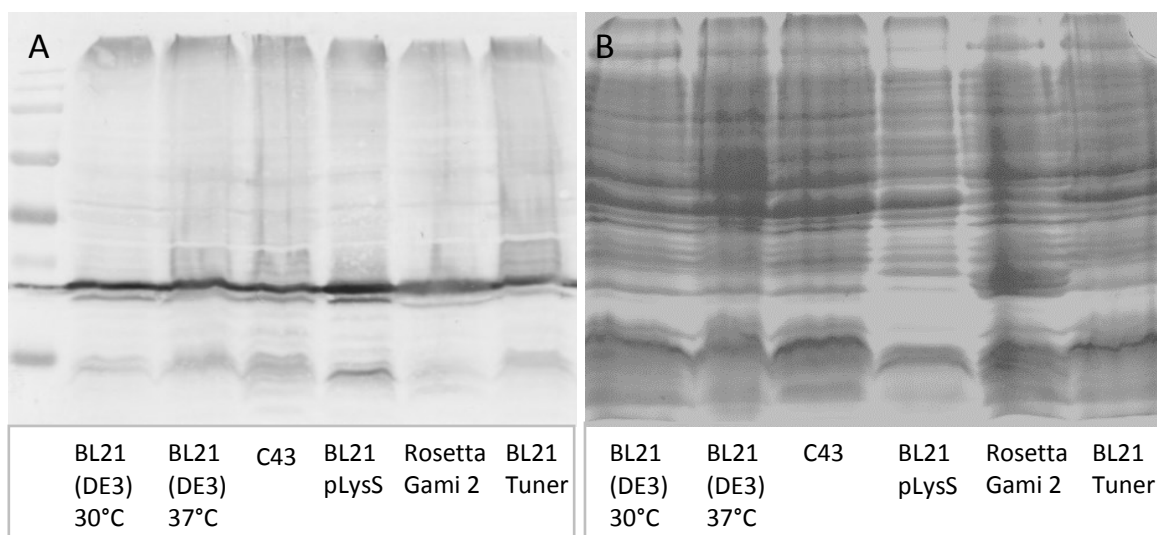


Obrázek 13: **Detekce PspA odpovědi v buňkách PAP105.** A) Hladina PspA při produkci bakteriálního GspD (PulD) a M249 GspD z vektoru pCHAP a Ng GspD z plazmidů pCHAP a pET42b. Kvůli odečtu množství přirozeně se vyskytujícího PspA byly analyzovány i netransformované buňky PAP105. B) Produkce Ng GspD v transformovaných bakteriích. Množství GspD v PAP105 bylo téměř nedetekovatelné. Signál o správné velikosti se na western blotu objevil až po velmi dlouhé inkubaci se substrátem, výsledek proto nelze považovat za jednoznačně pozitivní.

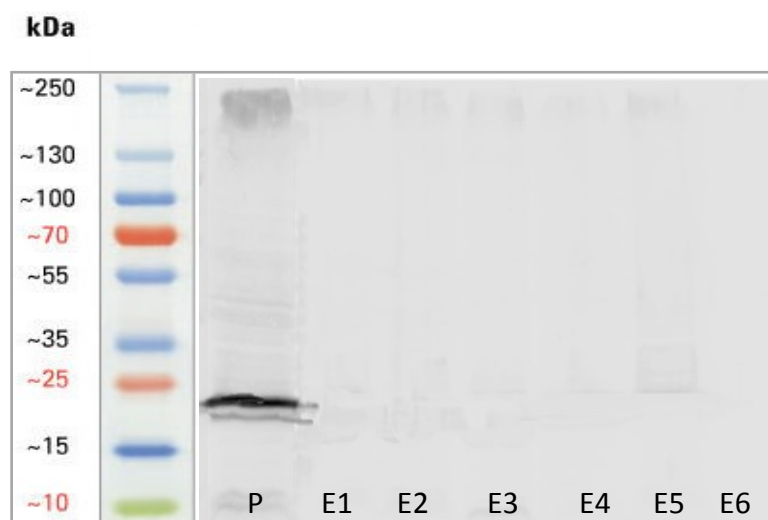
Aby nebylo narušeno skládání sekretinového póru, byly pro tento experiment vybrány sekretiny bez HIS tagu. Jejich expresi proto bylo možné ověřit pouze pomocí α -NgGspD protilátky (obrázek 13B). Přítomnost GspD však tímto způsobem téměř nebylo možno prokázat. Protože buňky PAP105 nebyly transformovány indukovatelnými vektory, syntéza sekretinu vůbec nemusela probíhat. Bakterie produkující mitochondriální sekretin kvůli jeho vysoké toxicitě nejspíš ihned hynuly, mohlo proto dojít k vyselektování linie, která GspD neprodukovala.

5.3 Purifikace sekretinu M249 GspD z *E. coli*

Pro plánované strukturální studie byl GspD z *M. sp.* str. 249 se signálním peptidem exprimován v různých expresních kmenech *E. coli* – BL21 (DE3), C43, BL21 (DE3) pLysS, Rosetta Gami 2 (DE3) a BL21 Tuner. Poté byla pomocí western blotu analyzována hladina proteinů v jednotlivých kmenech, aby byl zvolen ten nejvhodnější pro následnou purifikaci. Jak je vidět na obrázku č. 14A, množství proteinu se v jednotlivých kmenech příliš neliší. Po porovnání s celkovým obsahem proteinů (obrázek č. 14B) však byl zvolen kmen BL21 pLYS, jenž je schopen produkovat mírně vyšší množství sekretinu než ostatní testované kmeny. Z bakterií tohoto kmene byl pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA partikulích protein purifikován. Během procesu však došlo ke ztrátě proteinu, jak je vidět na obrázku č. 15. Zatímco v peletu bakterií byl protein detekovatelný, nevyskytoval se v žádné z elučních frakcí. Pravděpodobným vysvětlením je tedy to, že zvolený detergent nebyl schopen rozpustit sekretinové multimery a protein tak sedimentoval spolu s membránami.



Obrázek 14: Porovnání M249 GspD v různých expresních kmenech *E. coli*. A. Obsah GspD v buňkách vizualizovaný pomocí α -HIS protilátky. B. Celkové množství proteinů v jednotlivých vzorcích nabarvené pomocí Coomassie Blue.



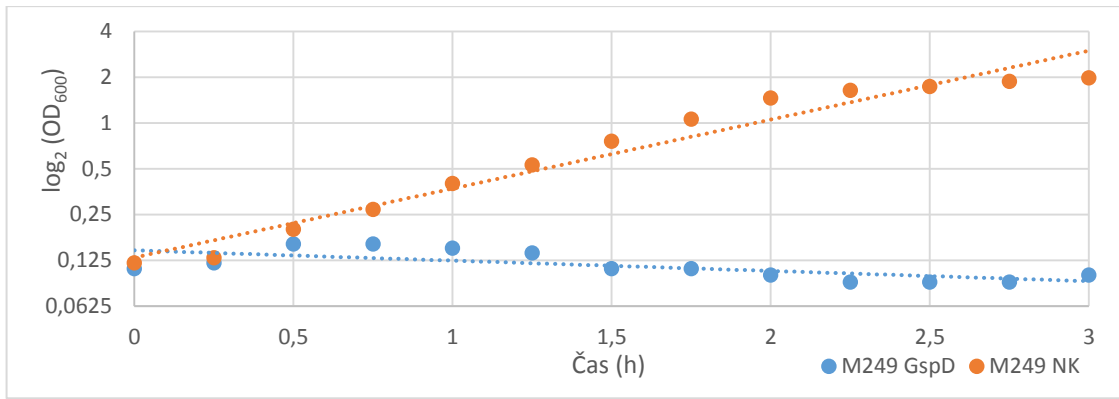
Obrázek 15: Purifikace M249 GspD z *E. coli* BL21 pLysS. Exprese sekretinu byla poměrně nízká kvůli vysoké toxicitě sekretinu. Ačkoliv se v bakteriích podařilo detekovat určité množství sekretinu (P), protein byl ztracen v průběhu purifikace, nevyskytoval se v žádné z elučních frakci (E1 – E6).

5.4 Test toxicity sekretinu

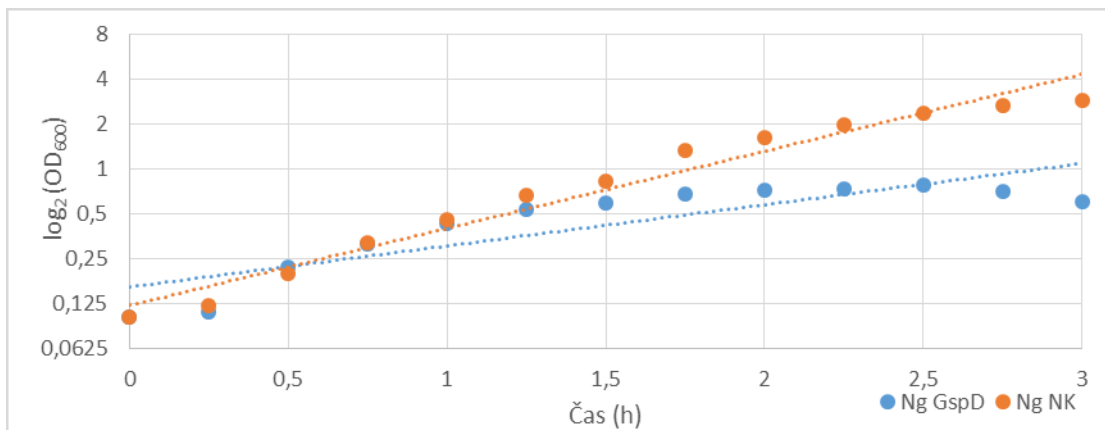
5.4.1 Růstové pokusy

Další z vlastností bakteriálního sekretinu je jeho velká toxicita v případě, že je v *E. coli* produkován bez signálního peptidu pro obecnou sekretorickou dráhu. Multimery se vkládají do vnitřní membrány z cytoplazmy a bakterie téměř ihned po zahájení produkce sekretinu hynou (Guilvout et al., 2008). Pro otestování schopnosti tvořit póry v membráně byl proto tento experiment proveden i s eukaryotickými sekretiny. Buňky *E. coli* kmene BL21 (DE3) byly transformovány vektorem pET22b obsahujícím GspD bez signálního peptidu. Po indukci exprese sekretinu pomocí IPTG byl sledován vliv přítomnosti sekretinu na viabilitu bakterií.

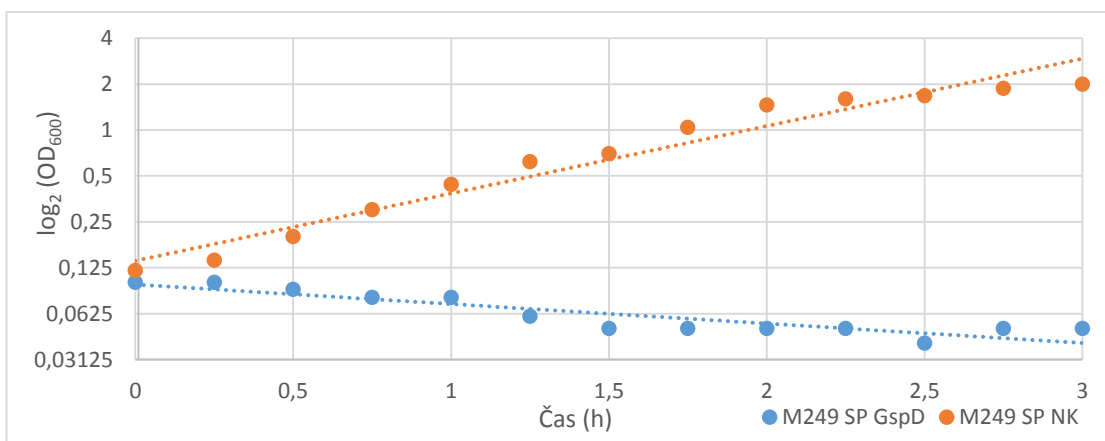
Z měření optické denzity vyplynulo, že M249 GspD se svojí toxicitou shoduje s bakteriálním GspD – růst buněk se ihned po přidání IPTG zastavil (graf č. 1). Oproti tomu Ng GspD růst kultury pouze zpomaloval, k jeho zastavení došlo až po 2 hod od indukce exprese (graf č. 2). Po zjištění, že výtěžky exprese M249 GspD pro purifikaci jsou velice nízké, byl tento experiment zopakován i s variantou sekretinu se signálním peptidem. Výsledky byly velice podobné jako v případě produkce M249 GspD bez signálního peptidu, i v tomto případě se bakterie okamžitě přestaly dělit (graf č. 3).



Graf 1: Růst bakteriální kultury po indukci exprese M249 GspD. E. coli BL21 (DE3) byly transformovány vektorem pET22b s M249 GspD pod indukovatelným promotorem. Ihned po indukci exprese GspD pomocí IPTG se růst buněk zastavil (hodnoty vyznačené modře). Populace buněk negativní kontroly (NK), k níž nebylo přidáno IPTG, rostla obvyklým způsobem (hodnoty vyznačené oranžově).



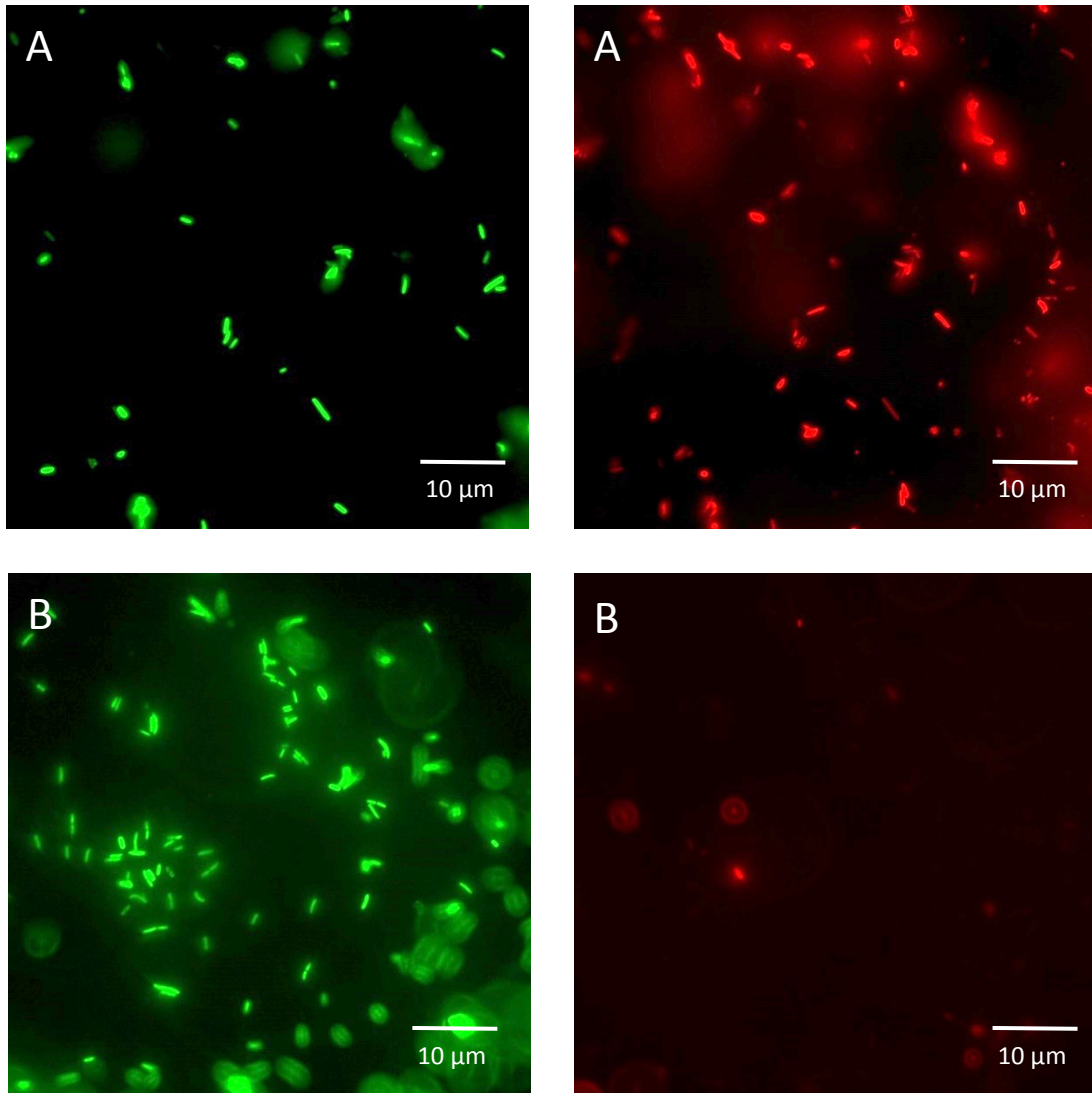
Graf 2: Růst bakteriální kultury po indukci exprese Ng GspD. E. coli BL21 (DE3) byly transformovány vektorem pET22b s Ng GspD pod indukovatelným promotorem. Po indukci exprese GspD pomocí IPTG se růst buněk zpomalil a po 2 hod exprese zastavil (hodnoty vyznačené modře). Populace buněk negativní kontroly (NK), k níž nebylo přidáno IPTG, rostla obvyklým způsobem (hodnoty vyznačené oranžově).



Graf 3: Růst bakteriální kultury po indukci exprese M249 GspD se signálním peptidem. E. coli BL21 (DE3) byly transformovány vektorem pET42b s M249 GspD a signálním peptidem pod indukovatelným promotorem. Ihned po indukci exprese GspD pomocí IPTG se růst buněk zastavil (hodnoty vyznačené modře). Populace buněk negativní kontroly (NK), k níž nebylo přidáno IPTG, rostla obvyklým způsobem (hodnoty vyznačené oranžově).

5.4.2 Fluorescenční mikroskopie

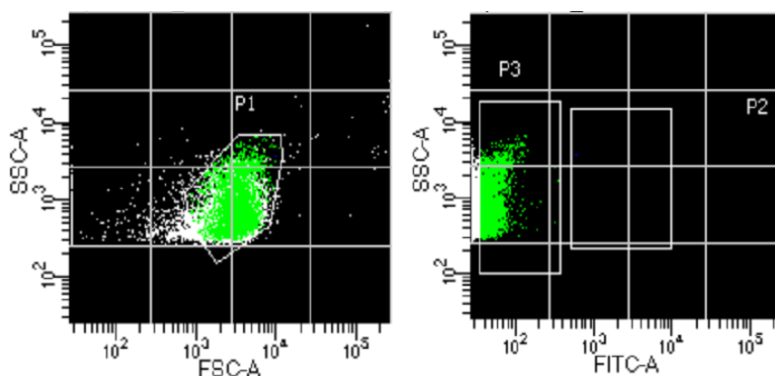
Pro ověření, že exprese sekretinu z *M. sp. str. 249* působí hynutí buněk a ne pouze zastavení jejich růstu, byla kultura buněk po 30 minutách od přidání IPTG nabarvena pomocí kitu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit a pozorována pod fluorescenčním mikroskopem. Podle očekávání většina bakterií ve vzorku s indukovanou expresí obsahovala propidium jodid, jenž vstupuje pouze do mrtvých bakterií nebo takových, které mají těžce poškozenou vnitřní membránu (obrázek 16A). Naopak buňky negativní kontroly byly obarveny téměř výlučně pouze pomocí SYTO9 (obrázek 16B).



Obrázek 16: **Barvení bakterií pomocí kitu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit.** Tento kit obsahuje dvě fluorescenční barvy – SYTO9, které emituje zelené světlo a barví především živé buňky, a propidium jodid, jenž vyzařuje světlo červené a vstupuje pouze do mrtvých nebo velmi poškozených buněk. Většina bakterií exprimujících M249 GspD byla obarvena propidium jodidem (A), naopak v negativní kontrole se takové bakterie téměř nevyskytovaly (B).

5.4.3 Průtoková cytometrie

Pro kvantifikaci předchozích výsledků a stanovení poměru mezi živými a mrtvými bakteriemi byla užitá metoda průtokové cytometrie. Přístroj byl kalibrován pomocí nebarvených buněk, byla vybrána populace částic velikostně odpovídající bakteriím (obrázek č. 17).

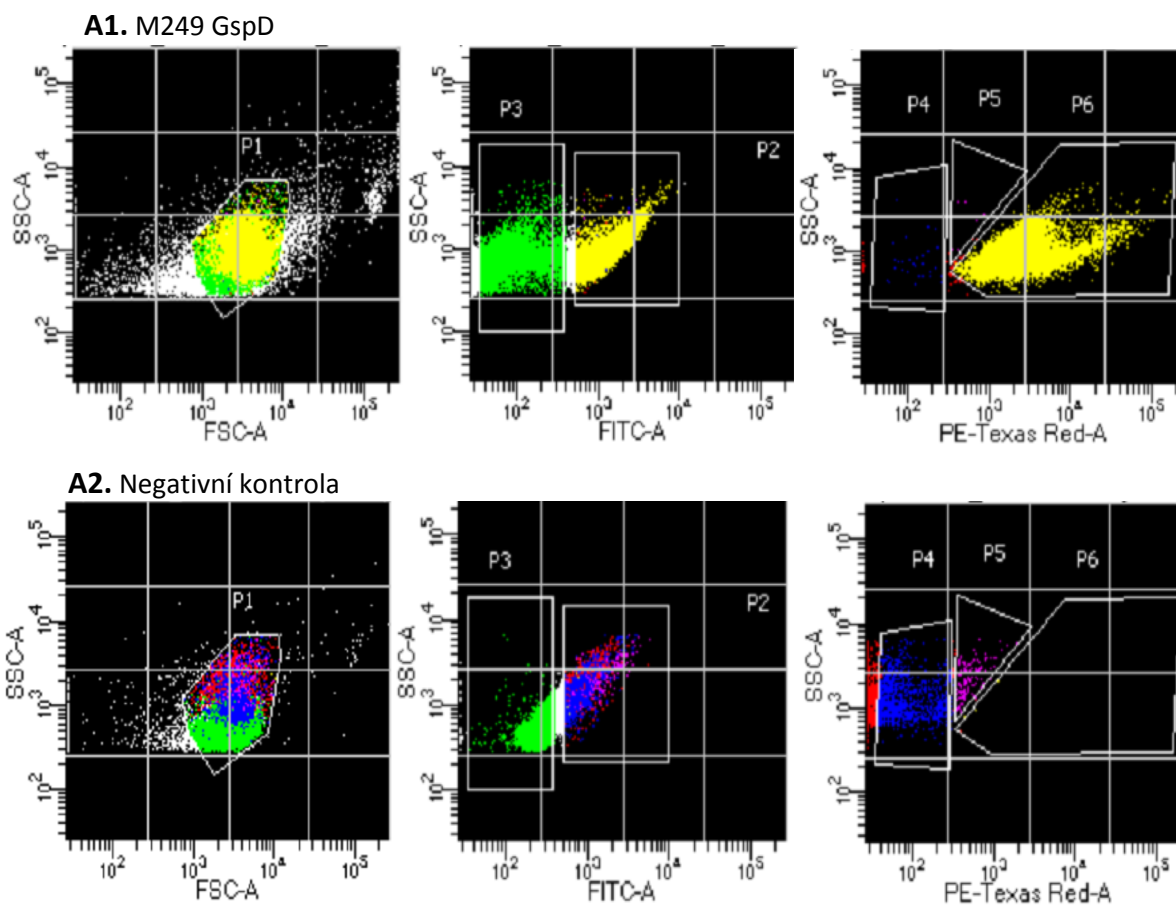


Obrázek 17: *Kalibrace průtokového cytometru. Podle velikosti a granularity buněk byla vybrána populace částic odpovídající bakteriím (P1). Byla též odstraněna populace vykazující autofluorescenci (P3).*

Následně byly měřeny bakterie obarvené fluorescenčními barvivy z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit. Fluorescence SYTO9 byla detekována v kanálu FITC-A, propidium jodid pak poskytoval signál v kanálu PE-Texas Red. Výsledky měření jsou znázorněny na obrázku č. 18. Bylo prokázáno, že kultura bakterií produkujících sekretin se podstatně liší od buněk negativní kontroly – 99,4% buněk obsahujících SYTO9 bylo zároveň pozitivní na propidium jodid. V kontrolní populaci však obsahovala SYTO9 pouze menšina bakterií (16%), počet mrtvých buněk by tak nemusel být průkazný. Ze statistiky byl proto vypuštěn parametr positivity na SYTO9. Byl tak získán podíl mrtvých buněk z celkového počtu bakterií (viz obrázek č. 19).

Výsledky ukázaly, že sekretin z *M. sp.* str. 249 produkovaný v *E. coli* skutečně způsobuje smrt těchto bakterií. Zatímco v kontrolní kultuře bylo mrtvých přibližně 15% bakterií, v kultuře obsahující GspD téměř 98%. Je pravděpodobné, že skutečná čísla jsou o něco nižší – hynutí bakterií může být zapříčiněno i poměrně dlouhou inkubací bakterií s fluorescenčními barvivy. Rozdíl mezi vzorky je však i přesto znatelný.

Zajímavá je i skutečnost, že více SYTO9 pozitivních buněk se nacházelo mezi bakteriemi obsahujícími sekretin (56%) – a to i přesto, že by přítomnost propidium jodidu měla blokovat vstup SYTO9 do buněk. Negativní kontrola však obsahovala takto obarvených buněk pouze necelých 17%. Pravděpodobným vysvětlením tohoto jevu je to, že sekretinové póry zvyšují propustnost vnitřní membrány pro fluorescenční barviva.



B.

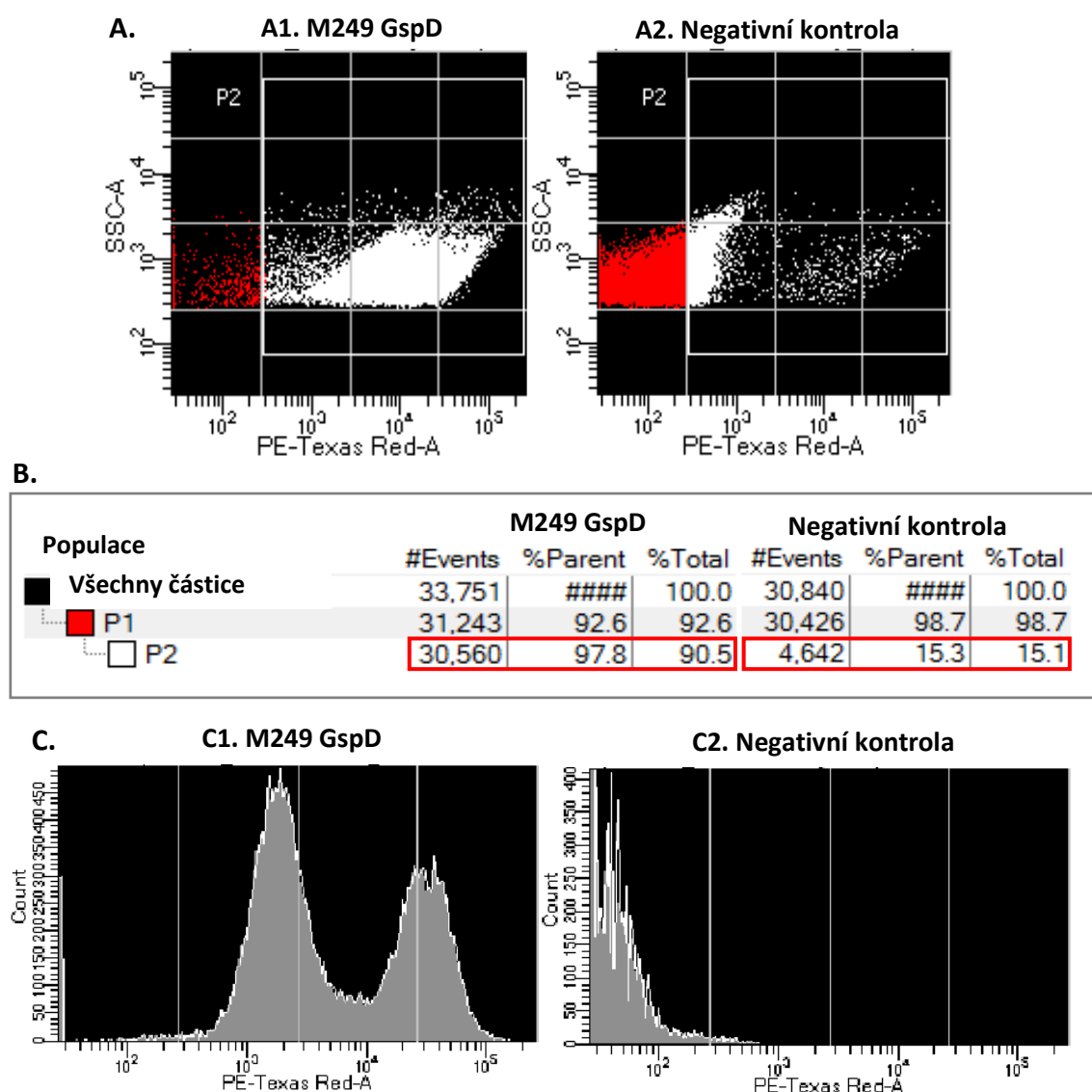
Populace	M249 GspD			Negativní kontrola		
	#Events	%Parent	%Total	#Events	%Parent	%Total
■ Všechny částice	33,867	####	100.0	30,724	####	100.0
□ P1	30,000	88.6	88.6	30,000	97.6	97.6
■ P2	16,870	56.2	49.8	4,990	16.6	16.2
■ P4	35	0.2	0.1	1,131	22.7	3.7
■ P5	6	0.0	0.0	138	2.8	0.4
■ P6	16,770	99.4	49.5	4	0.1	0.0
■ P3	7,143	23.8	21.1	20,019	66.7	65.2

Obrázek 18: Zastoupení živých a mrtvých buněk v bakteriální kultuře stanovené pomocí průtokové cytometrie.

A) Bodové grafy znázorňující jednotlivé populace v kultuře bakterií exprimující sekretin v M. sp. str. 249 (1) a v kontrolní populaci bez indukce exprese (2).

B) Statistika zastoupení těchto populací v jednotlivých kulturách.

P1: Částice odpovídající bakteriím, P2: Bakterie pozitivní na SYTO9, P4: Živé bakterie, pozitivní pouze na SYTO9, P5: Poškozené bakterie, P6: Mrtvé bakterie, pozitivní na SYTO9 i propidium jodid, P3: Bakterie s autofluorescencí.
 Events: Počet naměřených částic, %Parent: Procentuální zastoupení této populace v populaci nadřazené, %Total: Procentuální podíl částic této populace ze všech naměřených částic
 Zeleným rámečkem jsou vyznačeny počty živých bakterií, červeným mrtvých.



Obrázek 19: Zastoupení mrtvých buněk v bakteriální kultuře stanovené pomocí průtokové cytometrie.

A) Bodové grafy znázorňující jednotlivé populace v kultuře bakterií exprimující sekretin z *M. sp. str. 249* (1) a v kontrolní populaci bez indukce exprese (2). B) Statistika zastoupení těchto populací v jednotlivých kulturách.

P1: Částice odpovídající bakteriím, P2: Bakterie pozitivní na propidium jodid.

Events: Počet naměřených částic, %Parent: Procentuální zastoupení této populace v populaci nadřazené, %Total:

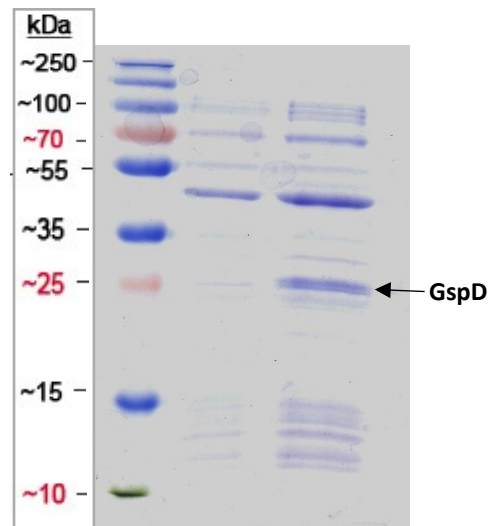
Procentuální podíl částic této populace ze všech naměřených částic

Červeným rámečkem jsou vyznačeny počty mrtvých bakterií.

C) Histogram fluorescence propidium jodidu v kultuře bakterií exprimující sekretin z *M. sp. str. 249* (1) a v kontrolní populaci bez indukce exprese (2).

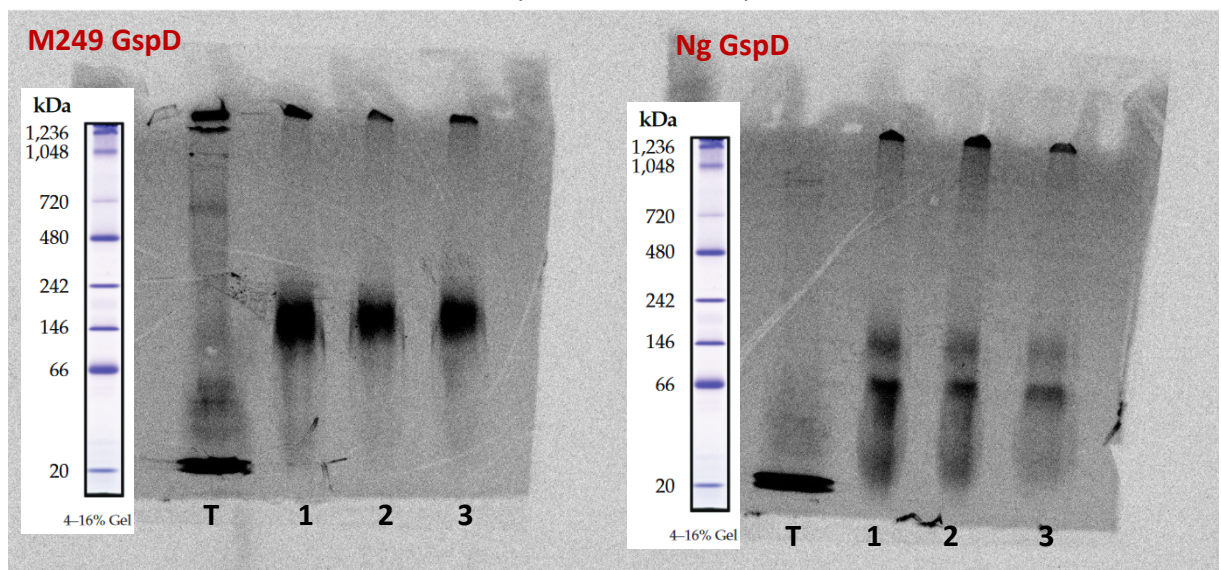
5.5 Skládání sekretinu in vitro

Sekretiny z T2SS a systému pro export filamentárních fágů se vyznačují schopností samovolné inserce do membrán, pokud jsou in vitro translatovány v přítomnosti lecitinových lipozómů (Nickerson et al., 2012). Pro otestování této vlastnosti byl proveden obdobný experiment i s eukaryotickými sekretiny. Ty byly nejprve zaklonovány do plazmidu nesoucího T7 promotor a poté překládány pomocí translačního kitu PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit. Tato metoda syntézy je poměrně robustní a poskytuje velice dobré výtěžky, které jsou detekovatelné i na gelu barveném pomocí Coomassie Brilliant Blue (viz obrázek č. 20).



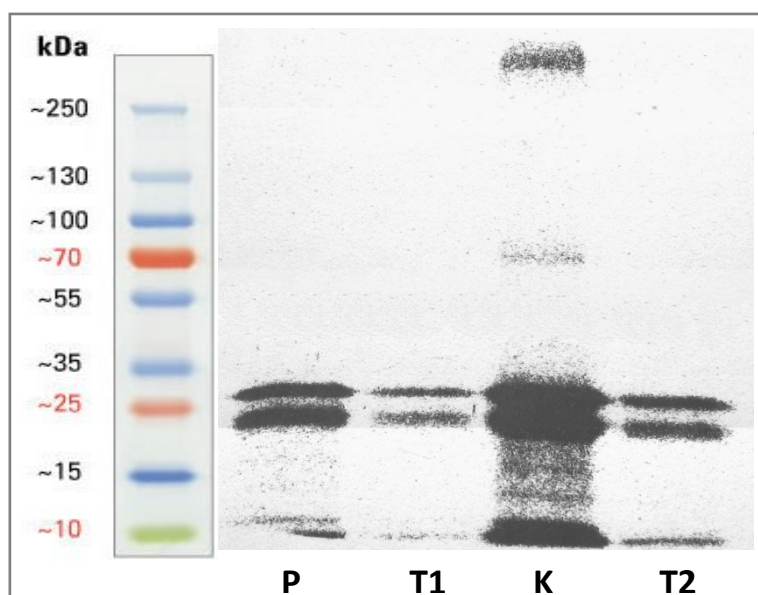
Obrázek 20: Analýza výsledků translace pomocí kitu PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit. V pravém sloupci je reakce obsahující syntetizovaný Ng GspD, v levém pouze translační reakce bez templátu.

Nejprve bylo otestováno kotranslační vkládání sekretinu do membrán. Translační reakce byla inkubována s lecitinovými lipozómy a následně analyzována na nativní elektroforéze. Jak je patrné na obrázku č. 21, oba testované mitochondriální sekretiny, Ng GspD i M249 GspD, se do lipozómů vkládají a tvoří v nich komplexy. Ty však velikostí neodpovídají očekávání – sekretinové komplexy obvykle dosahují velikosti kolem 1 MDa (Korotkov et al., 2011). Přesto jsou však tyto multimery dobře definované a s největší pravděpodobností se nejedná o nespecifické agregáty na povrchu lipozómů – při promývání ureou nedochází k jejich denaturaci. Zajímavé je i to, že Ng GspD tvoří dva velikostně rozrůzněné multimery, ten menší z nich pak ve větším množství.



Obrázek 21: In vitro translace v přítomnosti lecitinových lipozómů. M249 a Ng GspD tvoří v přítomnosti lipozómů komplexy, které se v translační reakci bez membrán neobjevují (T). Množství proteinu vloženého do lipozómů (1) se příliš nemění ani po promytí 2M ureou (2) či inkubaci reakce přes noc (3).

Inzerce do lipidové dvojvrstvy však probíhá u sekretinu z T2SS nezávisle na translaci. Monomery nejdříve formují tzv. prepór, který se následně vloží do membrány (Huysmans et al., 2015). K ověření, zda podobný mechanismus probíhá u sekretinu mitochondriálního byla připravena translační reakce bez lipozómů, která byla zablokována pomocí streptomycinu a s lipozómy následně inkubována. Výsledky na obrázku č. 22 naznačují, že se i eukaryotický sekretin do lipozómů vkládá tímto způsobem – i po promytí ureou sedimentuje protein spolu s lipozómy. Je tedy pravděpodobné, že i za těchto podmínek dochází k vkládání sekretinu do lecitinových membrán. Není však jisté, zda se skutečně jedná o multimery. Proteiny totiž byly rozděleny pouze pomocí denaturující elektroforézy.

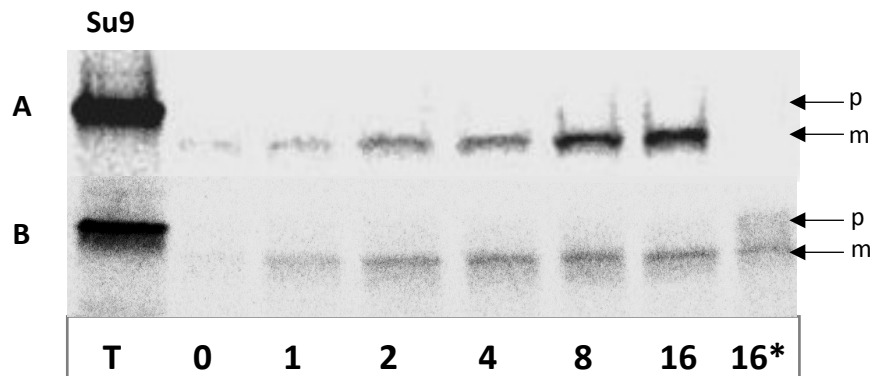


Obrázek 22: Porovnání posttranslačního (P) a kotranslačního (K) vkládání sekretinu do lecitinových lipozómů. *In vitro* přeložený M249 GspD byl inkubován s lipozómy, které byly následně promyty 2M ureou. Promývání ureou nemá vliv na přítomnost GspD ve vzorku. Vkládání sekretinu do lipozómů se tedy nejspíš děje posttranslačně. T1, T2 – Příslušné translační reakce bez promývání ureou.

5.6 Importy sekretinu do mitochondrií

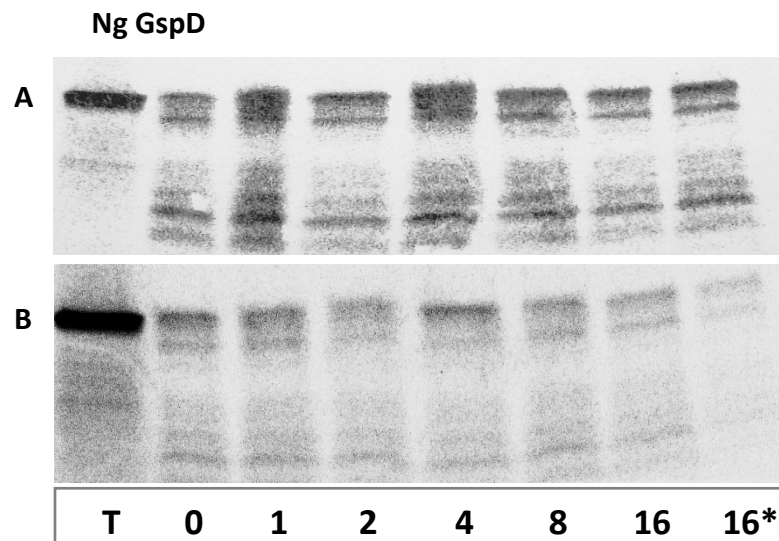
Pro objasnění mechanismu vkládání sekretinu do membrány byl zvolen systém importů do izolovaných mitochondrií. M249 i Ng GspD byly importovány do mitochondrií *S. cerevisiae*, sekretin z *N. gruberi* pak navíc i do mitochondrií pocházejících z buněk tohoto druhu. Jako pozitivní kontrola byl použit syntetický protein složený z presekvence kvasinkové Su9 (podjednotka 9 ATP-syntázy) fúzované s myší dihydrofolát reduktázou. Nejdříve byl optimalizován import tohoto proteinu do mitochondrií *S. cerevisiae* i *N. gruberi*. Jak je patrné na obrázku č. 23, množství proteinu v mitochondriích by mělo v průběhu času vzrůstat. Pokud je v průběhu importu odštěpena signální

sekvence, měla by být patrná změna velikosti proteinu v mitochondriích oproti proteinu z translační reakce. Poslední vzorek, označený jako 16*, pak testuje, zda je protein při transportu závislý na protonovém gradientu. Protein je s mitochondriemi inkubován po dobu 16 minut, avšak za přítomnosti protonoforu. Su9-DHFR jako syntetický substrát lokalizuje mitochondriální matrix a destrukce membránového potenciálu zabrání jeho transportu do mitochondrie. Naopak u sekretinu, jako předpokládané součásti vnější membrány, by zkratování membránového potenciálu nemělo mít na import žádný vliv.



Obrázek 23: *Import Su9 do mitochondrií izolovaných ze S. cerevisiae (A) a N. gruberi (B).* Množství proteinu v mitochondriích v čase (0 – 16 minut) vzrůstá. Je patrné zkrácení importovaného, maturovaného Su9 (m) oproti neimportovanému prekurzoru (p, T), které odpovídá procesování po importu. Přidání protonoforu a tedy destrukce membránového potenciálu zabrání importu (16*) do kvasinkových mitochondrií (A).

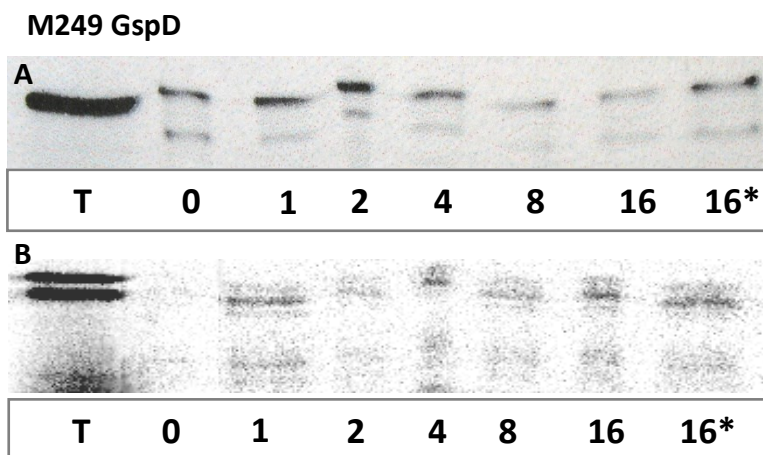
Tato metoda se ukázala být pro sekretin zcela nevhodná. Jak je vidět na obrázcích 24 a 25A, kinetiku vkládání se zachytit nepodařilo – ani v heterologních systémech obou sekretinů s kvasinkovými mitochondriemi, ani v přirozené kombinaci mitochondrií a sekretinu z *N. gruberi*.



Obrázek 24: *Import sekretinu Ng GspD do izolovaných mitochondrií S. cerevisiae (A) a N. gruberi (B).* Množství proteinu s přibývajícím časem (0 – 16 minut) nijak nepřibývá. Vliv na import nemá ani přidání protonoforu (16*). Oproti neimportované kontrole (T) se navíc objevuje velké množství degradačních produktů.

Protože je sekretin pravděpodobně schopen samovolného vkládání do membrán, byl importní protokol upraven za účelem zabránit neasistovanému vkládání během alespoň po uplynutí doby importu. V původním protokolu (obrázek 25A) byly vzorky po ukončení importní reakce ponechány na ledu do uplynutí doby importu ostatních vzorků a teprve poté

byla ke všem přidána proteináza K. V upraveném protokolu pak byla každý alikvót vystaven působení proteinázy K ihned po odběru. Díky tomuto opatření tak mitochondrie odebrané v čase 0 min neobsahovaly téměř žádný protein (obrázek 25B).



Obrázek 25: *Import sekretinu M249 GspD do izolovaných mitochondrií S. cerevisiae. Množství proteinu s přibývajícím časem (0 – 16 minut) nijak nepřibývá. Vliv na import nemá ani přidání protonoforu (16*). Okamžité přidání proteinázy K (B) oproti původnímu protokolu (A) zabránil další inzerci sekretinu během inkubace na ledu.*

5.7 Stanovení interakcí Ng GspD pomocí Y2HS

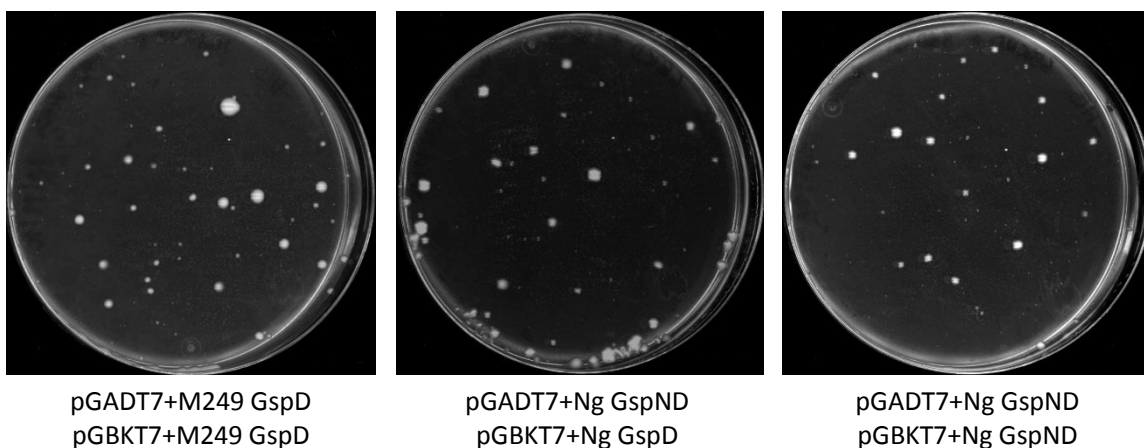
Pro zjištění interakcí sekretinu s dalšími podjednotkami T2SS u *N. gruberi* byl použit kvasinkový dvouhybridní systém. Pomocí Y2HS byly Mgr. Alžbětou Krupičkovou úspěšně prokázány některé interakce mezi podjednotkami T2SS u *M. sp. str. 249* – konkrétně se jednalo o dvojici GspD + GspND (sekretin a jeho N-koncová doména) a GspD + GspD. Právě díky silné interakci mezi dvěma sekretinovými monomery z *M. sp. str. 249* byla tato dvojice vybrána jako pozitivní kontrola pro tuto sérii experimentů. Jako negativní kontrola byla užívána dvojice prázdných plazmidů pGADT7 a pGBKT7. Do obou těchto plazmidů také byly zaklonovány testované geny – GspD, GspND a GspG1. V tabulce č. 1 jsou podrobně rozepsány všechny vyzkoušené kombinace.

Těmito dvojicemi plazmidů byly kvasinky kotransformovány. Následně byly rozetřeny na selekční plotny. Z porostlých SD -Trp/ -Leu /-His ploten byly buňky nasazeny do média pro tvorbu ředící řady.

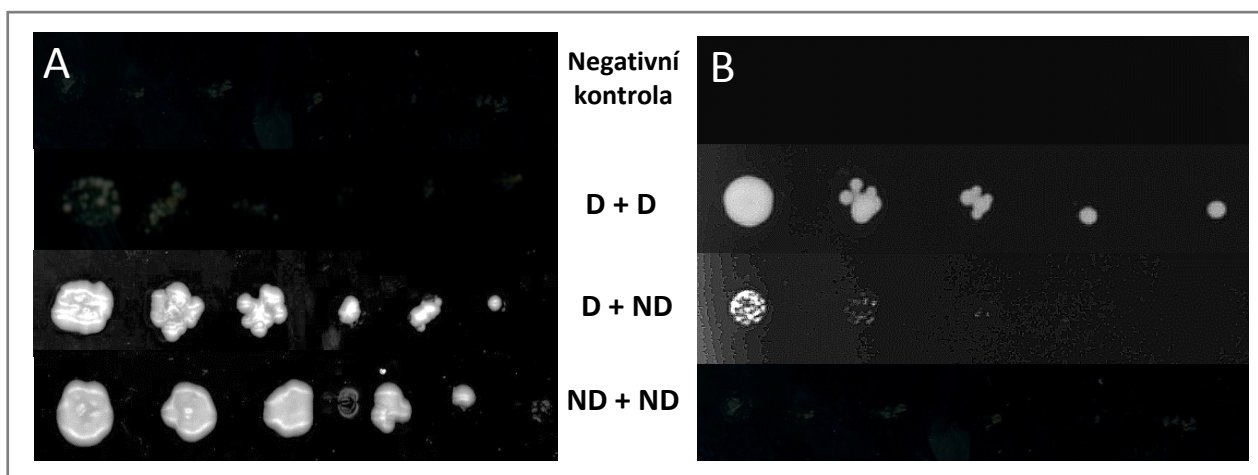
Tabulka 1: Kombinace genů z *N. gruberi* vybrané pro kvasinkový dvouhybridní systém.

pGADT7 (prázdný)	pGBKT7 (prázdný)
PGADT7 + M249 GspD	pGBKT7 + M249 GspD
PGADT7 + GspD	pGBKT7 + GspD
PGADT7 + GspND	pGBKT7 + GspND
PGADT7 + GspG1	pGBKT7 + GspG1
pGADT7 + GspD	pGBKT7 + GspND
PGADT7 + GspD	pGBKT7 + GspG1
PGADT7 + GspND	pGBKT7 + GspD
PGADT7 + GspND	pGBKT7 + GspG1
PGADT7 + GspG1	pGBKT7 + GspD
PGADT7 + GspG1	pGBKT7 + GspND

Na obrázku č. 26 jsou ukázány dvě pozitivní interakce – pGADT7+GspND s pGBKT7+GspD a pGADT7+GspND s pGADT7+GspND. Ty byly poté potvrzeny i pomocí ředící řady. Na rozdíl od T2SS z *M. sp.* str. 249 však nebyla prokázána interakce mezi dvěma sekretinovými monomery a naopak byla navíc zjištěna interakce mezi dvěma N-koncovými doménami GspND (obrázek č. 27). Jedním z možných vysvětlení je, že GspND se u *N. gruberi* uplatňuje při multimerizaci GspD.



Obrázek 26: **Protein-proteinové interakce Ng GspD stanovené pomocí Y2HS.** Kromě pozitivní kontroly (M249 GspD + M249 GspD) porostly i plotny s kotransformanty GspD + GspND a GspND + GspND z *N. gruberi*.



Obrázek 27: **Potvrzení pozitivních protein-proteinových interakcí pomocí ředící řady.** U sekretinu z *N. gruberi* byly prokázány interakce mezi *GspD* + *GspND* a dvěma monomery *GspND* (A). Interakce mezi dvěma *GspD* byla potvrzena pouze u genů z *M. sp.* str. 249. (B, výsledky získané Mgr. Alžbětou Krupičkovou), kde naopak na selekčních plotnách nerostly kvasinky kotransformované dvěma *GspND*.

6 Diskuze

Sekretiny jsou proteiny vytvářející póry ve vnější membráně některých gramnegativních bakterií. Jsou součástí sekrečních systémů typu II a III, systémů pro tvorbu pilu typu IV a přirozenou transformaci a podílejí se na exportu filamentárních fágů z napadených bakteriálních buněk. V naší laboratoři byl sekretin nalezen spolu s několika dalšími podjednotkami T2SS také v mitochondriích některých jednobuněčných eukaryot. Ve všech jmenovaných systémech hrají sekretiny nezastupitelnou úlohu. Studium eukaryotického GspD by proto mohlo přinést cenné informace o funkci objevených bakteriálních proteinů v mitochondriích těchto protist. Jak již bylo zmíněno, tyto čtyři objevené proteiny se nejvíce podobají podjednotkám z bakteriálního T2SS. Díky tomu mohly být pro testování vlastností mitochondriálního sekretinu použity postupy podobné těm, jež byly navrženy pro studium sekretinu z T2SS.

6.1 Bioinformatická analýza sekretinů

Bakteriální sekretiny se skládají z C-koncové domény tvořící vlastní pór v membráně a jedné či několika periplazmatických N-koncových domén. U eukaryotických sekretinů jsou C- a N-koncová část kódovány jako dva oddělené proteiny – GspD a GspND. Alignment GspD a C-koncové domény bakteriálních sekretinů z T2SS ukázal, že v průběhu evoluce zůstala sekvence konzervovaná především na samém C-konci. Z N-koncových domén N1-N3 pak zůstala zachována pouze jedna. Podle alignmentu lokalizují eukaryotické GspND s největší pravděpodobností do oblasti odpovídající N1 doméně. Bakteriální subdomény N1-N3 jsou však sobě navzájem velice podobné, původ GspND proto nelze pomocí alignmentů s jistotou určit.

Zajímavé výsledky přinesla fylogenetická analýza eukaryotických sekretinů. Mitochondriální GspD se podle očekávání ukázaly být monofyletické. Nejsou však vnitřní skupinou sekretinů z T2SS, ale řadí se sestersky k nim. GspD z T2SS a z mitochondrií eukaryot tak zřejmě představují proteiny odvozené od sekretinů z T4PS. Současné sekretiny z T2SS bakterií a eukaryot se tak mohly vyvinout z jednoho společného předka, který by mohl pocházet jak z T4PS, tak i z potenciálního původnějšího typu T2SS. Vysoká rozrůzněnost mezi současným bakteriálním a mitochondriálním T2SS by pak byla v souladu s dobou, po kterou se mitochondrie z bakterií vyvíjely. Protože jsou mitochondriální sekretiny stejně jako ty z T2SS schopné samostatné inserce do membrány, došlo k oddělení těchto dvou linií nejspíš až po vzniku této vlastnosti. Pro potvrzení získaných výsledků bude třeba vytvořit podrobnější fylogenetický strom zahrnující více různých bakteriálních sekretinů, navržený sled událostí by však dobře korespondoval se skutečností, že podjednotky kódované u eukaryot (tedy GspD, GspE, GspF a GspG) se shodují s těmi, které jsou homologní mezi T2SS a T4PS (Korotkov et al., 2012). Bohužel porovnání bakteriálních a eukaryotních sekvencí nepřineslo dostatečnou

informaci o přesnějším původu eukaryotních T2SS. Tedy, zda se jedná o proteiny, které byly ve výbavě bakteriálního předka mitochondrie nebo o výsledek pozdějšího horizontálního přenosu genů. Výsledek fylogenetických analýz je však výrazně ovlivněn omezeným výběrem sekvencí, který je v současné době k dispozici.

Predikce struktury eukaryotických sekretinů odhalila konzervované motivy v GspD i GspND z *M. sp.* str. 249. Ty se pravděpodobně skládají do stejných sekundárních struktur, které se objevují v C- i N-koncové doméně bakteriálního sekretinu. Modely uměle vytvořeného fúzního proteinu GspD s GspND ukázaly, že monomery mitochondriálních sekretinů mohou zaujímat všeobecně podobnou topologii jako bakteriální GspD. Dále bylo zjištěno, že sekvenčně mají k bakteriálním sekretinům nejbližší GspD z *M. sp.* str. 249, *M. jakobiformis* a *N. damariscottae*. Z tohoto důvodu byl první ze jmenovaných organismů vybrán jako modelový a jeho geny pro podjednotky T2SS použity pro laboratorní experimenty. Jako druhý modelový organismus sloužila *N. gruberi*, jejíž genové sekvence sice nejsou tak kvalitní z důvodu nekompletního genomového projektu a navíc vykazují největší odlišnost od bakteriálních, ale zato je možno ji laboratorně kultivovat a využít například k izolaci mitochondrií. Techniky genové manipulace tohoto prvoka však doposud vyvinuty nebyly.

6.2 Skládání a vlastnosti eukaryotických sekretinových multimerů

Pokud je bakteriální GspD exprimován v *E. coli* bez signálního peptidu, dochází k okamžitému zastavení růstu kultury. To proto, že sekretin multimerizuje ve vnitřní bakteriální membráně a zkratuje membránový potenciál bakterií (Guilvout et al., 2008). K ověření hypotézy, že i eukaryotický GspD je schopen vytvářet membránové komplexy, byl navržen jednoduchý růstový experiment. Expresní kmen *E. coli* BL21 (DE3) byl za tímto účelem transformován Ng GspD a M249 GspD bez signálního peptidu. Vliv přítomnosti sekretinu na bakteriální kulturu byl poté sledován pomocí měření optické denzity. Zatímco takto exprimovaný sekretin z *M. sp.* str. 249 je podobně jako bakteriální GspD pro bakterie vysoce toxický a způsobuje okamžité hynutí bakterií, sekretin z *N. gruberi* pouze zpomaluje růst kultury. Výsledky získané z růstových pokusů byly následně ověřeny i pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Barvení specifické pro mrtvé buňky ukázalo, že produkce M249 GspD bez signálního peptidu skutečně zapříčiňuje smrt bakterií a nikoliv pouze zástavu dělení.

Sekretiny lze rozdělit na dvě podskupiny podle jejich schopnosti skládat se samovolně v přítomnosti membrán. Zatímco například sekretiny z T4PS tuto vlastnost postrádají, ty z T2SS vytvářejí *in vitro* v membránách obdobné komplexy jako v případě, že jsou exprimovány v bakteriích (Nickerson et al., 2012). Pro zařazení eukaryotických sekretinů do jedné z těchto podskupin byly

GspD z *N. gruberi* a *M. sp.* str. 249 *in vitro* translatovány v přítomnosti lecitinových lipozómů a následně analyzovány na nativní elektroforéze. Bylo zjištěno, že oba testované sekretiny za těchto podmínek vytvářejí komplexy, avšak výrazně menší, než se předpokládalo. Velikost bakteriálních sekretinových pórů obsahujících 12-15 podjednotek se pohybuje kolem 1 MDa (Korotkov et al., 2011). M249 GspD složený v lecitinové membráně oproti tomu dosahoval velikosti pouze kolem 150 kDa, což při velikosti monomeru 22 kDa odpovídá komplexu o šesti podjednotkách. Ng GspD, jenž je o 3 kDa větší, vytváří v lipozómech dva různě velké komplexy. Většina proteinu se vyskytuje nejspíš ve formě trimeru (velikost kolem 70 kDa), v menší míře se pak objevuje i komplex o 150 kDa, stejně jako u sekretinu z *M. sp.* str. 249. Také celkové množství proteinu vloženého do membrány je u Ng GspD nižší, přestože účinnost translace těchto dvou proteinů je podobná.

Podle růstových pokusů a *in vitro* multimerizace lze předpokládat, že sekretin z *M. sp.* str. 249 je pravděpodobně schopen tvořit póry bez další asistence. Multimerizace Ng GspD je oproti tomu výrazně méně efektivní. Při jeho expresi nedochází k okamžitému hynutí bakterií, nýbrž pouze ke zpomalení růstu kultury. Stejně tak samovolná inserce do membrán se odehrává s nižší pravděpodobností. Je tedy možné, že tento vyžaduje sekretin k rychlému a účinnému skládání *in vivo* koexpresi s dalším, asistenčním proteinem.

Z předběžných výsledků se zdá, že se eukaryotní sekretiny do membrány vkládají až posttranslačně, stejně jako GspD z T2SS (Huysmans et al., 2013). Sekretin lze v membránách detekovat i tehdy, jsou-li lipozómy přidány k M249 GspD až po zastavení translační reakce pomocí streptomycinu. Protože však výsledky tohoto experimentu byly analyzovány pouze na SDS elektroforéze, nelze s jistotou říci, zda při posttranslačním vkládání dochází k tvorbě komplexů.

Bude-li potvrzeno, že mitochondriální sekretin tvoří pouze hexamery, bude třeba uvažovat nad možnou změnou funkce T2SS v mitochondriích. V takovém případě by byl průměr sekretinového kanálu přibližně poloviční – a vlákno pseudopilu by tak nemohlo procházet skrz tento pór. I transportovaný substrát by se musel velikostně lišit od substrátů bakteriálního T2SS.

Pokud je bakteriální sekretin exprimován v *E. coli* se signální sekvencí pro Sec dráhu, ale bez patřičného pilotinu, je transportován do periplazmatického prostoru, odkud se vkládá do vnitřní membrány (Guilvout et al., 2006). V takovém případě spouští odpověď na fágový šok, projevující se mimo jiné zvýšeným obsahem proteinu PspA v buňkách (Hardie et al., 1996). Podle obdobných experimentů provedených na M249 a Ng GspD s připojenou signální sekvencí PelB se zdá, že tyto sekretiny hladinu PspA nezvyšují. Přítomnost sekretinů v analyzovaných buňkách se však nepodařilo s jistotou prokázat. Není tedy jisté, zda k expresi skutečně docházelo.

Z růstových pokusů navíc vyplynulo, že přítomnost PelB signální sekvence nijak nesnižuje toxicitu eukaryotického sekretinu. Pokud je M249 GspD s tímto signálním peptidem exprimován v *E. coli*, dochází k okamžitému hynutí buněk. Odůvodnění tohoto jevu mohou být dvě. Zvolený signální peptid buď není dostačující pro transport mitochondriálního sekretinu do periplazmatického prostoru a GspD se proto vkládá do vnitřní membrány z cytoplazmy, stejně jako při produkci varianty bez signální sekvence. Nebo k transportu dochází, avšak vzniklé póry se liší od těch z T2SS – jsou nespécificky propustné, takže způsobují zkratování membránového potenciálu při vkládání z cytoplazmy i periplazmy. Signální peptid PelB byl zvolen z toho důvodu, že je s úspěchem využíván při produkci pseudopilinu GspG z *K. oxytoca* v *E. coli*. V případě připojení PelB signálu na N-konec je pseudopilin přes Sec translokou transportován kotranslačně pomocí SRP dráhy. Rozhodujícím faktorem pro výběr kotranslační dráhy je však pravděpodobně pseudopilinová presekvence, která je značně hydrofobní (Francetic et al., 2007). PelB signální sekvence samotná ale není natolik hydrofobní, aby translaci zastavila. Protein s tímto signálním peptidem tak bývá do periplazmy transportován spíše posttranslačně (Steiner et al., 2006). Vznikající protein je navázán chaperonem SecB, který zajistí jeho navedení na translokou. SecB však *in vivo* rozpoznává jen velmi úzké spektrum substrátů (Kumamoto and Francetić, 1993). Navíc pro substráty, které v cytoplazmě rychle zaujmají nativní konformaci, se tato dráha ukázala být nevhodnou, nedokázala totiž zajistit transport takových proteinů do periplazmy. Až použití signálního peptidu pro SRP dráhu, jež zprostředkovává transport spřažený s translací, zabránilo hromadění těchto substrátů v cytoplazmě (Schierle et al., 2003). Ani zelený fluorescenční protein GFP nelze translokovat do periplazmy připojením PelB signálu. V takovém případě se totiž GFP hromadí ve frakci vnitřní bakteriální membrány (Linton et al., 2012). Je možné, že obdobné problémy nastávají i u sekretinu. Účinným řešením by proto mohla být výměna signálního peptidu PelB za některou ze sekvencí rozpoznávaných SRP, například DsbA. Pokud by se prokázalo, že tento nový fúzní protein vykazuje nižší toxicitu než sekretin s PelB signální sekvencí, bylo by vhodné zopakovat experiment s detekcí fágové šokové odpovědi. Nelze totiž říci, že eukaryotický sekretin při vkládání do vnitřní membrány z periplazmatického prostoru nevyvolává syntézu PspA, pokud není jisté, zda k transportu do periplazmy vůbec skutečně dochází. Kdyby navržené opatření skutečně zajistilo sníženou toxicitu sekretinu, dalo by se navíc uvažovat i o expresi eukaryotického GspD v *E. coli* a jeho následné purifikaci pro strukturní a další studie. Při expresi M249 GspD s PelB jsou totiž výtěžky natolik nízké, že jej není možno s úspěchem purifikovat.

6.3 Import sekretinu do mitochondrií

Podjednotky eukaryotického T2SS jsou kódovány v jádře, lokalizují však do mitochondrií. Proto musí být do této organely doručeny z cytoplazmy. Pokud u mitochondriálního sekretinu,

stejně jako u ostatních β -barelových proteinů vnější mitochondriální membrány, předpokládáme zachování původní bakteriální orientace, měl by se do této membrány vkládat z mezimembránového prostoru. Na rozdíl od jednořetězcových β -barelů je však možné, že sekretinový komplex nejspíš nevyžaduje k inzerci do vnější mitochondriální membrány SAM komplex. Ten je zodpovědný za skládání β -barelových proteinů jako je Tom40 i samotná centrální podjednotka SAM komplexu, Sam50 (Höhr et al., 2015). Je totiž schopen samostatné inzerce do lipidové dvojvrstvy obdobně jako sekretiny z bakteriálního T2SS, které se ukázaly být nezávislé na BAM, funkčním ortologu SAM komplexu (Collin et al., 2007). Navíc ve své sekvenci nenesou konzervovaný β -signál, který je nezbytný pro rozpoznání polypeptidu v mezimembránovém prostoru. Monomery GspD a GspND jsou tak pravděpodobně přeneseny skrz Tom40 do periplazmatického prostoru, kde formují pór, jenž se následně vloží do membrány.

Mechanismus importu do mitochondrií byl testován *in vitro*. Izolované mitochondrie z *N. gruberi* a *S. cerevisiae* byly inkubovány s *in vitro* translatovaným sekretinem a byla sledována kinetika importu v čase. Ukázalo se však, že za stanovených experimentálních podmínek není sekretin do mitochondrií správně importován, vzrůstající množství proteinu v mitochondriích nebylo možno pozorovat. Použitý protokol byl vyvinutý pro solubilní proteiny vstupující posttranslačně do mitochondriální matrix. Je proto pravděpodobné, že protein o předpokládané lokalizaci ve vnější mitochondriální membráně bude vyžadovat odlišné experimentální podmínky. Například protonofor obsažený ve stop pufru, který inhibuje transport proteinů přes vnitřní membránu, nebude mít žádný účinek na průběh tohoto děje. Dalším možným důvodem je i absence cytozolických chaperonů během přípravy proteinu i v průběhu vlastního importního experimentu. Bez asistence těchto proteinů sekretin možná snadno agreguje a je nekompatibilní s importním aparátem. Potenciální optimalizace protokolu by tak mohla namísto PURExpress systému zahrnovat *in vitro* translaci v lyzátu králičích retikulocytů, který obsahuje cytozolické faktory. I vlastní importní reakce by mohla být obohacena o cytozolickou frakci, zvláště pak při experimentu s mitochondriemi z *N. gruberi*, kde by mohl být přítomen specifický chaperon. Přidání proteinázy K ihned po odebrání alikvótu mitochondrií či použití vyšší koncentrace močoviny v přípravě přeloženého sekretinu by mohlo zabránit samovolnému vkládání či nespecifické agregaci proteinu na mitochondriální membránu.

6.4 Interakce mitochondriálního sekretinu s ostatními podjednotkami T2SS

GspD z bakteriálního T2SS interaguje s pilotinem GspS, pseudopilinem GspG, periplazmatickou spojkou GspC a s transportovaným substrátem (Korotkov et al., 2012). Pro rozklíčování vztahů mezi podjednotkami T2SS v *N. gruberi* byl použit kvasinkový dvouhybridní systém. Protože GspC a GspS nejsou v eukaryotním T2SS známy, očekávány byly interakce dvou

sekretinových monomerů, sekretinu a jeho N-koncové domény, sekretinu s pseudopilinem, případně dvou N-koncových domén. Y2HS potvrdil u *N. gruberi* pouze dvě z nich – GspD + GspND a GspND + GspND. Kvasinky kotransformované plazmidy se sekretinovými monomery překvapivě na selekčních plotnách nenarostly, na rozdíl od T2SS z *M. sp.* str. 249, kde se jednalo o nejsilnější detekovanou interakci. Tento experiment, provedený Mgr. Alžbětou Krupičkovou, naopak neprokázal vzájemnou vazbu dvou N-koncových domén. Interakce mezi GspD a GspND však byla potvrzena u obou testovaných organismů. Je tedy možné, že pro úspěšný vznik sekretinového komplexu u *N. gruberi* je zapotřebí i GspND, jenž zahajuje jeho multimerizaci. Oproti tomu GspD z *M. sp.* str. 249 dokáže tvořit komplexy sám o sobě. Tím by mohla být vysvětlena i nižší toxicita Ng GspD, stejně jako jeho neefektivní vkládání do lecitinových lipozómů. Tato skutečnost by odpovídala i výsledkům získaným při studiu bakteriálního GspD z *K. oxytoca* – i zde je pro úspěšnou multimerizaci sekretinu vyžadována alespoň část N-koncové domény, konkrétně subdomény N3 (Guilvout et al., 2011).

7 Závěr

Tato práce se zabývá proteinem z rodiny sekretinů objeveným v mitochondriích některých eukaryot spolu s několika podjednotkami bakteriálního T2SS. Právě kvůli předpokládané příbuznosti tohoto sekretinu s bakteriálním GspD je v literárním úvodu kladen důraz na shrnutí dosavadních znalostí o bakteriálním T2SS, představeny jsou však i ostatní systémy využívající sekretinový komplex.

Cílem experimentální části této práce je charakterizovat mitochondriální sekretin, především pak u zvolených modelových druhů, *N. gruberi* a *M. sp. str. 249*. Bioinformatická analýza těchto sekretinů ukázala, že mitochondriální sekretiny jsou pravděpodobně sesterskou skupinou k sekretinům z bakteriálního T2SS a nejspíše tvoří podobné sekundární struktury. Oba testované mitochondriální sekretiny jsou toxické pro expresní kmeny *E. coli*, pravděpodobně kvůli tvorbě pórů v jejich vnitřní membráně. Exprese M249 GspD růst bakteriální kultury dokonce zcela zastavuje. Podobný fenotyp vykazují i bakterie syntetizující M249 GspD se signálním peptidem PelB, jenž by měl toxicitu sekretinu snižovat. Z tohoto důvodu nebylo možné využít heterologní exprese v *E. coli* k purifikaci tohoto proteinu pro strukturní studie. Sekretiny z *M. sp. str. 249* i *N. gruberi* jsou schopné inserce do umělých membrán, kde nejspíše tvoří komplexy. Tato vlastnost znesnadňuje sledování kinetiky importu sekretinu do izolovaných mitochondrií. Účinnost vkládání je u Ng GspD nižší, což by korespondovalo i s jeho mírnějším vlivem na viabilitu bakteriální populace. Jedním z možných vysvětlení je to, že tento sekretin vyžaduje pro efektivní multimerizaci další protein. Může se jednat například o GspND, neboť na rozdíl od T2SS v *M. sp. str. 249* nebyla u *N. gruberi* prokázána interakce dvou sekretinových monomerů, ale pouze dvou N-koncových domén tohoto sekretinu, tedy GspND.

Z tohoto důvodu by bylo v budoucnu zajímavé otestovat například koexpresi Ng GspD a GspND v *E. coli*, zda se zvýší toxicita tohoto sekretinu. Multimerizaci sekretinu v přítomnosti N-koncové domény by bylo možno sledovat i v lecitinových lipozómech. V neposlední řadě by pak bylo vhodné pokusit se optimalizovat expresi sekretinu v *E. coli* a následný purifikační proces. V případě úspěchu by se totiž otevřelo mnoho dalších možností pro studium tohoto neobvyklého proteinu, které by mohlo přispět k pochopení významu a funkci homologů podjednotek T2SS v mitochondriích.

8 Seznam zkratek

AspS	Alternativní pilotin u sekretinů typu <i>Vibrio</i>
BAM	B-barrel assembly machinery (komplex pro skládání β -barelových proteinů bakterií)
DHFR	Dihydrofolát reduktáza
EPEC	Enteropatogenní kmen <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní kmen <i>E. coli</i>
GSP	General secretory pathway (obecná sekretorická dráha)
GspA, B	Proteiny T2SS vážící peptidoglykan
GspC	Protein T2SS spojující komplex vnitřní a vnější membrány
GspD	Sekretin z T2SS
GspE	Sekreční ATPáza z T2SS
GspF, L, M	Proteiny komplexu vnitřní membrány z T2SS
GspG	Hlavní pseudopilin z T2SS
GspH, I, J, K	Vedlejší pseudopiliny z T2SS
GspND	N-koncová doména mitochondriálního sekretinu
GspO	Prepilin peptidáza z T2SS
GspS	Pilotin sekretinů typu <i>Klebsiella</i>
InvG	Sekretin z T3SS (u bakterií rodu <i>Salmonella</i>)
Lol	Lipoprotein outer membrane localization pathway (dráha zajišťující vkládání lipoproteinů do vnější membrány)
M249 GspD	Sekretin z <i>M. sp.</i> str. 249
Ng GspD	Sekretin z <i>N. gruberi</i>
PilQ	Sekretin z T4PS
pIV	Sekretin filamentárních fágů
PspA	Phage shock response protein A (protein A odpovědi na fágový šok)
SAM	Sorting and assembly machinery (komplex pro skládání β -barelových proteinů v mitochondrii)
Sec	Obecná sekretorická dráha
SRP	Signal recognition particle (částice rozpoznávající signál)
T2SS	Sekreční systém typu II
T3SS	Sekreční systém typu III

T4PS	Systém pro skládání pilu typu IV
Tat	Twin-arginin translokáza
Tim	Translocase of the inner membrane (transportér vnitřní mitochondriální membrány)
Tom	Translocase of the outer membrane (transportér vnější mitochondriální membrány)
UPEC	Uropatogenní kmen <i>E. coli</i>
Y2HS	Yeast two hybrid system (kvasinkový dvouhybridní systém)

9 Použitá literatura

- Assalkhou, R., Balasingham, S., Collins, R.F., Frye, S.A., Davidsen, T., Benam, A. V, Bjørås, M., Derrick, J.P., and Tønjum, T. (2007). The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA. *Microbiology* 153, 1593–1603.
- Ast, V.M., Schoenhofen, I.C., Langen, G.R., Stratiolo, C.W., Chamberlain, M.D., and Howard, S.P. (2002). Expression of the ExeAB complex of *Aeromonas hydrophila* is required for the localization and assembly of the ExeD secretion port multimer. *Mol. Microbiol.* 44, 217–231.
- Averhoff, B. (2009). Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 611–626.
- Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 43, 475–485.
- Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.* 6, 2745–2745.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36–44.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, W252–8.
- Bleves, S., Lazdunski, E., Ge, M., and Filloux, A. (1999). Structure-Function Analysis of XcpP, a Component Involved in General Secretory Pathway-Dependent Protein Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181, 4012–4019.
- Bolhuis, A., Mathers, J.E., Thomas, J.D., Barrett, C.M., and Robinson, C. (2001). TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 20213–20219.
- Brisette, J.L., and Russel, M. (1990). Secretion and membrane integration of a filamentous phage-encoded morphogenetic protein. *J. Mol. Biol.* 211, 565–580.
- Burkhardt, J., Vonck, J., and Averhoff, B. (2011). Structure and function of PilQ, a secretin of the DNA transporter from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *J. Biol. Chem.* 286, 9977–9984.
- Butler, P.J.G. (1976). Filamentous phage assembly. *Nature* 260, 283–284.
- Camberg, J.L., Johnson, T.L., Patrick, M., Abendroth, J., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2006). Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *EMBO J.* 26, 19–27.
- Carbonnelle, E., Hélaine, S., Prouvensier, L., Nassif, X., and Pelicic, V. (2004). Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Mol. Microbiol.* 55, 54–64.
- Cisneros, D. a, Bond, P.J., Pugsley, A.P., Campos, M., and Francetic, O. (2012). Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J.* 31, 1041–1053.
- Clements, J.D., and Finkelstein, R.A. (1979). Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.* 24, 760–769.
- Collin, S., Guilvout, I., Chami, M., and Pugsley, A.P. (2007). YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD. *Mol. Microbiol.* 64, 1350–1357.
- Collin, S., Guilvout, I., Nickerson, N.N., and Pugsley, A.P. (2011). Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin. *Mol. Microbiol.* 80, 655–665.
- Collins, R.F., Frye, S.A., Kitmitto, A., Ford, R.C., Tønjum, T., and Derrick, J.P. (2004). Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 279, 39750–39756.
- Daefler, S., and Russel, M. (1998). The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane

- lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol. Microbiol.* **28**, 1367–1380.
- Daefler, S., Guilvout, I., Kim, R., Pugsley, A.P., and Russel, M. (1997). The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIV f1 function. *Mol. Microbiol.* **24**, 465–475.
- Davis, B.M., Lawson, E.H., Sandkvist, M., Ali, A., Sozhamannan, S., and Waldor, M.K. (2000). Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTXphi. *Science* **288**, 333–335.
- Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2009). The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. *J. Biol. Chem.* **284**, 34580–34589.
- Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2011). Deciphering the Xcp Pseudomonas aeruginosa type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J. Biol. Chem.* **286**, 40792–40801.
- Dunstan, R.A., Heinz, E., Wijeyewickrema, L.C., Pike, R.N., Purcell, A.W., Evans, T.J., Praszkiel, J., Robins-Browne, R.M., Strugnell, R. a, Korotkov, K. V, et al. (2013). Assembly of the type II secretion system such as found in *Vibrio cholerae* depends on the novel Pilotin AspS. *PLoS Pathog.* **9**, e1003117.
- Durand, E., Michel, G., Voulhoux, R., Kürner, J., Bernadac, A., and Filloux, A. (2005). XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. *J. Biol. Chem.* **280**, 31378–31389.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797.
- Enfert, C., Ryterl, A., and Pugsley, A.P. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J.* **6**, 3531–3538.
- Enfert, C., Reyss, I., Wandersman, C., Pugsley, A.P., and Bank, D. (1989). Protein secretion by gram-negative bacteria. Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **264**, 17462–17468.
- Feng, J., Model, P., and Russel, M. (1999). A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Mol. Microbiol.* **34**, 745–755.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- Finkelstein, R.A., Norris, H.T., and Dutta, N.K. (1964). Pathogenesis experimental cholera in infant rabbits. I. observations on the intraintestinal infection and experimental cholera produced with cell-free products. *J. Infect. Dis.* **114**, 203–216.
- Flores-Kim, J., and Darwin, A.J. (2016). The Phage Shock Protein Response. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 83–101.
- Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C. a, and Pugsley, A.P. (2007). Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. *J. Bacteriol.* **189**, 1783–1793.
- Friedrich, A., Prust, C., Hartsch, T., Henne, A., and Aeverhoff, B. (2002). Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 745–755.
- Friedrich, A., Rumszauer, J., Henne, A., and Aeverhoff, B. (2003). Pilin-like proteins in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27: implication in competence for natural transformation and links to type IV pilus biogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3695–3700.
- Genin, S., and Boucher, C.A. (1994). A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 112–118.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., and Lithgow, T. (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* **164**, 19–24.

- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P., Boucher, C., et al. (1995). The hrp gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol. Microbiol.* *15*, 1095–1114.
- Gold, V.A.M., Salzer, R., Averhoff, B., and Kühlbrandt, W. (2015). Structure of a type IV pilus machinery in the open and closed state. *Elife* *4*.
- Gough, C.L., Genin, S., Zischek, C., and Boucher, C.A. hrp genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* *5*, 384–389.
- Gray, M.D., Bagdasarian, M., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2011). In vivo cross-linking of EpsG to EpsL suggests a role for EpsL as an ATPase-pseudopilin coupling protein in the Type II secretion system of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* *79*, 786–798.
- Groisman, E.A., and Ochman, H. (1993). Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J.* *12*, 3779–3787.
- Gu, S., Rehman, S., Wang, X., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2012). Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLoS Pathog.* *8*, 1–7.
- Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2006). Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J.* *25*, 5241–5249.
- Guilvout, I., Chami, M., Berrier, C., Ghazi, A., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2008). In Vitro Multimerization and Membrane Insertion of Bacterial Outer Membrane Secretin PulD. *J. Mol. Biol.* *382*, 13–23.
- Guilvout, I., Nickerson, N.N., Chami, M., and Pugsley, A.P. (2011). Multimerization-defective variants of dodecameric secretin PulD. *Res. Microbiol.* *162*, 180–190.
- Guilvout, I., Brier, S., Chami, M., Hourdel, V., Francetic, O., Pugsley, A.P., Chamot-Rooke, J., and Huysmans, G.H.M. (2016). Prepore stability controls productive folding of the BAM-independent multimeric outer membrane secretin PulD. *J. Biol. Chem.* *292*, jbc.M116.759498.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3859–3864.
- Hardie, K.R., Schulze, A., Parker, M.W., and Buckley, J.T. (1995). *Vibrio* spp. secrete proaerolysin as a folded dimer without the need for disulphide bond formation. *Mol. Microbiol.* *17*, 1035–1044.
- Hardie, K.R., Lory, S., and Pugsley, A.P. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* *15*, 978–988.
- Hirst, T.R., Holmgren, J., and Hirst, T.R. (1987). Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7418–7422.
- Hoang, H.H., Nickerson, N.N., Lee, V.T., Kazimirova, A., Chami, M., Pugsley, A.P., and Lory, S. (2011). Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries. *MBio* *2*.
- Hobbs, M., and Mattick, J.S. (1993). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* *10*, 233–243.
- Hodgkinson, J.L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P.C.A., Morris, E.P., Wall, J.S., Lea, S.M., and Blocker, A.J. (2009). Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 477–485.
- Höhr, A.I.C., Straub, S.P., Warscheid, B., Becker, T., and Wiedemann, N. (2015). Assembly of β -barrel proteins in the mitochondrial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 74–88.

- Hu, B., Lara-Tejero, M., Kong, Q., Galán, J.E., and Liu, J. (2017). In Situ Molecular Architecture of the Salmonella Type III Secretion Machine. *Cell* *168*, 1065–1074.e10.
- Huysmans, G.H.M. (2016). Folding outer membrane proteins independently of the beta-barrel assembly machinery: an assembly pathway for multimeric complexes? *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 845–850.
- Huysmans, G.H.M., Guilvout, I., and Pugsley, A.P. (2013). Sequential steps in the assembly of the multimeric outer membrane secretin PulD. *J. Biol. Chem.* *288*, 30700–30707.
- Huysmans, G.H.M., Guilvout, I., Chami, M., Nickerson, N.N., and Pugsley, A.P. (2015). Lipids assist the membrane insertion of a BAM-independent outer membrane protein. *Sci. Rep.* *5*, 15068.
- Chami, M., Guilvout, I., Gregorini, M., Rémy, H.W., Müller, S. a, Valerio, M., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2005). Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. *J. Biol. Chem.* *280*, 37732–37741.
- Ishikawa, D., Yamamoto, H., Tamura, Y., Moritoh, K., and Endo, T. (2004). Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate β -barrel protein assembly. *J. Cell Biol.* *166*, 621–627.
- Jain, S., Mościcka, K.B., Bos, M.P., Pachulec, E., Stuart, M.C.A., Keestra, W., Boekema, E.J., and van der Does, C. (2011). Structural characterization of outer membrane components of the type IV pili system in pathogenic *Neisseria*. *PLoS One* *6*, e16624.
- Jakovljevic, V., Leonardy, S., Hoppert, M., and Søgaard-Andersen, L. (2008). PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* *190*, 2411–2421.
- Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 5952–5956.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* *30*, 3059–3066.
- Katz, L.A., and Grant, J.R. (2015). Taxon-Rich Phylogenomic Analyses Resolve the Eukaryotic Tree of Life and Reveal the Power of Subsampling by Sites. *Syst. Biol.* *64*, 406–415.
- Kazmierczak, B.I., Mielke, D.L., Russel, M., and Model, P. (1994). pIV, a Filamentous Phage Protein that Mediates Phage Export Across the Bacterial Cell Envelope, Forms a Multimer. *J. Mol. Biol.* *238*, 187–198.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* *48*, 1511–1524.
- Koo, J., Tammam, S., Ku, S.-Y., Sampaleanu, L.M., Burrows, L.L., and Howell, P.L. (2008). PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin. *J. Bacteriol.* *190*, 6961–6969.
- Korotkov, K. V, and Hol, W.G.J. (2008). Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 462–468.
- Korotkov, K., Pardon, E., Steyaert, J., and Hol, W.G. (2010). Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *Structure* *17*, 255–265.
- Korotkov, K. V, Krumm, B., Bagdasarian, M., and Hol, W.G.J. (2006). Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* *363*, 311–321.
- Korotkov, K. V, Gonen, T., and Hol, W.G.J. (2011). Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 433–443.
- Korotkov, K. V, Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 336–351.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N., and Furukawa, K. (1986). Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.* *166*, 338–340.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N.

- (2003). An Essential Role of Sam50 in the Protein Sorting and Assembly Machinery of the Mitochondrial Outer Membrane. *J. Biol. Chem.* *278*, 48520–48523.
- Kozjak-Pavlovic, V., Ott, C., Götz, M., and Rudel, T. (2011). Neisserial Omp85 protein is selectively recognized and assembled into functional complexes in the outer membrane of human mitochondria. *J. Biol. Chem.* *286*, 27019–27026.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J.E., Aizawa, S.I., and Aizawa, S.I. (1998). Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* *280*, 602–605.
- Kumamoto, C.A., and Francetić, O. (1993). Highly selective binding of nascent polypeptides by an Escherichia coli chaperone protein in vivo. *J. Bacteriol.* *175*, 2184–2188.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* *33*, 1870–1874.
- Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., et al. (2008). Dissecting Membrane Insertion of Mitochondrial β -Barrel Proteins. *Cell* *132*, 1011–1024.
- Lallemant, M., Login, F.H., Guschinskaya, N., Pineau, C., Effantin, G., Robert, X., and Shevchik, V.E. (2013). Dynamic interplay between the periplasmic and transmembrane domains of GspL and GspM in the type II secretion system. *PLoS One* *8*, e79562.
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M., and Murgier, M. (1990). Secretion of extracellular proteins by Pseudomonas aeruginosa. *Biochimie* *72*, 147–156.
- Le, S.Q., and Gascuel, O. (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 1307–1320.
- Linton, E., Walsh, M.K., Sims, R.C., and Miller, C.D. (2012). Translocation of green fluorescent protein by comparative analysis with multiple signal peptides. *Biotechnol. J.* *7*, 667–676.
- Lu, C., Turley, S., Marionni, S.T., Park, Y.-J., Lee, K.K., Patrick, M., Shah, R., Sandkvist, M., Bush, M.F., and Hol, W.G.J. (2013). Hexamers of the Type II Secretion ATPase GspE from Vibrio cholerae with Increased ATPase Activity. *Structure* *21*, 1707–1717.
- Lybarger, S.R., Johnson, T.L., Gray, M.D., Sikora, A.E., and Sandkvist, M. (2009). Docking and Assembly of the Type II Secretion Complex of Vibrio cholerae. *J. Bacteriol.* *191*, 3149–3161.
- Maier, B., and Wong, G.C.L. (2015). How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces. *Trends Microbiol.* *23*, 775–788.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galán, J.E., and Unger, V.M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* *306*, 1040–1042.
- Martin, P.R., Hobbs, M., Free, P.D., Jeske, Y., and Mattick, J.S. (1993). Characterization of pilQ, a new gene required for the biogenesis of type 4 fimbriae in Pseudomonas aeruginosa. *Mol. Microbiol.* *9*, 857–868.
- Michiels, T., Vanooteghem, J.C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P., and Cornelis, G.R. (1991). Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by Yersinia enterocolitica. *J. Bacteriol.* *173*, 4994–5009.
- Nickerson, N.N., Tosi, T., Dessen, A., Baron, B., Raynal, B., England, P., and Pugsley, A.P. (2011). Outer membrane targeting of secretin PulD protein relies on disordered domain recognition by a dedicated chaperone. *J. Biol. Chem.* *286*, 38833–38843.
- Nickerson, N.N., Abby, S.S., Rocha, E.P.C., Chami, M., and Pugsley, A.P. (2012). A Single Amino Acid Substitution Changes the Self-Assembly Status of a Type IV Piliation Secretin. *J. Bacteriol.* *194*, 4951–4958.
- Nivaskumar, M., and Francetic, O. (2014). Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1568–1577.
- Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A., and Pugsley, A.P. (1999). Secretin

- PilD: association with pilot PilS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 8173–8177.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991). Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3281–3285.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1993). Cleavage, Methylation, and Localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Export Proteins XcpT, XcpU, XcpV, and XcpW. *J. Bacteriol.* *175*, 4375–4382.
- Okon, M., Moraes, T.F., Lario, P.I., Creagh, A.L., Haynes, C.A., Strynadka, N.C.J., McIntosh, L.P., Levine, M.M., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (2008). Structural characterization of the type-III pilot-secretin complex from *Shigella flexneri*. *Structure* *16*, 1544–1554.
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M.N., Russel, M., and Darst, S.A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* *325*, 461–470.
- Paetzel, M., Dalbey, R.E., and Strynadka, N.C. (2000). The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases: A novel antibiotic target. *Pharmacol. Ther.* *87*, 27–49.
- Peabody, C.R. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* *149*, 3051–3072.
- Pineau, C., Guschinskaya, N., Robert, X., Gouet, P., Ballut, L., and Shevchik, V.E. (2014). Substrate recognition by the bacterial type II secretion system: more than a simple interaction. *Mol. Microbiol.* *94*, 126–140.
- Planet, P.J., Kachlany, S.C., DeSalle, R., and Figurski, D.H. (2001). Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 2503–2508.
- Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* *57*, 50–108.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (1999). Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J. Mol. Biol.* *289*, 659–670.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001). An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep.* *2*, 244–248.
- Rapoza, M.P., and Webster, R.E. (1993). The filamentous bacteriophage assembly proteins require the bacterial SecA protein for correct localization to the membrane. *J. Bacteriol.* *175*, 1856–1859.
- Rau, R., and Darwin, A.J. (2015). Identification of YsaP, the Pilotin of the *Yersinia enterocolitica* Ysa Type III Secretion System. *J. Bacteriol.* *197*, 2770–2779.
- Reichow, S.L., Korotkov, K. V., Hol, W.G.J., and Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1226–1232.
- Rumszauer, J., Schwarzenlander, C., and Averhoff, B. (2006). Identification, subcellular localization and functional interactions of PilMNOWQ and PilA4 involved in transformation competency and pilus biogenesis in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.* *273*, 3261–3272.
- Russel, M. (1991). Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol.* *5*, 1607–1613.
- Russel, M., Linderoth, N.A., and Šali, A. (1997). Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* *192*, 23–32.
- Sandkvist, M. (2001). Type II Secretion and Pathogenesis. *Infect. Immun.* *69*, 3523–3535.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P., and Dirita, V.J. (1995). Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* *14*, 1664–1673.
- Sandkvist, M., Michel, L.O., Hough, L.P., Morales, V.M., Bagdasarian, M., Koomey, M., Rita, V.J.D.I., and Bagdasarian, M. (1997). General Secretion Pathway (eps) Genes Required for Toxin Secretion and Outer

- Membrane Biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *179*, 6994–7003.
- Sandkvist, M., Hough, L.P., Bagdasarian, M.M., Cross, A.R., and Way, C.B. (1999). Direct Interaction of the EpsL and EpsM Proteins of the General Secretion Apparatus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *181*, 3129–3135.
- Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., and Wu, L.F. (1998). A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *17*, 101–112.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., Palmer, T., and Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* *17*, 3640–3650.
- Sauvonnnet, N., Vignon, G., Pugsley, A.P., and Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *19*, 2221–2228.
- Semmler, A.B.T., Whitchurch, C.B., and Mattick, J.S. (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* *145*, 2863–2873.
- Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U., and Wickner, W. (1991). $\Delta\mu\text{H}^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* *64*, 927–939.
- Schierle, C.F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D., and Beckwith, J. (2003). 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.
- Schraidt, O., and Marlovits, T.C. (2011). Three-Dimensional Model of Salmonella's Needle Complex at Subnanometer Resolution. *Science* (80-.). *331*, 1192–1195.
- Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., Schmied, W.H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J.E., and Marlovits, T.C. (2010). Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog.* *6*, e1000824.
- Schwarzenlander, C., Haase, W., and Averbhoff, B. (2009). The role of single subunits of the DNA transport machinery of *Thermus thermophilus* HB27 in DNA binding and transport. *Environ. Microbiol.* *11*, 801–808.
- Siewering, K., Jain, S., Friedrich, C., Webber-Birungi, M.T., Semchonok, D.A., Binzen, I., Wagner, A., Huntley, S., Kahnt, J., Klingl, A., et al. (2014). Peptidoglycan-binding protein TsaP functions in surface assembly of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E953-61.
- Skerker, J.M., and Berg, H.C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6901–6904.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2007). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *21*, 2473–2484.
- Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., André, I., Kimbrough, T.G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R.A., Deng, W., Yu, A.C., Finlay, B.B., et al. (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 468–476.
- Steiner, D., Forrer, P., Stumpp, M.T., and Plückthun, A. (2006). Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nat. Biotechnol.* *24*, 823–831.
- Strozen, T.G., Stanley, H., Gu, Y., Boyd, J., Bagdasarian, M., Sandkvist, M., and Howard, S.P. (2011). Involvement of the GspAB Complex in Assembly of the Type II Secretion System Secretin of *Aeromonas* and *Vibrio* Species. *J. Bacteriol.* *193*, 2322–2331.
- Strozen, T.G., Li, G., and Howard, S.P. (2012). YghG (GspS β) is a novel pilot protein required for localization of the GspS β type II secretion system secretin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* *80*, 2608–2622.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J. Bacteriol.* *179*, 2503–2511.
- Tauschek, M., Gorrell, R.J., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M. (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 7066–7071.

Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., Martin, W., and Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5, 123–135.

Tosi, T., Nickerson, N.N., Mollica, L., Jensen, M.R., Blackledge, M., Baron, B., England, P., Pugsley, A.P., and Dessen, A. (2011). Pilotin-secretin recognition in the type II secretion system of *Klebsiella oxytoca*. *Mol. Microbiol.* 82, 1422–1432.

Ulrich, T., and Rapaport, D. (2015). Biogenesis of beta-barrel proteins in evolutionary context. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 259–264.

Vanderlinde, E.M., Zhong, S., Li, G., Martynowski, D., Grochulski, P., and Howard, S.P. (2014). Assembly of the type two secretion system in *Aeromonas hydrophila* involves direct interaction between the periplasmic domains of the assembly factor ExeB and the secretin ExeD. *PLoS One* 9, e102038.

Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G.P.F., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2009). HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J. Biol. Chem.* 284, 33815–33823.

Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* 20, 6735–6741.

Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299, 262–265.

Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 18188–18194.

Wimley, W.C. (2003). The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 404–411.

Worrall, L.J., Hong, C., Vuckovic, M., Deng, W., Bergeron, J.R.C., Majewski, D.D., Huang, R.K., Spreter, T., Finlay, B.B., Yu, Z., et al. (2016). Near-atomic-resolution cryo-EM analysis of the *Salmonella* T3S injectisome basal body. *Nature* 540, 597–601.

Yan, Z., Yin, M., Xu, D., Zhu, Y., and Li, X. (2017). Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 177–183.

Yang, J., and Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 52, 5.8.1-15.