

Received: 2016.02.09  
Accepted: 2016.04.18  
Published: 2016.06.30

## Proteazy serynowe i ich funkcja w patogenezie zakażeń bakteryjnych\*

### The role of serine proteases in the pathogenesis of bacterial infections

Ewa Burchacka<sup>1</sup>, Danuta Witkowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Wrocław

<sup>2</sup> Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Nadużywanie antybiotyków w medycynie, weterynarii, hodowli zwierząt, rolnictwie, kosmologii czy w przemyśle, przyczyniło się do rozprzestrzenienia zjawiska oporności wśród wielu gatunków drobnoustrojów. Poszukiwanie alternatywnej metody walki z patogenami oraz przeciwdziałanie powstawaniu zakażeń bakteryjnych i ognisk epidemicznych, ma istotne znaczenie zarówno dla pacjentów jak i dla systemu opieki zdrowotnej. Dlatego też od kilku lat prowadzi się intensywne badania, których celem jest poszukiwanie nowych celów molekularnych i skutecznych substancji terapeutycznych ingerujących w cykl życiowy drobnoustrojów. Nowym podejściem terapeutycznym w zwalczaniu chorobotwórczych szczepów bakteryjnych jest możliwość użycia inhibitorów bakteryjnych proteaz serynowych. W pracy opisano bakteryjne proteazy serynowe, pełniące istotną rolę w patogenezie zakażeń bakteryjnych i wprowadzono czytelnika w zwięzłą historię tematu.

**Słowa kluczowe:**

**bakteryjne proteazy serynowe • endoproteazy • czynniki wirulencji • patogenność bakterii • zakażenie**

#### Summary

An increasing resistance of pathogenic bacterial species has been considered as one of the major health problems worldwide. The discovery of novel protein targets and development of effective anti-bacterial therapeutics is of high need since for some extremely resistant pathogens we are simply left unarmed. One of new promising therapeutic strategy is the application of specific inhibitors targeting bacterial serine proteases. Pathogenic microorganisms secrete a broad range of hydrolases, including serine proteases which lead to activation of various virulence factors. Herein, we review the specific bacterial serine proteases which have an influence on pathogenicity of bacterial infection as well as we introduce the reader with a brief history of the subject.

**Key words:**

**bacterial serine proteases • endoproteases • virulence factors • bacterial pathogenicity • infection**

\*Praca została wsparta przez fundusz statutowy Politechniki Wrocławskiej (S50129/Z0313).



**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1208011>

**Word count:** 6937  
**Tables:** 1  
**Figures:** 4  
**References:** 121

**Adres autorki:** dr inż. Ewa Burchacka, Politechnika Wrocławska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370, Wrocław;  
 email: ewa.burchacka@pwr.edu.pl

## WSTĘP

Rozwój współczesnej medycyny, przez wprowadzenie nowoczesnych sposobów diagnostyki i poszerzenie możliwości terapeutycznych, doprowadził do znaczącej poprawy poziomu życia ludności. Wdrożono także wiele programów szczepień ochronnych w celu opanowania wielu chorób zakaźnych. Rozwój współczesnej farmacji i odkrywanie nowych grup antybiotyków, charakteryzujących się odmiennymi mechanizmami działania spowodował skuteczne opanowanie wielu zakażeń bakteryjnych. Jednak nadużywanie antybiotyków i ich niewłaściwe stosowanie przyczyniło się do rozprzestrzenienia zjawiska oporności wśród wielu gatunków drobnoustrojów. Niektóre antybiotyki stały się nieskuteczne w walce z bakteriami i coraz częściej brakuje terapii, które zapobiegałyby rozwojowi groźnych zakażeń [23]. Problem oporności na leki nie ogranicza się już wyłącznie do bakterii wywołujących zakażenia szpitalne. Przykładem mogą być pozaszpitalne szczepy paciorkowców (*Streptococcus pneumoniae*), wywołujące głównie zapalenie płuc i gardła, szczególnie odporne na penicylinę, makrolidy i fluorochinolony [12]. Brak radykalnych działań zmierzających do opracowania nowych leków o właściwościach przeciwbakteryjnych zagraża wyczerpaniem możliwości zwalczania chorób o etiologii bakteryjnej. Dlatego też od kilku lat prowadzi się intensywne badania, których celem jest poszukiwanie nowych substancji terapeutycznych ingerujących w cykl życiowy drobnoustrojów.

Mikroorganizmy wydzielają wiele hydrolaz, w tym również proteaz serynowych, degradujących pozakomórkowe biopolimery w celu zapewnienia źródła składników odżywczych. Podczas zakażenia bakteryjne proteazy są inaktywowane przez naturalne, endogenne białkowe inhibitory gospodarza (serpiny, serine protease inhibitors). Jednym ze sposobów pokonania bariery ochronnej gospodarza jest zwiększone wydzielanie hydrolaz, które ze względu na różnice strukturalne mogą być niewrażliwe na działanie ludzkich serpin.

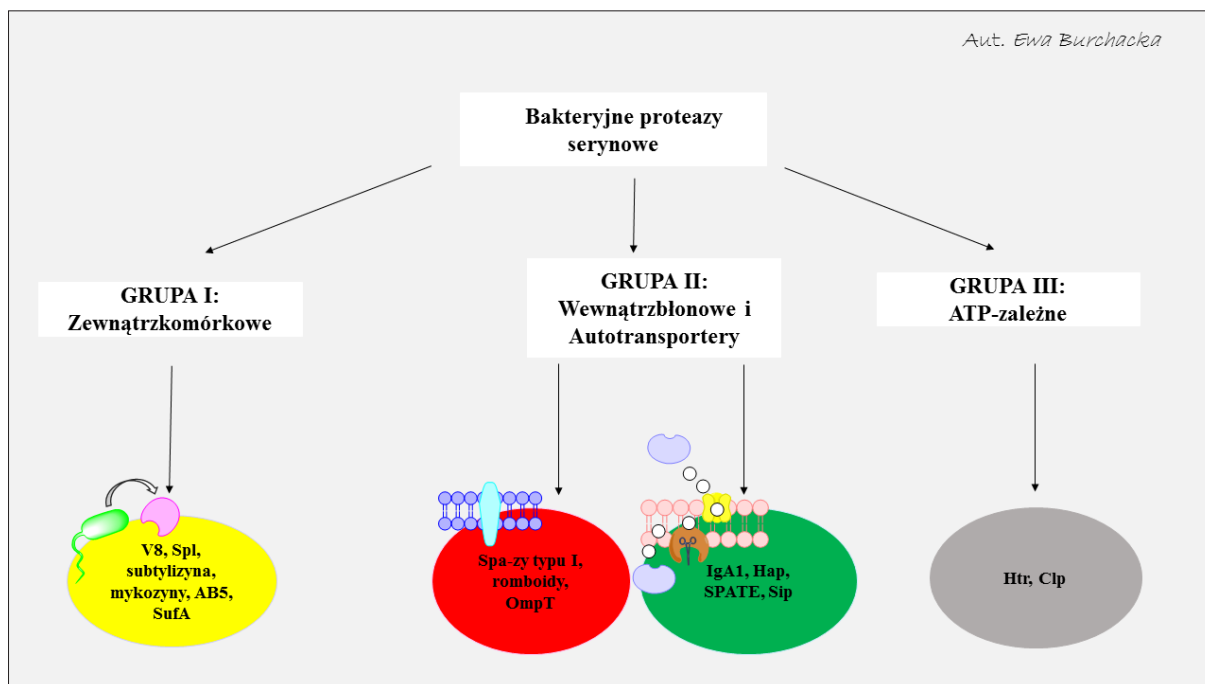
Wiele patogenów wykorzystuje proteazy do aktywacji kaskad proteazozależnych. Jedną z przyczyn chronicznego bólu i obrzęku w miejscu zakażenia są zaburzenia w funkcjonowaniu systemu kalikreino-kininowego wywołane przez bakteryjne proteazy [67,86]. Wykorzysta-

nie mechanizmów kontrolujących aktywność kaskad kalikreino-kininowych ułatwia wnikanie składników odżywczych i patogenów (różne gatunki z rodzajów: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Clostridium*, *Candida*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* i *Staphylococcus*) do miejsca zakażenia wskutek zaburzeń w obrębie bariery przepuszczalności [42,67].

W schorzeniach, takich jak zapalenie rogówki, wywołane przez szczepy z gatunków *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa*, czy zwłóknienie pęcherzykowe, związane z chronicznymi zakażeniami *P. aeruginosa*, a także w zapaleniu ozębnej (*Porphyromonas gingivalis*) i zgorzeli (*Clostridium perfringens*), bakterie, wydzielając proteazy degradujące kolagen, elastynę i fibronektynę, prowadzą do trwałych i niebezpiecznych uszkodzeń tkank gospodarza.

Nadmierne wytwarzanie proteaz i aktywność białek adhezyjnych stwierdza się w ropnym zapaleniu związanym z zakażeniem kończyn, schorzenia szczególnie niebezpiecznego dla bydła. Hodowcy z powodu tego typu zakażeń ponoszą duże straty związane ze spadkiem produkcji mleka i przyrostu masy ciała, zaburzeniami w rozrodzie, wysokimi kosztami leczenia i ostatecznie ubojem bydła z konieczności [90]. Stwierdzono, że mutant pozbawiony aktywnego genu kodującego podjednostki białkowe fimbrii i proteaz jest niezdolny. Może to sugerować, że czynnikami wirulencji szczepu *Dichelobacter nodosus* związanego z ropnym zapaleniem kończyn są właśnie fimbrie i wydzielane zewnątrzkomórkowo proteazy [48]. Rola bakteryjnych proteaz wydaje się istotna również w układzie immunologicznym zakażonego organizmu. W niektórych przypadkach bakteryjne proteazy inaktywują chemotaktyczny czynnik C5a, odpowiadający za aktywację neutrofilów w miejscach zakażenia. Niektóre z mikroorganizmów wydzielają enzymy proteolityczne, które swoiście niszczą przeciwciała IgA, IgM czy IgG gospodarza i w ten sposób unikają fagocytozy. Strategia takiej obrony zapewnia patogenowi przeżycie i namnażanie się [107].

Proteazy serynowe, katalizując selektywnie hydrolizę wiązania peptydowego, wykorzystują katalityczną resztę seryny, odgrywającą główną rolę w aktywności enzymatycznej tej klasy białek. Mechanizm działania proteaz serynowych polega na nukleofilowym ataku katalitycznej reszty seryny (Ser) na karbonylowy atom węgla. Re-



**Ryc. 1.** Proteazy serynowe odgrywające istotną rolę w patogenezie zakażeń bakteryjnych. Grupa I: proteazy serynowe wydzielane zewnątrzkomórkowo; grupa II: proteazy serynowe zakotwiczone w błonie komórkowej i autotransportery. Autotransportery to unikalna grupa białek błonowych, które ulegając autoproteolizie wydzielają zewnątrzkomórkowo domenę pasażerską o aktywności serynowych proteaz; grupa III: proteazy serynowe zawierające domeny wiążące ATP

akcja katalizowana przez enzym przeważnie zachodzi w obecności histydyny (His), której dodatnio naładowana postać w stanie przejściowym jest stabilizowana i utrzymywana w odpowiedniej orientacji przez grupę karboksylową bocznego łańcucha kwasu asparaginowego (Asp). Reszty aminokwasowe Asp, Ser i His tworzą katalityczną triadę i są wspólne dla większości proteaz serynowych. Wyjątkiem jest transpeptydaza D-Ala-D-Ala i sygnałowe peptydazy typu I, które charakteryzują się odmienną budową centrum aktywnego. Centrum katalityczne tych białek jest zbudowane z diady katalitycznej (Ser, Lys). To powoduje, że w porównaniu z klasycznymi proteazami serynowymi (z triadą katalityczną), enzymy te charakteryzują się odmiennym mechanizmem działania i są niewrażliwe na działanie wielu komercyjnie dostępnych inhibitorów. Na podstawie dostępnych danych dotyczących aktywnych proteaz serynowych i ich roli w patogenezie bakteryjnych zakażeń, podzielono je na trzy grupy. Pierwszą grupę bakteryjnych proteaz serynowych tworzą białka wydzielane zewnątrzkomórkowo. Drugą grupę to proteazy serynowe zakotwiczone w błonie komórkowej. W jej skład wchodzi także autotransportery, których domena pasażerska o aktywności serynowej proteazy wydzielana jest zewnątrzkomórkowo przez systemy sekrecji z udziałem białek błonowych. Ostatnią grupę tworzą bakteryjne proteazy serynowe, których aktywność i funkcja jest związana z ATP-zależnymi białkami opiekuńczymi (chaperonami). Prawdopodobnie działają jako białka związane z komórkami bakteryjnymi, jak również jako czynniki wirulencji wydzielane zewnątrzkomórkowo (ryc. 1).

### **PROTEAZY SERYNOWE WYDZIELANE ZEWNĄTRZKOMÓRKOWO (GRUPA I)**

Zewnątrzkomórkowe bakteryjne proteazy serynowe mogą bezpośrednio lub pośrednio uczestniczyć w procesach rozprzestrzeniania się bakterii chorobotwórczych, destrukcji tkanek gospodarza, a także w procesie unikania swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza czy modulacji jego układu immunologicznego [107]. Bakterie chorobotwórcze w chwili wnikięcia do organizmu gospodarza w miejscu zakażenia wprowadzają dodatkową pulę proteaz, w tym proteaz serynowych. Pojawienie się w organizmie gospodarza nadmiaru enzymów proteolitycznych przyczynia się do zachwiania naturalnej równowagi między proteazami a ich inhibitorami [107]. Jest to szczególnie ważne podczas zakażenia, gdyż inhibitory proteaz gospodarza nie są w stanie kontrolować aktywności enzymów bakteryjnych, co może doprowadzić do degradacji zakażonej tkanki [108]. Enzymatyczny rozpad białek gospodarza jest istotny dla patogenu, ponieważ dostarcza mu wolnych aminokwasów do syntezy własnych białek i wzrostu, a także do kolonizacji i rozprzestrzeniania się mikroorganizmów w miejscu zakażenia.

### **Chymotrypsynopodobne proteazy serynowe**

Podczas kolejnych etapów patogenezы zakażeń bakteryjnych można zauważyć, że czynnikami uczestniczącymi zarówno w kolonizacji, jak i inwazji, które pozwalają na ominięcie barier immunologicznych gospodarza, są enzymy proteolityczne [106]. Proces kolonizacji, czyli proces zasiedlenia organizmu przez patogen, polega na



interakcji adhezyn bakteryjnych z tkankami gospodarza. Do utworzenia swoistych połączeń są niezbędne proteolityczne modyfikacje domen białkowych gospodarza, podlegające „obróbce” przez proteazy bakteryjne oraz modyfikacje adhezyn bakteryjnych będące skutkiem aktywności bakteryjnych enzymów proteolitycznych [13]. Po procesie kolonizacji, komórki bakteryjne rozpoczynają proces inwazji do tkanek gospodarza. Ten etap także jest związany z aktywnością proteaz bakteryjnych. Przekroczenie barier tkankowych i komórkowych, w tym głównie śródbłonka naczyń, wymaga intensywnego trawienia białek macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej narządów gospodarza przez bakteryjne enzymy proteolityczne i proteazy gospodarza, które zostały zaktywowane przez enzymy bakteryjne [107]. Ważnym etapem w przebiegu zakażenia jest przełamanie przez patogen barier immunologicznych gospodarza. Dochodzi do zaburzenia funkcjonowania obronnych mechanizmów odporności swoistej i nieswoistej gospodarza, co prowadzi do wydzielania cytokin, rozregulowania systemu dopełniacza czy degradacji przeciwciał i receptorów komórek immunologicznych [106,107]. Utrzymanie równowagi immunologicznej organizmu gospodarza jest uwarunkowane współdziałaniem licznych, ściśle powiązanych ze sobą kaskad proteolitycznych, takich jak układ krzepnięcia i fibrynolizy, kaskada dopełniacza czy system kalikreiny-kininogenu [106,107].

Wydzielana przez gronkowce (*Staphylococci*) proteaza V8 (GluV8, V8/SspA) należy do rodziny chymotrypsynopodobnych proteaz serynowych i podrodziny glutamylowych endopeptydaz I (EC 3.4.21.19.) [48,90]. Aktywność bakteryjnej proteazy V8 obserwuje się we wszystkich trzech etapach procesu zakażenia. Proteaza V8 swoicie hydroлізуje wiązania peptydowe po karboksylowej stronie kwasu glutaminowego i asparaginowego, przy czym hydrolyza wiązania po karboksylowej stronie glutaminianu jest 100-1000 razy bardziej skuteczna niż po karboksylowej stronie asparaginianu. Proteaza V8 składa się z 336 aminokwasów, spośród których 68 reszt (Met1-Asn68) obejmuje sekwencję prepropeptydową. Białko to zawiera C-końcowy ogon zawierający reszty, które składają się z dwunastokrotnie powtórzonych sekwencji tripeptydowych Pro-Asp-Asn [11]. Proteaza V8 jest kodowana przez gen *sspA*, stanowiący część operonu, w skład którego wchodzi także gen *sspB* kodujący zewnątrzkomórkowo wydzielane proteazy cysteinowe.

Endoproteinaza GluV8 pełni główną rolę warunkującą wzrost mikroorganizmów, co stwierdzono w badaniach na modelu zwierzęcym [29]. Podczas zakażeń wywołanych przez szczepy *S. aureus*, białko to odpowiada za wiele istotnych funkcji. Glutamylowa endopeptydaza inaktywuje inhibitor ludzkiej neutrofilowej elastazy  $\alpha$ -P1 [107], który chroni tkanki przed mediatorami stanu zapalnego. Proteaza V8 przekształca kininogen w kininę, a to wpływa na kontrolę procesu zapalnego, regulację ciśnienia krwi, regulację układu krzepnięcia i przewodzenie bólu. Uważa się, że aktywność kinin ułatwia wniknięcie bakterii do układu krążenia, co może doprowadzić do rozwoju sepsy

[62]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że proteaza V8 rozcina łańcuchy ciężkie wszystkich ludzkich immunoglobulin, zaburzając działanie układu odpornościowego gospodarza i skuteczną ochronę przed patogenami [92]. Wykazano także, że proteaza V8 przyczynia się do dysfunkcji bariery przepuszczalności nabłonka skóry u myszy. V8 degradowuje korneodesmosomalne białko desmogleinę 1 (DSG1) [40]. Enzymatyczny proces degradacji białek korneocytów powoduje łuszczenie warstwy rogowej naskórka, niszcząc barierę zapobiegającą wnikaniu obcych substancji, takich jak np. alergeny. Działanie V8 w procesie zakażenia bakteryjnego może być jedną z istotnych przyczyn zaburzenia homeostazy organizmu gospodarza. Obniżenie aktywności proteolitycznej proteazy V8 przez zastosowanie skutecznych inhibitorów, mogłoby zredukować objawy kliniczne u chorych z zakażeniem gronkowcem złocistym (*S. aureus*). U ponad 30% populacji diagnozuje się występowanie tego chorobotwórczego drobnoustroju [64]. Jest on czynnikiem etiologicznym wielu szpitalnych i pozaszpitalnych zakażeń na całym świecie [74]. Niepokojąca jest także jego rosnąca antybiotykooporność. Poszukiwanie nowych proteaz bakteryjnych, które odgrywają znaczącą rolę w patogenezie zakażeń wywołanych przez szczepy *S. aureus*, jak również projektowanie i zastosowanie ich inhibitorów wydaje się realną szansą terapeutyczną [106]. Osiągnięcie tych celów jest możliwe dzięki rozwojowi biologii molekularnej umożliwiającej poznanie całych genomów bakterii. Genomy siedmiu szczepów *S. aureus* [58] są dostępne w bazach danych, co umożliwi ich dokładną analizę. Części genomu nazwane „wyspami patogeniczności” (pathogenicity islands, PAIs) kodują wiele czynników wirulencji, takich jak epidermolityczne toksyny czy glutamylowa endopeptydaza. Wśród nich odkryto także skupisko sześciu genów tworzących jeden operon, kodujących rodzinę serynowych proteaz Spl [56]. Sekwencja aminokwasowa białek Spl ujawnia homologię do proteazy V8 i wielu innych enterotoksyn wydzielanych przez *S. aureus* [85]. Strukturalne podobieństwo białek Spl do znanych czynników wirulencji, a także umiejscowienie genów *spl* na PAIs mogą sugerować, iż białka Spl uczestniczą w patogenezie zakażeń wywołanych przez szczepy *S. aureus* [21]. Pierwsze dane dotyczące Spl przedstawił Rieneck i wsp. [89]. Stwierdzono, że u pacjentów z zapaleniem wśierdzia obserwuje się podwyższony poziom przeciwciał, skierowanych przeciw wytwarzanemu przez szczepy *S. aureus* białku SplC. Zauważono także, że podczas zakażenia proteaza SplC jest nadekspresjonowana przez komórki gronkowca złocistego. Jednak dokładna funkcja białek z rodziny Spl jest wciąż nieznaną. Wyniki badań nad strukturą i funkcją proteaz SplA, SplB i SplC wskazują, że są chymotrypsynopodobnymi proteazami serynowymi [21,85,98]. W strukturze krystalicznej proteaz SplA, SplB, SplC występuje triada katalityczna zbudowana z reszt Ser, His, Asp..

Badania swoistości substratowej proteazy SplB wykazały, że preferowaną sekwencją substratu jest Trp-Glu-Leu-Gln (P4-P1), nomenklatura według Schechter i Berger [85]. Zastosowanie komórkowej biblioteki peptydowych

substratów (CliPS) służącej mapowaniu substratowemu, pomogło także w określeniu konsensusowej sekwencji rozpoznawanej przez proteazę SplA. Enzym SplA hydrolizuje substraty z monocyklicznymi, aromatycznymi resztami w pozycji P1, takimi jak tyrozyna i fenyloalanina [98]. W pozycji P2 preferowaną resztą aminokwasową jest leucyna, a w P3 tyrozyna bądź fenyloalanina [106]. Jednak wciąż nie wiadomo z czego wynika tak wąska swoistość proteaz tej rodziny i ich biologiczna rola w patogenezie szczepów gronkowca złocistego.

### Subtylizynopodobne proteazy serynowe

Badania z zakresu inżynierii białek i namnażania mutantów z wykorzystaniem subtylizynopodobnych proteaz serynowych prowadzą do poszerzenia wiedzy dotyczącej właściwości katalitycznych, stabilności, struktury i funkcji tych enzymów. Choć stanowią one odrębny typ enzymów proteolitycznych to wykazują analogiczną do proteaz typu chymotrypsynowego geometrię miejsca aktywnego i mechanizm katalityczny. Jednak pod względem strukturalnym i ewolucyjnym istotnie różnią się od klasycznych proteaz chymotrypsynowych [4]. Główną różnicą jest odmienna kolejność reszt aminokwasowych tworzących katalityczną triadę. Zamiast klasycznego układu katalitycznych reszt aminokwasowych His, Asp, Ser (począwszy od N do C końca) występuje niekanoniczna triada Asp, His, Ser.

Dotychczas poznano ponad 200 białek należących do podrodziny proteaz subtylizynopodobnych [94]. Najlepiej poznany białkiem należącym do tej grupy jest ekspresjonowana przez szczepy z rodzaju *Bacillus* subtylizyna (EC 3.4.21.62). Ponad 95% zewnątrzkomórkowej proteolitycznej aktywności *B. subtilis* wynika z obecności subtylizyny i neutralnej metaloproteazy E [95]. Subtylizyna może wpływać na wzrost chorobotwórczych bakterii *B. subtilis*, ponieważ umożliwia trawienie ludzkiej transferyny, co wiąże się z produkcją sideroforów niezbędnych w fazie wzrostu tych mikroorganizmów [14,78,95].

Na szczególną uwagę zasługują również subtylizynopodobne serynowe proteazy zwane mykozynami, których aktywność związana jest z systemem obrony prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*) przed makrofagami gospodarza [18]. Wiadomo, że drobnoustroje wykorzystują różne mechanizmy do przełamania pierwszej linii obrony gospodarza i wniknięcia do organizmu. Korzystają także z rozmaitych możliwości zapewniających im bytowanie i namnażanie się w miejscu zakażenia. Niektóre z nich należą do grupy drobnoustrojów zewnątrzkomórkowych, a inne np. prątki gruźlicy, to patogeny wewnątrzkomórkowe. Organizm gospodarza w początkowej fazie zakażenia drobnoustrojami wykorzystuje do obrony mechanizmy nieswoistej odporności wrodzonej, zarówno humoralnej (lizozym, układ dopełniacza, interferony, białko ostrej fazy), jak i komórkowej (makrofagi, komórki dendrytyczne, neutrofile, komórki tuczne). Nieco później są uruchamiane mechanizmy odporności nabytej (swoistej): humoralnej (przeciwciała) oraz komórkowej (lim-

focyty T). Odpowiedź organizmu na wniknięcie do jego komórek, takich bakterii jak *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* czy *Rickettsiae*, znacznie różni się od tej skierowanej przeciwko patogenom zewnątrzkomórkowym [18].

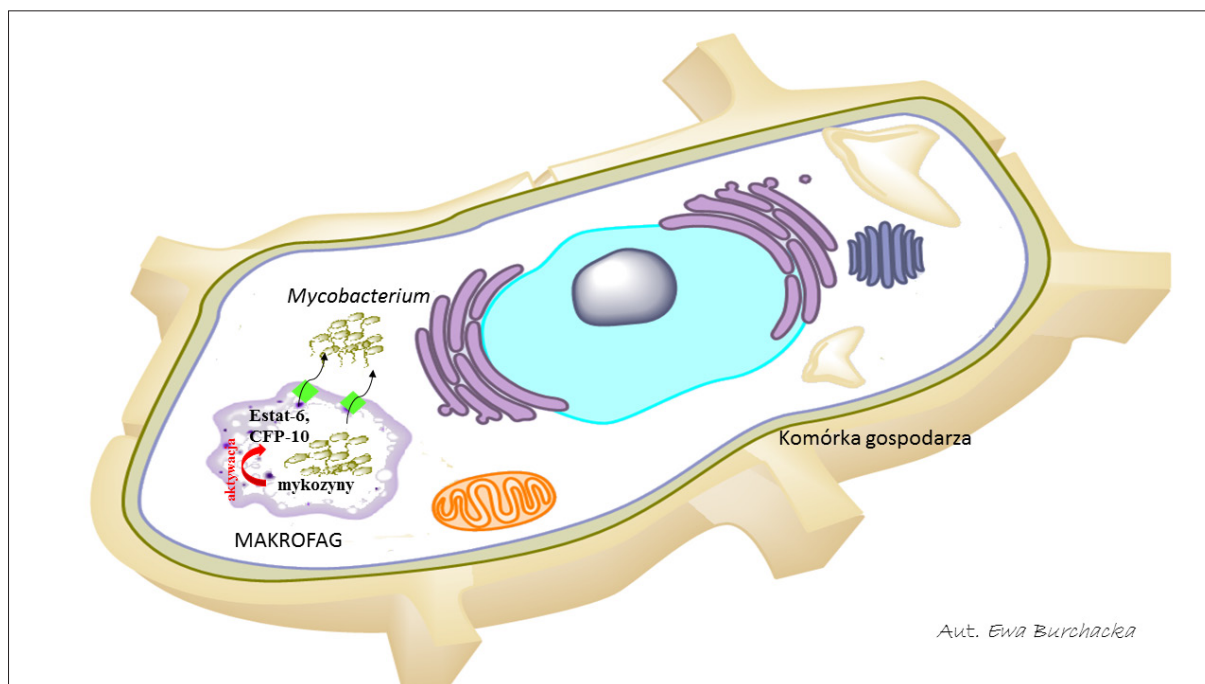
Prątki gruźlicy są czynnikiem etiologicznym gruźlicy, która rozwija się głównie w płucach, a także w układzie moczowym, naczyniach krwionośnych i ośrodkowym układzie nerwowym [114]. Większość zachorowań i zgonów z powodu gruźlicy występuje w krajach rozwijających się, ale kraje wysokorozwinięte także nie są wolne od tego problemu, który aktualnie dotyka już jedną trzecią całej populacji ludzkiej. Wyjaśnienie mechanizmów jej patogenności oraz wirulencji i przeżycia prątków gruźlicy, umożliwi skuteczniejsze zwalczanie tej choroby [114].

Białka *M. tuberculosis* związane z wirulencją są kodowane przez dziewięć genów regionu delecji – RD1. Wśród tych białek znajdują się mykozyny, czyli subtylizynopodobne proteazy serynowe połączone ze ścianą komórkową, a także transportery w systemie ABC (ATP-binding cassette), białka wiążące ATP i białka błonowe [88]. Ponadto w badaniach na modelu zwierzęcym stwierdzono, że delecja RD1 hamuje wzrost prątków w makrofagach. Podczas zakażenia makrofagów obserwuje się nadekspresję subtylizynopodobnych proteaz serynowych i ich proteolityczną aktywność, co może mieć znaczący wpływ na zdolność przeżycia prątków gruźlicy wewnątrz makrofagów [78]. Proteolityczna aktywność mykozyn umożliwia wydzielanie białek ESAT-6 (early secreted antigenic target) i CFP-10 (culture filtrate protein), które są ekspresjonowane w określonych proporcjach przez system sekrecji ESX-1 prątków gruźlicy (ryc. 2) [19,96]. Białka te, przez destrukcję błon komórkowych i tworzenie porów w błonie, ułatwiają przenikanie prątków gruźlicy z fagosomu do cytosolu. Mykozyny umożliwiają koniugację DNA u awirulentnych saprofitów [83]. Mutacja w genie kodującym mykozyn hamuje proces wydzielania białek systemu sekrecji ESX-1.

Proteazy serynowe typu subtylizynowego są ekspresjonowane przez różne mikroorganizmy i mogą pełnić ważną rolę w patogenezie zakażeń bakteryjnych. Do tej grupy enzymów zalicza się proteazę serynową AB5. W badaniach na modelu zwierzęcym stwierdzono, że ekspresja proteazy AB5 przez szczepy *Escherichia coli* użyte do zakażenia myszy, jest letalna dla zwierząt [115]. Toksyna AB5 inaktywuje białka pomocnicze retikulum endoplazmatycznego, prowadząc do śmierci komórek gospodarza [81]. Podanie dootrzewnowo proteazy AB5 wywołuje u myszy anemię, małopłytkowość, uszkodzenia w prawidłowym funkcjonowaniu nerek, mózgu i wątroby [115]. Objawy te towarzyszą wielonarządowemu zespołowi hemolityczno-mocznicowemu. Jego najczęściej identyfikowanym czynnikiem etiologicznym jest zakażenie chorobotwórczym szczepem *E. coli*, rzadziej natomiast przyczyną jest zakażenie pałeczkami *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter* czy paciorkowcami z gatunku *Streptococcus pneumoniae*.

Występowanie subtylizynopodobnej proteazy stwierdzono także u bakterii *Fingoldia magna*. Mikroorganizm





**Ryc. 2.** Proteolityczne działanie mykozyn prątków, umożliwiające wydzielanie białek ESAT-6 i CFP-10, odpowiedzialnych za destrukcję błon komórkowych i tworzenie porów ułatwiających przenikanie bakterii z fagosomu do cytosolu

ten należy do Gram-dodatnich bakterii rosnących w warunkach beztlenowych i jest czynnikiem etiologicznym owrzodzeń tkanek, ran skórnych, zapalenia stawów i kości, a także zapalenia pochwy [100]. Stosunkowo powolny wzrost tych bakterii i beztlenowe warunki bytowania spowodowały, że długo nie wzbudzały specjalnego zainteresowania i nie zaliczano ich do ważnych ludzkich patogenów. Dlatego też patogenne znaczenie aktywności proteolitycznej tych mikroorganizmów nie jest jasno określone [100]. Stwierdzono, że szczepy *F. magna* izolowane z owrzodzeń na piersiach i ran diabetyków wykazują wzmożone wydzielanie kolagenazy, żelatynazy, hipourynazy i subtylizynopodobnej serynowej proteazy SufA [46].

Enzym SufA tworzy dimery, które są bardziej aktywne proteolitycznie niż formy monomeryczne [46]. Białko to degraduje i inaktywuje przeciwbakteryjny peptyd LL-37 i chemokiny CXC wydzielane przez komórki gospodarza. Podczas zakażenia proteaza SufA ułatwia kolonizację tkanek gospodarza przez szczepy *F. magna*. Proteaza ta hydrolizuje fibrynogen, powodując zablokowanie tworzenia fibryny [46]. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że mutant *F. magna*, który wydzieliał nieaktywne białko, nie miał wpływu na koagulację płytek krwi. Warto dodać, że zarówno typ dziki drobnoustroju, jak i jego mutant, w równym stopniu przylegały do keratynocytów, czyli komórek naskórka biorących udział w keratynizacji, ale tylko typ dziki hamował tworzenie fibryny osocza [46]. Wyniki dotychczasowych badań *in vitro* dowodzą, że jeden z fosforanowych inhibitorów proteazy SufA zapobiega degradacji ludzkiego fibrynogenu. Związek ten wykazuje właściwości przeciwbakteryjne wobec szczepów *F. magna*,

*S. aureus* i *E. coli* w stopniu porównywalnym do działania gentamycyny [8].

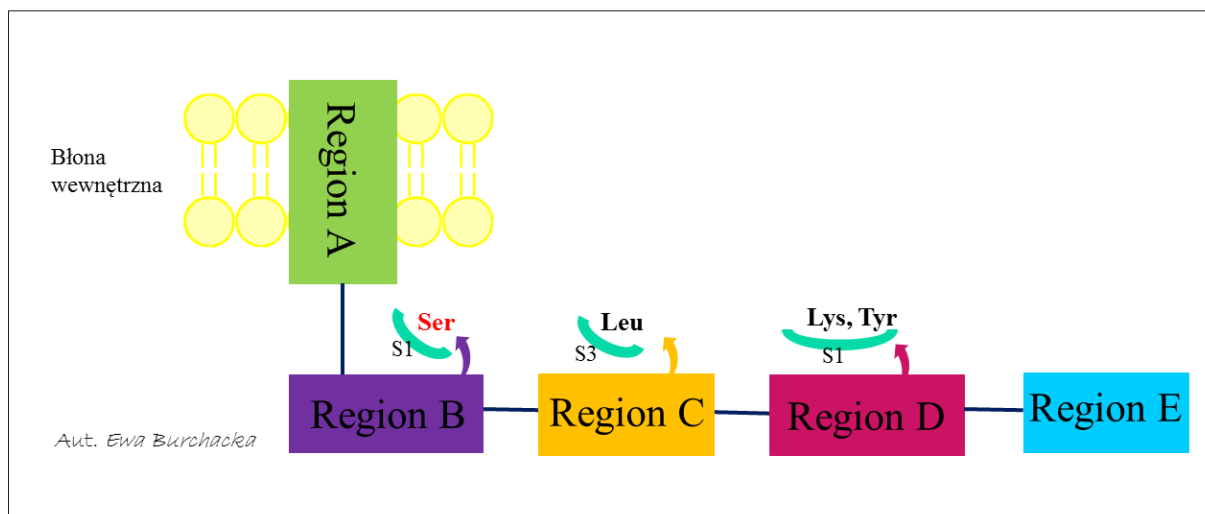
## WEWNĄTRZBLONOWE PROTEAZY SERYNOWE (GRUPA II)

### Peptydazy sygnałowe

Ściana i błony komórkowe bakterii stanowią barierę gwarantującą integralność mikroorganizmu przez selektywną przepuszczalność dla specyficznych cząsteczek i jonów. Zewnątrzkomórkowa lokalizacja determinant wirulencji jest ważną cechą charakteryzującą mikroorganizmy patogeniczne. Eksport białek na powierzchnię komórek bakteryjnych obejmuje transport poprzez błony. Sekrecja białek zachodzi dzięki różnym, często złożonym mechanizmom. Systemy sekrecji bakterii Gram-dodatnich podzielić można na dwie główne grupy: „Sec-zależne” oraz „Sec-niezależne” [51].

Do grupy białek błonowych należą peptydazy sygnałowe (Sp-azy). Ponad trzy dekady temu Milstein i wsp. opisał obecność peptydaz, które wymagane są w mutarotacji wydzielanych pozakomórkowo białek [66]. Ich ważne obserwacje opierały się na spostrzeżeniu, że ciężar cząsteczkowy syntetyzowanych białek jest większy wewnątrz komórki, niż po translokacji przez błonę. Wkrótce stwierdzono, że białka te zawierają sekwencję aminokwasową niezbędną do ich eksportu [65].

Sekwencje sygnałowe transportowanych białek wykazują kilka cech wspólnych: 1) mają długość 13-36 reszt aminokwasowych; 2) część sekwencji sygnałowej zawiera przynajmniej jedną resztę o ładunku dodatnim; 3) sekwencja



Ryc. 3. Schemat budowy sygnałowych peptydaz typu I z podziałem na segmenty A, B, C, D i E

sygnałowa od strony N-końca jest silnie hydrofobowa, zazwyczaj o długości 10-15 reszt aminokwasowych; w regionie tym często występują: alanina, leucyna, walina, izoleucyna i fenyloalanina; 4) zawierają małe, nienaładowane reszty aminokwasowe poprzedzające wiązania peptydowe hydrolizowane przez Sp-azy [113].

Badania genetyczne ujawniły, że do transportu białek przez błonę niezbędny jest wysoce konserwatywny fragment hydrofobowy peptydaz sygnałowych [68]. Dokładniejszą charakterystykę i możliwość oczyszczania Sp-az umożliwił rozwój metod *in vitro* potranslacyjnego rozcinania prekursorów białek wydzielniczych. Wśród trzech typów sygnałowych peptydaz, takich jak Sp-aza I (LepB), Sp-aza II (LspA) czy peptydaza prepilinowa (BfpA), tylko typu pierwszego należą do rodziny serynowych proteaz. Sygnałowe peptydazy typu I umożliwiają translokację niepoproteinowych substratów na ścieżce sekrecji typu Sec i Tat. Są integralnymi białkami wewnętrznej błony komórkowej. Budują je dwa helikalne segmenty transmembranowe i charakteryzujące się aktywnością proteolityczną duże C-końcowe domeny peryplazmatyczne.

Pierwsza prokariotyczna sygnałowa peptydaza typu I została wyizolowana przez Zwizinskiego i Wicknera [121] ze szczepów *E. coli*, za pośrednictwem ekstrakcji błon komórkowych z użyciem niejonowego detergentu Triton X-100 i oczyszczona z użyciem chromatografii jonowymiennej. Następnie sklonowano [17] i zsekwencjonowano [117] kodujący ją gen *lepB*, co umożliwiło otrzymanie dużych ilości białka i poznanie jego właściwości enzymatycznych. Obecnie peptydazy sygnałowe typu I są izolowane z różnych szczepów bakteryjnych. Większość bakterii zawiera pojedynczą chromosomalną kopię genu peptydazy sygnałowej. Wyjątek stanowią bakterie *B. subtilis* mające pięć chromosomalnych kopii genu *Spa-zy* i dwie kopie plazmidu [104] oraz bakterie *Streptomyces* zawierające cztery kopie genu [80], a także *S. aureus* z dwoma kopiami genu, z czego jedna koduje nieaktywny enzym [15].

Analiza konserwatywnych regionów (w obrębie sekwencji aminokwasowych) bakteryjnych Sp-az [76] umożliwia nie tylko analizę filogenetyczną określonych gatunków, lecz także pozwala na wgląd w budowę przestrzenną enzymów i porównanie ich budowy u różnych szczepów bakteryjnych (ryc. 3). Pierwszy konserwatywny region A jest częścią hydrofobowego segmentu zakotwiczonego w błonę (ryc. 3). Region B zawiera motyw Ile-Pro-Ser-Xaa-Ser-Met-Xaa-Pro-Thr-Lys, w którym druga reszta seryny pełni rolę nukleofila podczas katalizowanej reakcji enzymatycznej (ryc. 3). Region C zawiera sekwencję konsensusową Asn-Xaa-Leu-Xaa-Val-X-Lys-Xaa-Xaa, w której konserwatywna reszta leucyny jest częścią kieszeni wiążącej substrat w pozycji S3 (ryc. 3). Region C zawiera motyw Arg-Gly-Asn-Ile-Val-Val-Phe-Xaa-Xaa-Pro-Trp, w którym druga reszta waliny jest częścią kieszeni S3. Region D ma reszty Tyr-Ile-Lys-Arg-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Pro-Gly-Asn-Thr-Val z resztą tyrozyny tworzącą część kieszeni wiążącej substrat w pozycji S1 i resztą lizyny, która odgrywa rolę strukturalną (ryc. 3). Końcowy region E zawiera wiele konserwatywnych reszt aminokwasowych, np. reszta seryny (Ser278 w enzymie *E. coli*) umożliwia odpowiednią orientację reszty lizyny w kierunku seryny będącej nukleofilem katalizowanej reakcji [76].

Rola Sp-az I okazuje się podstawowa dla przeżycia komórek bakteryjnych. Mutacje w genie *lepB* szczepów *E. coli* są dla nich letalne [16]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych na ludzkich patogenach, takich jak dwoinka zapalenia płuc (*S. pneumoniae*) [120] i gronkowiec złocisty [15]. W przypadku bakterii *B. subtilis* okazało się, że dopiero inaktywacja obu peptydaz sygnałowych SipS i SipT prowadzi do śmierci komórek patogenu [6,105].

Swoistość substratowa, zarówno peptydaz sygnałowych komórek prokariotycznych jak i eukariotycznych, jest bardzo podobna. Może to wskazywać, iż swoistość Sp-az I utrzymała się w toku ewolucji [109]. Reszty aminokwasowe Ala-Xaa-Ala (w pozycjach od P1 do P3) w C-końco-

wym regionie sygnałowego peptydu, stanowią motyw rozpoznawany przez Sp-azy [82,113]. W przypadku eukariotycznych sygnałowych peptydaz wymagania względem sekwencji aminokwasowej oddziałującej z centrum aktywnym enzymu są nieco mniej rygorystyczne, oprócz reszt alaniny w pozycji P1 akceptują także reszty Gly, Ser, Thr i Cys, a w pozycji P3 reszty Ile, Leu, Val, Ser i Thr [71]. Trójwymiarowa struktura krystaliczna kompleksu enzymu z inhibitorem  $\beta$ -laktamowym wskazuje na kowalencyjne wiązanie Ser90 [76]. Odległość między Ser90 a Lys145 wynosi 2,90 Å. Reszta Lys145 działa jako katalizator kwasowo-zasadowy. Struktura krystaliczna sygnałowej peptydazy *E. coli* ujawnia także obecność Ser278, która tworzy wiązanie wodorowe z Lys145. Konserwatywna reszta glicyny w pozycji 272 skierowana jest w kierunku diady Ser-Lys [76].

We wszystkich poznanych sygnałowych proteazach niezmienna reszta Asp280 tworzy mostek solny z konserwatywną Arg282 i przez to jest oddalona od reszty Ser278. Wpływa to na stabilizację miejsca aktywnego i pomaga w oddziaływaniu Ser278 z Lys145 [50]. Domena katalityczna jest bardzo duża i bezpośrednio oddziałuje z błoną komórkową [110]. Zanim poznano strukturę krystaliczną sygnałowej peptydazy z *E. coli*, kluczową funkcję Ser90 określono używając technik ukierunkowanej mutagenyzy. Zastąpienie reszty seryny 90 alaniną prowadzi do inaktywacji enzymu [101]. Podobnie zastąpienie lizyny 145 alaniną powoduje zanik jej aktywności enzymatycznej [61]. Sugerowana rola lizyny jako katalizatora kwasowo-zasadowego nie jest w pełni zrozumiała, zwłaszcza z powodu dużej odległości od reszty nukleofila. Optymalne dla aktywności katalitycznej pH 9,0 sugeruje, że reszta lizyny tworząca katalityczną diadę Ser-Lys Sp-azy ma niestandardowe pK (wynoszące około 9), czyli około dwóch jednostek mniej niż pK łańcucha bocznego lizyny. Przypuszcza się również, że Ser88 Sp-azy *E. coli* jest resztą wymaganą do tworzenia dziury oksyanionu [75]. Zastąpienie reszty seryny 88 alaniną obniża wartość  $k_{\text{kat}}$  (liczba obrotów enzymu na jednostkę czasu w warunkach pełnego wysycenia enzymu substratem) około 740 razy. Warto dodać, że prowadząc badania krystalograficzne ukierunkowanej mutagenyzy oraz modelowania molekularnego uzyskano podobne wyniki w przypadku innych sygnałowych peptydaz [6].

Proponowany mechanizm proteolizy, z udziałem bakteryjnej peptydazy sygnałowej typu I, można sprowadzić do kilku etapów. Podczas wiązania substratu (preproteiny) reszta lizyny (Lys145 sygnałowej peptydazy z *E. coli*) umożliwia odpowiednie ułożenie łańcucha bocznego seryny (Ser278 sygnałowej peptydazy z *E. coli*). Zaktywowana reszta seryny przeprowadza nukleofilowy atak na atom węgla grupy karbonylowej substratu, powodując utworzenie tetraedrycznego intermediatu, który jest stabilizowany przez grupę hydroksylową reszty seryny (w sygnałowej peptydazie z *E. coli* jest to Ser88). Następnie tetraedryczny produkt pośredni rozpada się, co prowadzi do powstania acyloenzymu. Etap ten jest możliwy dzięki przeniesieniu protonu z obdarzonej ładunkiem dodatnim reszty lizyny na grupę aminową powstałą w wyniku hy-

drolizy wiązania peptydowego. Hydroliza grupy estrowej acyloenzymu w obecności wody umożliwia regenerację enzymu i przeprowadzenie kolejnego cyklu katalizy [76].

Z dotychczasowych danych wynika, że sygnałowe peptydazy typu I nie są hamowane przez żadne komercyjnie dostępne inhibitory proteaz (jak np. o-fenantrolina, bestatyna, chlorometryloketony, dichloroizokumaryna, elastinal, aprotinina czy chymostatyna) [63]. Podobnie większość rutynowo używanych inhibitorów peptydaz jest także nieaktywna względem Sp-az typu I [102]. Kilkanaście lat temu dwie firmy farmaceutyczne odkryły  $\beta$ -laktamy hamujące aktywność sygnałowej peptydazy *E. coli* [3]. Najaktywniejszym był 3-karboksy-allylo-(5S, 6S)-[(R)-acetoksyetylo]-penem, dla którego wartość  $IC_{50}$  (stężenie inhibitora, przy którym następuje zahamowanie aktywności enzymu w 50%) wynosiła 50  $\mu$ M. Znanymi inhibitorami sygnałowych peptydaz są także: arylomycyna A2 [93], lipopeptydy [55], a także peptydowe aldehydy [10]. Niezbędna rola sygnałowych peptydaz w funkcjonowaniu i wzroście bakterii powoduje, iż białka te są brane pod uwagę jako ważny cel molekularny w projektowaniu leków do stosowania w terapii zakażeń bakteryjnych.

Peptydazy sygnałowe występują u wszystkich bakterii z wyjątkiem pozbawionych ściany komórkowej mykoplazm [76]. Enzymy te mają nieco odmienną budowę i swoistość niż eukariotyczne sygnałowe peptydazy. Cechy te sprawiają, że naturalne bądź syntetyczne inhibitory tych białek, będą mogły selektywnie hamować bakteryjne enzymy bez wpływu na mitochondrialne sygnałowe peptydazy lub Sp-azy retikulum endoplazmatycznego gospodarza.

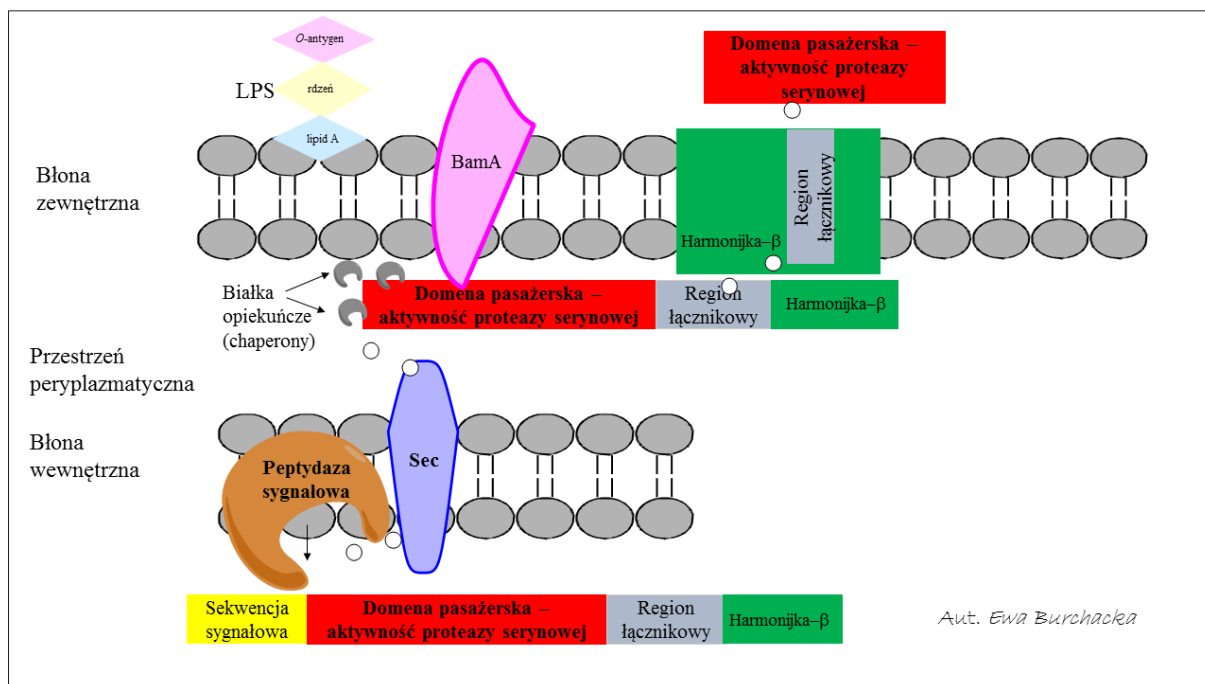
### Romboidowe proteazy serynowe

Romboidowe proteazy serynowe są wewnątrz błonowymi białkami enzymatycznymi. Zbudowane są z sześciu domen transbłonowych z N- i C-końcami zakotwiczonymi w cytosolu. Za aktywność katalityczną romboidowych proteaz odpowiada, znajdująca się w czwartej domenie transbłonowej, katalityczna diada składająca się z reaktywnej reszty seryny oraz reszta histydyny, która jest umiejscowiona w szóstej domenie transbłonowej. Jedyna poznana do tej pory funkcja bakteryjnych romboidowych proteaz, to aktywacja translokazy TatA u Gram-ujemnych bakterii *Providencia stuartii*. Proces ten jest niezbędny do zapoczątkowania translokacji białek przez błony bakteryjne w zakażeniu dróg moczowych wywołanym przez szczep *P. stuartii* [112].

### Proteazy z rodziny Omptin

Omptiny to proteazy należące do unikalnej grupy integralnych białek błony zewnętrznej Gram-ujemnych bakterii z rodziny pałeczek jelitowych (*Enterobacteriaceae*), które są ściśle związane z ich patogennością. Jedną z proteaz należących do rodziny Omptin jest proteaza Ompt, która jest białkiem błonowym pałeczek okrężnicy (*E. coli*). Początkowo białko to zostało sklasyfikowane jako serynowa proteaza ze względu na obecność katalitycznej diady Asp210 i His212,





Ryc. 4. Schemat sekrecji białkowych autotransporterów występujący w systemie V u bakterii Gram-ujemnych

która przypomina klasyczną katalityczną triadę proteaz serynowych (Asp-His-Ser) [54]. Opracowanie struktury krystalicznej proteazy OmpT wskazuje, że w aktywności katalitycznej zasadniczą rolę ogrywa diada Asp83 i Asp85, która stabilizuje katalityczny produkt pośredni. Na tej podstawie białko OmpT zostało przeklasyfikowane i zaliczone do podrodziny proteaz aspartylowych [111]. Ze względu na to, iż proteazy OmpT łączą w sobie cechy serynowych i aspartylowych proteaz, enzymy te zostały uwzględnione w niniejszym opracowaniu [7]. W błonie zewnętrznej bakterii białko OmpT przyjmuje strukturę  $\beta$ -baryłki, a miejsce aktywne enzymu jest wystawione w kierunku powierzchni komórki. Dotychczasowe dane sugerują, że OmpT, degradując syntetyzowane u ludzi przeciwbakteryjne peptydy, takie jak protamina czy katelicydyna LL-37, pełni w komórce bakteryjnej funkcje ochronne. Charakterystyka oczyszczonego enzymu wskazuje na wyjątkową swoistość substratową proteazy OmpT. Proteaza ta hydrolizuje wiązania peptydowe między dwoma zasadowymi resztami aminokwasowymi argininy [53].

### Autotransportery

Jedną z grup bakteryjnych proteaz serynowych tworzą białkowe autotransportery. Budowa ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich determinuje, odmienne niż w przypadku mających błonę zewnętrzną i cytoplazmatyczną bakterii Gram-ujemnych, sposoby transportu białek. Warto tu przypomnieć, że wyróżnia się sześć systemów sekrecyjnych bakterii Gram-dodatnich: ścieżka Sec (secretion), Tat (twin-arginine translocation), FEA (flagella export apparatus), FPE (fimbriilin-protein exporter), holin (hole forming) i Wss (WXG100 secretion system) oraz pięć systemów sekrecji (I-V) autotransporterów bakterii Gram-ujemnych [20,36]. System

I jest zdefiniowany jako ścieżka sekrecyjna hemolizyny pochodząca od szczepów *E. coli* (HlyA) [97]. System II jest związany z wydzielaniem pullulanazy przez pałeczki *Klebsiella oxytoca* [87]. System III jest obszarem intensywnych badań i nie jest jeszcze dostatecznie poznany. System IV wymaga skoordynowanego udziału przynajmniej dziewięciu białek i umożliwia m.in. wymianę materiału genetycznego między drobnoustrojami, ich ewolucję, nabywanie nowych cech i plastyczność genomów [30].

Najlepiej scharakteryzowany system sekrecji u bakterii Gram-ujemnych dotyczy wydzielania toksyn przez pałeczki krztuśca (*Bordetella pertussis*) [9]. Białka, wydzielane zewnątrzkomórkowo w wyniku działania systemu V są zbudowane z trzech domen poliproteinowych. Należy do nich sekwencja liderowa, umożliwiająca transport białka przez wewnętrzną błonę lipidową, domena pasażerska i C-końcowa  $\beta$ -domena, która tworzy pory w błonie wewnętrznej, co sprzyja skutecznej translokacji domeny pasażerskiej na zewnątrz komórki (ryc. 4) [30]. W systemie sekrecji autotransporterów typu V, łańcuch białkowy jest transportowany przez wewnętrzną błonę cytoplazmatyczną dzięki obecności białka Sec. W peryplazmie przejściowa postać białka przyjmuje stabilną konformację podczas interakcji z peryplazmatycznymi chaperonami i białkiem BamA. Następnie domena pasażerska jest transportowana przez błonę zewnętrzną.

Pierwszą scharakteryzowaną proteazą serynową ulegającą translokacji w systemie V jest proteaza IgA1 [84]. Należy do rodziny trypsynopodobnych proteaz serynowych i jest odpowiedzialna za rozcinanie regionu zawiasowego ludzkiej immunoglobuliny IgA, a także za hydrolizę integralnej błonowej glikoproteiny lizosomów [32]. Umoż-



**Tabela 1.** Domeny pasażerskie autotransporterów bakterii Gram-ujemnych o aktywności proteaz serynowych

Organizm	Proteaza	Funkcja	Jednostka chorobowa
<i>Dichelobacter nodosus</i>	<b>BprV</b> <b>BprB</b>	nieznana	zapalenie związane z zakażeniem kończyn [57]
	<b>AprV2</b>	nieznana	
	<b>BprX</b>	nieznana	
<i>Haemophilus influenzae</i>	<b>IgA1</b>	hydroliza IgA	zapalenie opon mózgowych [38]
	<b>Hap</b>	adherencja	zapalenie układu oddechowego [39]
<i>Neisseria</i> spp.	<b>IgA1</b>	hydroliza IgA	rzeżączka [59]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<b>PspA</b>	nieznana	ropnie, zapalenie osierdzia, zapalenie układu moczowego, zapalenie opon mózgowych [47]
	<b>PspB</b>	nieznana	
<i>Serratia marcescens</i>	<b>SSp-H1</b>	nieznana	zapalenie rogówki [72]
	<b>SSp-H2</b>	nieznana	
<i>Escherichia coli</i>	<b>EspC</b>	nieznana	biegunka [63]
	<b>Hbp</b>	degradacja hemoglobiny	sepsa, zakażenia ran skórnych [73]
	<b>Pet</b>	toksyna, hydroliza spektryny, narusza powierzchnię tkanek	biegunka [22,35]
	<b>Pic</b>	mediator oporności serologicznej, hemaglutynacja	krwawa biegunka [34]
	<b>Sat</b>	zwyrodnienia nerek	zakażenie układu moczowego [31]
	<b>Vat</b>	cytotoksyna	sepsa, zakażenie układu moczowego [77]
<i>Shigella flexneri</i>	<b>SepA</b>	inwazja, kolonizacja w jelicie	biegunka, owrzodzenia, zapalenie jelita [2,5]
	<b>SigA</b>	cytotoksyna	
	<b>Pic</b>	mediator oporności serologicznej, hemaglutynacja	

liwia to reprodukcję bakterii wewnątrz komórki. Proteaza IgA1 uczestniczy w uwalnianiu czynnika martwicy nowotworów i cytokin podczas zakażeń wywołanych przez dwinki (*Neisseria*) (tabela 1) [59]. Białko Hap, pochodzące ze szczepów *Haemophilus influenzae*, jest kolejnym opisanym autotransporterem białkowym (tabela 1). Należy do rodziny chymotrypsynopodobnych proteaz serynowych zawierających w miejscu aktywnym charakterystyczną triadę katalityczną zbudowaną z reszt His98, Asp140, Ser243. Podobnie jak chymotrypsyna hydroлізуje wiązania peptydowe po karboksylowej stronie du-

zych hydrofobowych reszt aminokwasowych, takich jak fenyloalanina czy tyrozyna [26]. Mimo że białko to wykazuje homologię do proteazy IgA1 w 35%, nie jest zdolne do hydrolizy przeciwciał klasy IgA gospodarza [38]. Białko Hap pośredniczy w procesach umożliwiających przyleganie bakterii do komórek nabłonka (adherencja) i odpowiada też za ich agregację. Ułatwia to kolonizację powierzchni komórek nabłonka przez mikroorganizmy i może doprowadzić do zakażeń układu oddechowego i zapalenia opon mózgowych wywołanych przez *H. influenzae*. Inne funkcje białka Hap nie są jeszcze pozna-

ne, jednak sugeruje się, że może uczestniczyć w degradacji immunoglobulin i zewnątrzkomórkowych białek błonowych [39].

Ponad 10 lat temu opisano autotransportery o aktywności serynowych proteaz wydzielane przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae* (tabela 1). Grupę tych białek nazwano SPATE (Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*). Ich rola w patogenezie zakażeń bakteryjnych nie jest do końca poznana [37]. Kilka proteaz z grupy SPATE jest wydzielanych przez enteroagregacyjne pałeczki *E. coli* (EAEC) [43]. Szczepy EAEC są dość słabo poznaną grupą patogenów. Są czynnikiem etiologicznym uciążliwych wodnistych biegunek, często o charakterze przewlekłym. Na zachorowanie narażone są przede wszystkim niemowlęta i małe dzieci, szczególnie w krajach rozwijających się. Niemniej jednak w krajach rozwiniętych szczepy EAEC są izolowane także od osób dorosłych. Fernandes i wsp. [25] oraz Steiner i wsp. [99] zauważyli, że u dzieci nawet bezobjawowe zakażenia EAEC mogą się przyczynić do powstania poważnych zaburzeń wzrostu, najprawdopodobniej w związku ze znacznym ograniczeniem wchłaniania składników odżywczych z przewodu pokarmowego. Najważniejszą cechą wirulencji szczepów EAEC jest ich zdolność do bardzo ścisłego przylegania do nabłonka jelita i tworzenie biofilmu z dużą ilością śluzu, co znacznie upośledza nie tylko wchłanianie wody, ale też składników odżywczych. Powyższy typ adhezji jest uwarunkowany obecnością wielu czynników wirulencji kodowanych na dużym plazmidzie (pAA) [69]. Jednym z nich jest toksyna Pet (plazmin-encoded toxin) [22].

Henderson i wsp. [35] wprowadzili mutację w genie kodującym białko Pet i wykazali *in vitro*, że szczep mutanta mimo zdolności do adhezji, nie wywołuje charakterystycznych zmian w komórkach nabłonka w porównaniu z typem dzikim. Pet rozcina spektrynę utrzymującą kształt komórki i regulującą jej ruchliwość. Inne dane sugerują, że białko Pet indukuje zmiany w śluzie jelita szczura sprzyjające rozwojowi zakażeń bakteryjnych [70].

Kolibakteriozy wywołane przez pałeczki okrężnicy patogenne dla ptaków (avian pathogenic *E. coli* - APEC) są jedną z głównych przyczyn dotkliwych strat w hodowli drobiu. Mikroorganizmy te zaburzają głównie funkcjonowanie układu oddechowego, a także wpływają na rozwój posocznicy u ptaków hodowlanych. Domena pasażerska proteazy Tsh ekspresjonowana przez szczepy APEC ma dwufunkcyjną aktywność: proteolityczną (proteoliza kazeiny i mucyny) i adhezyjną (wiązanie się z wysokim powinowactwem do czerwonych krwinek powodujące aglutynację) [52].

Białka SepA, SigA i Pic należą do grupy autotransporterów SPATE, które są wydzielane przez należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki jelitowe z rodzaju *Shigella* [36]. Patogenność tych drobnoustrojów warunkuje ich zdolność do wnikania, zasiedlania komórek gospodarza i namnażania się w nich. Czynnikiem ich wirulencji jest

wytwarzanie i uwalnianie toksyn, które działają niszcząco na różne komórki i tkanki gospodarza, wywołując stan zapalny oraz inne objawy kliniczne. Bakterie te są szczególnie niebezpieczne dla ludzi w podeszłym wieku, osłabionych, chorych o obniżonej odporności immunologicznej czy znajdujących się w stanie immunosupresji. Stwarzają realne zagrożenie również dla małych dzieci, których układ immunologiczny jest niedostatecznie rozwinięty lub jest obciążony niedoborami immunologicznymi [44]. Drobnoustroje te wywołują głównie choroby układu pokarmowego, ujawniające się silną biegunką, często zawierającą krew lub śluz, której towarzyszą zawroty głowy, nudności oraz wysoka gorączka [45]. Pałeczki jelitowe mogą być odpowiedzialne również za zakażenia układu moczowego, zapalenie opon mózgowych oraz schorzenia jelit, w tym duru brzuszego oraz czerwonki bakteryjnej [27].

Charakterystyka białka SepA sugeruje, że może być wymagane podczas inwazji i destrukcji nabłonka jelita zakażonego organizmu. Proteaza ta hydrolizuje substraty swoiste dla katepsyny G, która jest serynową proteazą wytwarzaną przez jednojądrzaste leukocyty krwi obwodowej. Jednak w odróżnieniu od katepsyny G, proteaza SepA nie degraduje fibronektyny i angiotensyny I oraz nie wpływa na agregację ludzkich płytek krwi [5]. Funkcjonalna analiza białka Pic sugeruje, że jest czynnikiem aktywującym mucynazę odpowiedzialną za degradację mucyny, która stanowi chemiczną barierę nabłonka. Proteaza Pic odpowiada także za hemaglutynację i jest mediatorem oporności serologicznej [34]. Wydzielana pozakomórkowo przez szczepy *Shigella* proteaza SigA jest związana z degradacją kazeiny. Stwierdzono cytopatyczną funkcję SigA w stosunku do komórek Hep-2. Badania te mogą sugerować, że białko to jest toksyną komórkową odgrywającą rolę w patogenezie zakażeń *Shigella* [2].

Zapalenie pęcherza u kobiet, odmiedniczkowe zapalenie nerek u obu płci i zapalenie stercza u mężczyzn to choroby, które są związane z bakteryjnymi zakażeniami układu moczowego, w których często czynnikiem etiologicznym jest pałeczka okrężnicy. Przypuszcza się, że patogenne działanie tego mikroorganizmu jest związane z wytwarzaniem swoistych czynników wirulencji. Odkryta kilka lat temu nowa serynowa proteaza Vat (tabela 1) może odgrywać istotną rolę w zakażeniach układu moczowego wywołanych przez *E. coli*. Proteaza Vat należy do rodziny białek SPATE, a jej występowanie stwierdzono u patogennych szczepów *E. coli* CFT073 i RS218, związanych z zakażeniami układu moczowego [77]. Sugeruje się, że aktywność białka Vat jest niezbędna do przetrwania chorobotwórczych bakterii *E. coli* w krwiobiegu zakażonego organizmu [77]. Parreira i Gyles zidentyfikowali gen kodujący białko Vat w ptasich patogennych szczepach *E. coli* (Ec222) izolowanych od kurcząt z ogólnoustrojową reakcją zapalną. Wykazano, że gen kodujący to białko odpowiada za wirulencję [79].

Dwie dekady temu opisano proteazę EspC, która jest ekspresjonowana głównie przez enteropatogenne szczepy *E.*

*coli* (tabela 1). Delecja w genie kodującym to białko wykazała, że EspC nie odgrywa znaczącej roli w adherencji i inwazji bakterii w miejscu zakażenia [63]. Choć funkcja EspC nie jest dotąd poznana, sugeruje się, że białko to ma aktywność enterotoksyny [63].

Izolacja szczepów CFT073 *E. coli* z krwi i moczu pacjentów, u których zdiagnozowano odmiedniczkowe zapalenie nerek, doprowadziła do oczyszczenia i zidentyfikowania białka Sat (107 kDa). Podobnie jak białko Pet, białko Sat wykazuje aktywność proteolityczną i uczestniczy w destrukcji nerek, pęcherzyków Hk-2 i linii komórkowych Hep-2 [31]. Wykazano, że proteaza Sat powoduje zwyrodnienia pęcherzyków linii komórkowych CRL1749 i CRL1537 nerek. Analizując wyniki uzyskane w modelowym zakażeniu układu moczowego u myszy stwierdzono, że mutant *E. coli* z wyłączonym genem ekspresjonującym białko Sat, jest podobny do szczepu *E. coli* typu dzikiego CFT073, który także kolonizuje narządy układu moczowego zwierząt. U myszy zakażonej bakteriami *E. coli* typu dzikiego obserwuje się zwyrodnienia komórek układu moczowego. Skutków takich nie obserwowano u myszy zakażonej mutantem *sat*. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że białko Sat uczestniczy w patogenezie zakażeń układu moczowego, gdyż przyczynia się do uszkodzeń nerek podczas zakażeń bakteryjnych [31].

Dokonując przeglądu wydzielanych zewnątrzkomórkowo autotransporterów o aktywności proteaz serynowych, warto wspomnieć o proteazie Hbp. Jest czynnikiem niezbędnym w symbiozie patogennych szczepów *E. coli* i *Bacteroides fragilis*, których działanie wywołuje owrzodzenia organów wewnętrznych. Autotransportery Hbp uwalniane przez *E. coli* powodują degradację hemoglobiny i dostarczają hem dla obu gatunków drobnoustrojów [73]. Inną grupą autotransporterów białkowych systemu V są subtylizynopodobne proteazy serynowe. Należą do nich proteazy Ssp-H1 i Ssp-H2 z *Serratia marcescens* [72], PspA i PspB z *Pseudomonas fluorescens* [47], Ssa1 z *Pasteurella haemolytica* [28], BprV, BprB, AprV2 i BprX z *Dichelobacter nodosus* [57]. Stwierdzono, że proteaza AprV2 odgrywa znaczącą rolę w patogenezie zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje. Mutant pozbawiony genu *aprV2* nie powodował gnicia kończyn u owiec, podczas gdy typ dziki był czynnikiem etiologicznym tego schorzenia [24]. Mimo że wiele z tych białek odkryto kilkanaście lat temu, to postęp w określaniu roli, jaką odgrywać mogą w organizmie gospodarza podczas zakażenia, jest wciąż nieznacznym.

Rola autotransporterów białkowych o aktywności proteaz serynowych może być istotna podczas zakażeń wywołanych przez patogenne bakterie Gram-dodatnie. Większość białek bakterii Gram-dodatnich przeznaczonych do sekrecji na zewnątrz komórki jest wydzielanych za pomocą systemu sekrecji Sec. Taki sposób transportu białek umożliwia bakteriom prawidłowy rozwój. Analiza proteomiczna sekretom *B. subtilis* wykazała, że 135 spośród 300 potencjalnych eksportowanych białek za-

wiera sekwencje sygnałowe kierujące je do transportu na ścieżce Sec [104]. W przypadku tego systemu transportu białka wydzielane zewnątrzkomórkowo mają jednakową organizację strukturalną – dodatkowo naładowany N-końiec (N), hydrofobowy rdzeń (H) oraz region cięcia (C) rozpoznawany przez peptydazy sygnałowe (Sp-azy). Domena N-końcowa odpowiedzialna jest za oddziaływanie z aparatem sekrecyjnym oraz z fosfolipidami dwuwarstwy lipidowej. Region H umożliwia zakotwiczenie w błonie komórkowej [104]. Domena C-końcowa zawiera natomiast sekwencję, która jest rozcinana przez peptydazę sygnałową. Obecność kilku typów Sp-az jest charakterystyczna dla różnych szczepów bakterii. Przykładem mogą być SipS i SipT, które są głównymi Sp-azami *B. subtilis*, a obecność jednej z nich jest niezbędna do ich przeżycia. Pozostałe Sp-azy mają pokrywające się i dające się zastępować funkcje. W sytuacji, gdy transportowane białko nie zostanie uwolnione z kanału sekrecyjnego, dochodzi do związania go ze ścianą komórkową, co prowadzi do zahamowania wzrostu bakterii.

### ATP-zależne proteazy serynowe (grupa III)

Za odpowiednią strukturę trzyczłonową białek związanych z powierzchnią błony i ściany komórkowej oraz za degradację nieprawidłowych białek odpowiadają proteazy kontrolne. Należą do nich m.in. białka z rodziny Htr, które mają aktywność serynowych proteaz. Enzymy te są indukowane w odpowiedzi na czynniki, które mogłyby naruszyć strukturę białek [116]. Białka te zawierają domeny wiążące ATP, dlatego też często określa się je jako ATP-zależne białka pomocnicze [49]. Uważa się, że odgrywają główną rolę w przestrzeni peryplazmatycznej bakterii [49]. Białka Htr izolowane z różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich wykazują aktywność proteaz serynowych, jednak ich fizjologiczna rola i budowa są zasadniczo odmienne [49]. Białka z rodziny Htr zawierają dwie konserwatywne domeny, jedną o aktywności proteazy chymotrypsynopodobnej i drugą C-końcową domenę PDZ. Ta ostatnia to domena sygnałowych białek składająca się z 80-90 reszt aminokwasowych uczestnicząca w zakotwiczeniu transmembranowych białek do cytoskieletu. Niektóre białka tej rodziny mają domeny z regionem transmembranowym i umiejscowioną na N-końcu domenę wiążącą czynnik wzrostu insuliny. U pałeczek okrężnicy scharakteryzowano proteazy DegQ, DegP i DegS, należące do grupy proteaz Htr. Te trzy białka wykazują wysoką homologię sekwencji aminokwasowej w rejonie domen proteazowych. Jednak DegP i DegQ mają dwie domeny PDZ, podczas gdy DegS zawiera tylko jedną taką domenę [49]. Htr/DegP pochodząca z *E. coli* chroni bakterie przed szokiem cieplnym lub degradacją uszkodzonych białek w przestrzeni peryplazmatycznej [49]. DegP jest serynową proteazą, której miejsce katalityczne budują reszty His105, Asp135 i Ser210. Jedynymi opisanymi w literaturze inhibitorami tych proteaz są: diizopropylfluorofosforan (DFP) [49] i chlorometyloketony [33]. Wiele białek stanowi naturalne substraty dla proteazy DegP. Należą do nich kolicyna, podjednostki K88 i K99 piliny, MalS i PapA1 piliny [103]. Proteaza DegP nie hydrolizuje

białek, które występują w postaci zwiniętej [33]. Jednak aktywność proteolityczna pojawia się, gdy substrat jest częściowo rozfałdowany. Może to sugerować, że dostęp substratu do miejsca aktywnego jest ograniczony.

DegP, oprócz proteolitycznej aktywności, pełni funkcję białka opiekuńczego. DegP uzyskuje aktywność chaperonową tylko w temperaturze poniżej 28°C, podczas gdy jego aktywność proteolityczna wzrasta w temperaturze 32-42°C. Uważa się, że białko to w zależności od panujących warunków ma możliwość zmian funkcji z białka opiekuńczego w proteazę. Geny *degQ* i *degS* zostały zidentyfikowane jako homologi genu *degP*. Jednak fizjologiczna funkcja DegQ nie jest dokładnie poznana. Sugeruje się, że DegQ może funkcjonalnie zastępować DegP [49]. DegQ jest serynową proteazą, której profil specyficzności substratowej jest bardzo podobny do DegP. Proteaza ta rozpoznaje Val/Xaa i Ile/Xaa w pozycji P1/P1' [49]. DegS jest proteazą zakotwiczoną w błonie peryplazmatycznej i odpowiada za funkcje związane z odpowiedzią na stres. Powoduje uwalnianie aktywnych czynników, które indukują transkrypcję różnych genów, dzięki czemu DegS działa jak aktywator transkrypcji [49].

Białka z rodziny Htr zostały także zidentyfikowane u patogennych szczepów *Porphyromonas gingivalis*, które odpowiadają głównie za przewlekły stan zapalny jamy ustnej. Bakterie te rozwijają się w miejscach, w których panuje temperatura wyższa niż temperatura ciała i charakterystyczny jest zmieniający się poziom tlenu i pH [103]. Takie warunki są niekorzystne dla rozwoju i życia wielu mikroorganizmów. Natomiast szczepy *P. gingivalis* wykształciły systemy pozwalające im skutecznie funkcjonować w środowisku jamy ustnej. Badania genetyczne, polegające na wyłączeniu genu odpowiedzialnego za ekspresjonowanie białek Htr wykazały, że zarówno mutant *htr*, jak i bakterie typu dzikiego szczepów *P. gingivalis*, mimo zmieniających się warunków pH i temperatury, przeżywały w obu przypadkach. Wskazuje to, że gen *htr* kodujący białka Htr nie warunkuje oporności drobnoustrojów na szok termiczny i zmiany pH. Jednak mutant *htr P. gingivalis* potraktowany roztworem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wykazywał znacznie większą wrażliwość niż typ dziki, co jednak może dowodzić roli białka Htr w walce bakterii ze stresem oksydacyjnym [103]. Wykazano, że mutant *htr* podczas szoku cieplnego wykazuje obniżoną aktywność arginino-gingipainową. Gingipainy są proteazami cysteinowymi, które przyczyniają się do powstawania i rozwoju parazytozozy [119]. W badaniach prowadzonych na myszach stwierdzono, że mutant *htr P. gingivalis* nie przeżywa w organizmie gospodarza. Może to wskazywać na istotną rolę białek Htr w patogeniezie zakażeń spowodowanych przez chorobotwórcze mikroorganizmy [91]. Obecność białek HtrA wykazano także u bakterii *Helicobacter pylori*, uważanych za czynnik etiologiczny wrzodów i raka żołądka u ludzi [60]. Stwierdzono, że białka z rodziny HtrA pochodzące ze szczepów *H. pylori* hydrolizują E-kadherynę, powodując zaburzenia prawidłowego funkcjonowania bariery naskórka. Pozwala to bakteriom na zasiedlanie wewnętrznych przestrzeni peryplazmatycznych [41]. Rola białek Htr okazuje się

znacząca także dla paciorkowców. Delecja genu kodującego białka Htr całkowicie znosi wirulentne działanie tych mikroorganizmów. W badaniach na modelu mysim stwierdzono, że w porównaniu ze szczepem dzikim *Streptococcus pneumoniae*, jego mutant pozbawiony genu kodującego białka Htr tylko w niewielkim stopniu indukuje u zwierząt zapalenie płuc. Rola białek Htr, mimo że nieco odmienna dla różnych gatunków bakterii, okazuje się istotna dla ich prawidłowego funkcjonowania lub przeżycia w miejscach zakażenia. Klasą ATP-zależnych bakteryjnych proteaz serynowych są białka z rodziny ClpP. Występują w wielu szczepach, takich bakterii jak *Mycobacterium*, *Bacteroides*, *Chlorobium*, *Chlamydidium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Pseudomonas* czy *Vibrio cholerae* [118]. Proteaza ClpP została po raz pierwszy zidentyfikowana w szczepach *E. coli* zawierających tylko jedną kopię białka. Tworzy ona kompleks z ClpA (powstaje ClpAP) i ClpX (powstaje ClpAPX), które są ATP-zależnymi białkami opiekuńczymi (chaperonami). W usuwaniu trwale uszkodzonych na skutek szoku termicznego białek biorą udział proteazy ClpAP, ClpXP [118]. Mechanizm promowania wewnątrzkomórkowej proteolizy z udziałem białek opiekuńczych jest nieznan. Przypuszcza się, że niesfałdowane substraty białkowe skierowane przez białka ClpA i ClpX do kanału utworzonego przez ClpP są degradowane. Udział białek opiekuńczych w proteolizie polega na stabilizacji populacji rozpuszczalnych, nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów, przez wiązanie się do ich nienatywnych struktur. O dalszym losie nieprawidłowego białka decyduje powinowactwo nienatywnych białek do proteaz i białek opiekuńczych oraz stosunek tempa degradacji, agregacji i ponownego związania [1]. Dotychczasowe dane dowodzą, że kompleks proteazy ClpP1P2 w szczepach *Mycobacterium tuberculosis* jest niezbędny do ich przeżycia. Boranowe inhibitory proteazy ClpP1P2 wykazują właściwości przeciwbakteryjne względem szczepów *M. tuberculosis*, co może dowodzić, że białka te są atrakcyjnym celem do projektowania potencjalnych leków skierowanych przeciwko tym bakteriom.

Podsumowując, w dobie narastającej oporności drobnoustrojów na antybiotyki oraz w świetle przedstawionych danych, bakteryjne proteazy serynowe, jako enzymy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bakterii i podtrzymywania ich podstawowych funkcji życiowych, to bardzo interesujący temat związany z patogenizacją zakażeń bakteryjnych. Zaburzenie prawidłowego funkcjonowania tych białek u bakterii zwykle zaburza funkcję życiowych drobnoustroju, a w konsekwencji do jego eliminacji z organizmu gospodarza. Koncepcja leczenia zakażeń bakteryjnych przy zastosowaniu inhibitorów proteaz opiera się na założeniu, że inaktywacja tych białek doprowadzi do śmierci drobnoustroju. Niewątpliwie stąd też wynika atrakcyjność tych enzymów, jako potencjalnego celu do konstruowania nowych i bardzo ściśle ukierunkowanych leków, skutecznych w terapii wielu zakażeń wywołanych przez patogenne bakterie.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Akopian T., Kandror O., Raju R.M., Unnikrishnan M., Rubin E.J., Goldberg A.L.: The active ClpP protease from *M. tuberculosis* is a complex composed of a heptameric ClpP1 and a ClpP2 ring. *EMBO J.*, 2012; 31: 1529-1541
- [2] Al-Hasani K., Henderson I.R., Sakellaris H., Rajakumar K., Grant T., Nataro J.P., Robins-Browne R., Adler B.: The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 2457-2463
- [3] Allsop A.E., Brooks G., Bruton G., Coulton S., Edwards P.D., Hatton I.K., Kaura A.C., Mc Lean S.D., Pearson N.D., Smar T.C., Southgate R.: Penem inhibitors of bacterial signal peptidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995; 5: 443-448
- [4] Barrett A.J., Rawlings N.D.: Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995; 318: 247-250
- [5] Benjelloun-Touimi Z., Si Tahar M., Montecucco C., Sansonetti P.J., Parsot C.: SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. *Microbiol.*, 1998; 144: 1815-1822
- [6] Bolhuis A., Venema G., Quax W.J., Bron S., van Dijk J. M.: Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 24531-24538
- [7] Brannon J.R., Burk D.L., Leclerc J.M., Thomassin J.L., Portt A., Berghuis A.M., Gruenheid S., Le Moual H.: Inhibition of outer membrane proteases of the ompT family by aprotinin. *Infect. Immun.*, 2015; 83: 2300-2311
- [8] Burchacka E., Sieńczyk M., Frick I.M., Wysocka M., Lesner A., Oleksyszyn J.: Substrate profiling of *Fingoldia magna* SufA protease, inhibitor screening and application to prevent human fibrinogen degradation and bacteria growth in vitro. *Biochimie*, 2014; 103: 137-143
- [9] Burns D.L.: Biochemistry of type IV secretion. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999; 2: 25-29
- [10] Buzder-Lantos P., Bocksteal K., Anné J., Herdewijn P.: Substrate based peptide aldehyde inhibits bacterial type I signal peptidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 2880-2883
- [11] Carmona C., Gray G.L.: Nucleotide sequence of the serine protease gene of *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Nucleic Acids Res.*, 1987; 15: 6757
- [12] Casey J., Pichichero M.E.: Changes in frequency and pathogens causing acute otitis media in 1995-2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2004; 23: 824-828
- [13] Chagnot C., Zorgani M.A., Astruc T., Desvaux M.: Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front. Microbiol.*, 2013; 4: 303
- [14] Conelly M.B., Young G.M., Sloma A.: Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 4159-4167
- [15] Cregg K.M., Wilding I., Black M.T.: Molecular cloning and expression of the spsB gene encoding an essential type I signal peptidase from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 5712-5718
- [16] Date T.: Demonstration by a novel genetic technique that leader peptidase is an essential enzyme of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1983; 154: 76-83
- [17] Date T., Wicker W.: Isolation of the *Escherichia coli* leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981; 78: 6106-6110
- [18] Dave J.A., Gey van Pittius N.C., Beyers A.D., Ehlers M.R., Brown G.D.: Mycosin-1, a subtilisin-like serine protease of *Mycobacterium tuberculosis*, is cell wall-associated and expressed during infection of macrophages. *BMC Microbiol.*, 2002; 2: 30
- [19] Derrick S.C., Morris S.L.: The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol.*, 2007; 9: 1547-1555
- [20] Desvaux M., Hébraud M., Talon R., Henderson I.R.: Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.*, 2009; 17: 139-145
- [21] Dubin G., Stec-Niemczyk J., Kisiełowska M., Pustelny K., Popowicz G.M., Bista M., Kantyka T., Boulware K.T., Stennicke H.R., Czarna A., Phopaisarn M., Dougherty P.S., Thøgersen I.B., Enghlid J.J., Thornberry N. i wsp.: Enzymatic activity of the *Staphylococcus aureus* Sp1B serine protease is induced by substrates containing the sequence Trp-Glu-Leu-Gln. *J. Mol. Biol.*, 2008; 379: 343-356
- [22] Eslava C., Navarro-García F., Czeczulin J.R., Henderson I.R., Cravito A., Nataro J.P.: Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, 1998; 66: 3155-3163
- [23] European Commission. Communication From The Commission On A Community Strategy Against Antimicrobial Resistance, Brussels, 2001, 1, COM 333
- [24] Feng X., Akiyoshi D.E., Widmer G., Tzipori S.: Characterization of subtilas protease in *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *J. Parasitol.*, 2007; 93: 619-626
- [25] Fernandes R.M., Carbonare S.B., Carneiro-Sampaio M.N., Traub-Lis R.: Inhibition of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion to Hep-2 cells by secretory immunoglobulin A from human colostrum. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2001; 20: 672-678
- [26] Fink D.L., Cope L.D., Hansen E.J., Geme J.W.3rd: The *Hemophilus influenzae* Hap autotransporter is a chymotrypsin clan serine protease and undergoes autoprolysis via an intermolecular mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 39492-39500
- [27] Girard M.P., Steele D., Chaignat C.L., Kieny M.P.: A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*, 2006; 24: 2732-2750
- [28] Gonzalez C.T., Maheswaran S.K., Murtaugh M.P.: *Pasteurella haemolytica* serotype 2 contains the gene for a noncapsular serotype 1-specific antigen. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 1340-1348
- [29] Goodyear C.S., Silverman G.J.: Death by a B cell superantigen in vivo V<sub>H</sub>-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a *Staphylococcal* toxin. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 1125-1139
- [30] Guyer D.M., Henderson I.R., Nataro J.P., Mobley H.L.: Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2000; 38: 53-66
- [31] Guyer D.M., Radulovic S., Jones F.E., Mobley H.L.: Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 4539-4546
- [32] Hauck C.R., Meyer T.F.: The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett.*, 1997; 405: 86-90
- [33] Hauske P., Meltzer M., Ottman C., Krojer T., Clausen T., Ehrmann M., Kaiser M.: Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009; 17: 2920-2924
- [34] Henderson I.R., Czeczulin J., Eslava C., Noriega F., Nataro J.P.: Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 5587-5596
- [35] Henderson I.R., Hicks S., Navarro-García F., Elias W.P., Philips A.D., Nataro J.P.: Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 5338-5344

- [36] Henderson I.R., Nataro J.P.: Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 1231-1243
- [37] Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Nataro J.P.: The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.*, 1998; 6: 370-378
- [38] Hendrixson D.R., de la Morena M.L., Stathopoulos C., St. Geme III J.W.: Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* hap protein. *Mol. Microbiol.*, 1997; 26: 505-518
- [39] Hendrixson D.R., St. Geme III J.W.: The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol. Cell.*, 1998; 2: 841-850
- [40] Hirasava Y., Takai T., Nakamura T., Mitsuishi K., Gunavan H., Suto H., Ogawa T., Wang X.L., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H.: *Staphylococcus aureus* extracellular protease causes epidermal barrier dysfunction. *J. Invest. Dermatol.*, 2010; 130: 614-617
- [41] Hoy B., Löwer M., Weyding C., Carra G., Tegtmeyer N., Geppert T., Schröder P., Sewald N., Backert S., Schneider G., Wessler S.: *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep.*, 2010; 11: 798-804
- [42] Imamura T., Pike R.N., Potempa J., Travis J.: Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J. Clin. Invest.*, 1994; 94: 361-367
- [43] Jacobson M., Sali A.: Comparative protein structure modeling and its application to drug discovery. *Annu. Rep. Med. Chem.*, 2004; 39: 259-276
- [44] Jarzab A., Górski-Frączek S., Rybak J., Witkowska D.: Zakażenia pałeczkami jelitowymi - diagnostyka, oporność na antybiotyki i profilaktyka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 55-72
- [45] Jennison A.V., Verma N.K.: *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004; 28: 43-58
- [46] Karlsson C., Andersson M.L., Collin M., Schmidtchen A., Björck L., Frick I.M.: SufA - a novel subtilisin-like serine proteinase of *Finegoldia magna*. *Microbiology*, 2007; 153: 4208-4218
- [47] Kawai E., Idei A., Kumura H., Shimazaki K., Akatsuka H., Omori K.: The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1446: 377-382
- [48] Kennan R.M., Dhungyel O.P., Whittington R.J., Egerton J.R., Rood J.I.: The type IV fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion, and natural competence. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 4451-4458
- [49] Kim D.Y., Kim K.K.: Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2005; 38: 266-274
- [50] Klenotic P.A., Carlos J.L., Samuelson J.C., Schuenemann T.A., Tschantz W.R., Paetzel M., Strynadka N.C., Dalbey R.E.: The role of the conserved box E residues in the active site of the *Escherichia coli* type I signal peptidase. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 6490-6498
- [51] Kostakioti M., Newman C.L., Thanassi D.G., Stathopoulos C.: Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 4306-4314
- [52] Kostakioti M., Stathopoulos C.: Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 5548-5554
- [53] Kramer R.A., Dekker N., Egmond M.R.: Identification of active site serine and histidine residues in *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *FEBS Lett.*, 2000, 468: 220-224
- [54] Kramer R.A., Zandwijken D., Egmond M.R., Dekker N.: In vitro folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease ompT. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 885-893
- [55] Kulanthaivel P., Kreuzamn A.J., Strega M.A., Belvo M.D., Smitka T.A., Clemens M., Swartling J.R., Minton K.L., Zheng F., Angleton E.L., Mullen D., Jungheim L.N., Klimkowski V.J., Nicas T.I., Thompson R.C., Peng S.B.: Novel lipoglycopeptides as inhibitors of bacterial signal peptidase I. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 36250-36258
- [56] Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A. i wsp.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.*, 2001; 357: 1225-1240
- [57] Lilley G.G., Rifkin M.C., Stewart D.J., Kortt A.A.: Nucleotide and deduced protein sequence of the extracellular, serine basic protease gene (*bprB*) from *Dichelobacter nodosus* strain 305: comparison with the basic protease gene (*bprV*) from virulent strain 198. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1995; 36: 101-111
- [58] Lindsay J.A., Holden M.T.: *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.*, 2004; 12: 378-385
- [59] Lorenzen D.R., Dix F., Wölk U., Tsirpouchtsidis A., Haas G., Meyer T.F.: Immunoglobulin A1 protease, an exoenzyme of pathogenic *Neisseriae*, is a potent inducer of proinflammatory cytokines. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 1049-1058
- [60] Löwer M., Weydig C., Metzler D., Reuter A., Starzinski-Powitz A., Wessler S., Schneider G.: Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. *PLoS One*, 2008; 3: 3510
- [61] Luo Y., Pfuertner R.A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E.A., Chorney M., Kim B., Little J.W., Strynadka N.C.: Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell*, 2001; 106: 585-594
- [62] Maeda H., Yamamoto T.: Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1996; 377: 217-226
- [63] Mellies J.L., Navarro-Garcia F., Okeke I., Frederickson J., Nataro J.P., Kaper J.B.: *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 315-324
- [64] Mertz D., Frei R., Periat N., Zimmerli M., Battegay M., Flückiger U., Widmer A.F.: Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Arch. Intern. Med.*, 2009; 169: 172-178
- [65] Michaelis S., Beckwith J.: Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1982; 36: 435-465
- [66] Milstein C., Brownlee G.G., Harrison T.M., Mathews M.B.: A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat. New Biol.*, 1972; 239: 117-120
- [67] Molla A., Yamamoto T., Akaike T., Miyoshi S., Maeda H.: Activation of Hageman factor and prekallikrein and generation of kinin by various microbial proteinases. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 10589-10594
- [68] Natale P., Brüser T., Driessen A.J.: Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1778: 1735-1756
- [69] Nataro J.P., Deng D.R., Meneval A.L., German A.L., Martin W.C., Levine M.M.: Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2297-2304
- [70] Navarro-Garcia F., Eslava C., Villaseca J.M., Lopez-Revilla R., Czczulim J.R., Srinivas S., Nataro J.P., Cravioto A.: In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 3149-3154
- [71] Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Hejne G.: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*, 1997; 10: 1-6

- [72] Ohnishi Y., Beppu T., Horinouchi S.: Two genes encoding serine protease homologues in *Serratia marcescens* and characterization of their products in *Escherichia coli*. J. Biochem., 1997; 121: 902-913
- [73] Otto B.R., Sijbrandi R., Luirink J., Oudega B., Hedde J.G., Mizutani K., Park S.Y., Tame J.R.: Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 2005; 280: 17339-17345
- [74] Otto M.: *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. Nat. Rev. Microbiol., 2009; 7: 555-567
- [75] Paetzel M., Dalbey R.E., Strynadka N.C.: Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. Nature, 1998; 396: 186-190
- [76] Paetzel M., Karla A., Strynadka N.C., Dalbey R.E.: Signal peptidases. Chem. Rev., 2002; 102: 4549-4580
- [77] Parham N.J., Pollard S.J., Desvaux M., Scott-Tucker A., Liu C., Fivian A., Henderson I.R.: Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 2005; 43: 4076-4082
- [78] Park R.Y., Sun H.Y., Choi M.H., Bai Y.H., Chung Y.Y., Shin S.H.: Proteases of a *Bacillus subtilis* clinical isolate facilitate swarming and siderophore-mediated iron uptake via proteolytic cleavage of transferrin. Biol. Pharm. Bull., 2006; 29: 850-853
- [79] Parreira V.R., Gyles C.L.: A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuulating autotransporter toxin. Infect. Immun., 2003; 71: 5087-5096
- [80] Parro V., Schacht S., Anné J., Mellado R.P.: Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. Microbiology, 1999; 145: 2255-2263
- [81] Paton A.W., Beddoe T., Thorpe C.M., Whisstock J.C., Wilce M.C., Rossjohn J., Talbot U.M., Paton J.C.: AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. Nature, 2006; 443: 548-552
- [82] Peng S.B., Wang L., Moomaw J., Peery R.B., Sun P.M., Johnson R.B., Lu J., Treadway P., Skatrud P.L., Wang Q.M.: Biochemical characterization of signal peptidase I from Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol., 2001; 183: 621-627
- [83] Peng X., Sun J.: Mechanism ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis *Mycobacterium tuberculosis*. Toxicon., 2016; 116: 29-34
- [84] Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., Meyer T.F.: Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature, 1987; 325: 458-462
- [85] Popowicz G.M., Dubin G., Stec-Niemczyk J., Czarny A., Dubin A., Potempa J., Holak T.A.: Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. J. Mol. Biol., 2006; 358: 270-279
- [86] Potempa J., Watorek W., Travis J.: The inactivation of human plasma  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., 1986; 261: 14330-14334
- [87] Pugsley A.P., Francetic O., Hardie K., Possot O.M., Sauvonnet N., Seydel A.: Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria. Folia. Microbiol., 1997; 42: 184-192
- [88] Ravignone M.C., O'Brien R.J.: Tuberculosis. W: Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th., red.: D.L Kasper, E. Braunwald, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, L. Jameson. McGraw-Hill, New York 2005, 953-966
- [89] Reineck K., Renneberg J., Diamant M., Gutschik E., Bendtzen K.: Molecular cloning and expression of a novel *Staphylococcus aureus* antigen. Biochim. Biophys. Acta, 1997; 1350: 128-132
- [90] Rodríguez-Lainz A., Hird D.W., Walker R.L., Read D.H.: Papillomatous digital dermatitis in 458 dairies. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1996; 209: 1464-1467
- [91] Roy F., Vanterpool E., Fletcher H.M.: HtrA in *Porphyromonas gingivalis* can regulate growth and gingipain activity under stressful environmental conditions. Microbiology, 2006; 152: 3391-3398
- [92] Ryan M.H., Petrone D., Nemeth J.F., Barnathan E., Björck L., Jordan R.E.: Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid. Mol. Immunol., 2008; 45: 1837-1846
- [93] Schimana J., Gebhardt K., Höltzel A., Schmid D.G., Süßmuth R., Müller J., Pukall R., Fiedler H.P.: Arylomycins A and B, new biaryl-bridged lipopeptide antibiotics produced by *Streptomyces* sp. Tü 6075. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J. Antibiot., 2002; 55: 565-570
- [94] Siezen R.J., de Vos W.M., Leunissen J.A., Dijkstra B.W.: Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. Protein Eng., 1991; 4: 719-737
- [95] Siezen R.J., Leunissen J.A.: Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. Protein Sci., 1997; 6: 501-523
- [96] Solomonson M., Huesgen P.F., Wasney G.A., Watanabe N., Gruninger R.J., Prehna G., Overall C.M., Strynadka N.C.: Structure of the mycosin-1 protease mycobacterial ESX-1 protein type VII secretion system. J. Biol. Chem., 2013; 288: 17782-17790
- [97] Stanley P., Koronakis V., Hughes C.: Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998; 62: 309-333
- [98] Stec-Niemczyk J., Pustelny K., Kisielewska M., Bista M., Boulware K.T., Stenmicke H.R., Thogersen I.B., Daughtery P.S., Enghild J.J., Baczynski K., Popowicz G.M., Dubin A., Potempa J., Dubin G.: Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. Biochem. J., 2009; 419: 555-564
- [99] Steiner T.S., Lima A.A., Nataro J.P., Guerrant R.L.: Enterococci produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. J. Infect. Dis., 1998; 177: 88-96
- [100] Stephens P., Wall I.B., Wilson M.J., Hill K.E., Davies C.E., Hill C.M., Harding K.G., Thomas D.W.: Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. Br. J. Dermatol., 2003; 148: 456-466
- [101] Sung M., Dalbey R.E.: Identification of potential active-site residues in the *Escherichia coli* leader peptidase. J. Biol. Chem., 1992; 267: 13154-13159
- [102] Supuran C.T., Scozzafava A., Clare B.W.: Bacterial protease inhibitors. Med. Res. Rev., 2002; 22: 329-372
- [103] Tanaka M., Hanioka T., Takaya K., Shizukuishi S.: Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation. J. Periodontol., 1998; 69: 1127-1130
- [104] Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D., Bron S., van Dijk J.M.: Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000; 64: 515-547
- [105] Tjalsma H., van den Dolder J., Meijer W.J., Venema G., Bron S., van Dijk J.M.: The plasmid-encoded signal peptidase SipP can functionally replace the major signal peptidases SipS and SipT of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 1999; 181: 2448-2454
- [106] Travis J., Potempa J.: Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. Biochim. Biophys. Acta, 2000; 1477: 35-50
- [107] Travis J., Potempa J., Maeda H.: Are bacterial proteinases pathogenic factors? Trends Microbiol., 1995; 3: 405-407
- [108] Travis J., Shieh B.H., Potempa J.: The functional role of acute phase plasma proteinase inhibitors. Tokai J. Exp. Clin. Med., 1988; 13: 313-320



- [109] Tuteja R.: Type I signal peptidase: an overview. *Arch. Biochem Biophys.*, 2005; 441: 107-111
- [110] van Klompenburg W., Paetzel M., de Jong J.M., Dalbey R.E., Demel R.A., von Heijne G., de Kruijff B.: Phosphatidylethanolamine mediates insertion of the catalytic domain of leader peptidase in membranes. *FEBS Lett.*, 1998; 431: 75-79
- [111] Vandeputte-Rutten L., Kramer R.A., Kroon J., Dekker N., Egmond M.R., Gros P.: Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.*, 2001; 20: 5033-5039
- [112] Vinothkumar K.R., Pierrat O.A., Large J.M., Freeman M.: Structure of rhomboid protease in complex with  $\beta$ -lactam inhibitors defines the S2' cavity. *Structure*, 2013; 21: 1051-1058
- [113] von Heijne G.: Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, 1983; 133: 17-21
- [114] Vrba A., Kwiatkowska S.: *Mycobacterium tuberculosis* jako przykład patogenu wewnątrzkomórkowego. Wzajemne relacje między mikro- i makroorganizmem. *Pol. Merk Lek.*, 2009; 27: 508-513
- [115] Wang H., Paton J.C., Paton A.W.: Pathologic changes in mice induced by subtilase cytotoxin, a potent new *Escherichia coli* AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum. *J. Infect. Dis.*, 2007; 196: 1093-1101
- [116] Westers H., Westers L., Darmon E., van Dijk J.M., Quax W.J., Zanen G.: The CsrRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *FEBS J.*, 2006; 273: 3816-3827
- [117] Wolfe P.B., Wickner W., Goodman J.M.: Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 12073-12080
- [118] Yu A.Y., Houry W.A.: ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3749-3757
- [119] Yuan L., Rodrigues P., Bélanger M., Dunn W.A. Jr, Progulskie-Fox A.: *Porphyromonas gingivalis* htrA is involved in cellular invasion and in vivo survival. *Microbiology*, 2008; 154: 1161-1169
- [120] Zhang Y.B., Greenberg B., Lacks S.A.: Analysis of a *Streptococcus pneumoniae* gene encoding signal peptidase I and overproduction of the enzyme. *Gene*, 1997; 194: 249-255
- [121] Zwizinski C., Wickner W.: Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 7973-7977

---

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.