

Pracownia Genetyki Bakterii

REGULOWANE ZMIANY STRUKTURALNE I SKŁADANIE LIPOPOLISACHARYDÓW

OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Załącznik 2a

Gracjana Klein-Raina

Obszar wiedzy: Nauki Przyrodnicze

Dziedzina: Nauki Biologiczne

Dyscyplina: Mikrobiologia

Gdańsk 2017

1. Gracjana Klein-Raina**2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

- 1998 doktor nauk biologicznych w zakresie biologii (praca z wyróżnieniem), Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego
rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka odpowiedzi na szok termiczny u bakterii morskiej *Vibrio harveyi*”, promotor: prof. dr hab. Barbara Lipińska
- 1993 magister biologii w zakresie biologii molekularnej (dyplom z wyróżnieniem), Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego
praca magisterska pt. „Identyfikacja homologów niektórych białek szoku termicznego *Escherichia coli* u bakterii morskiej *Vibrio harveyi*”, promotor: prof. dr hab. Barbara Lipińska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2010- Pracownia Genetyki Bakterii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Adiunkt
- 2007-2010 Research Center Borstel, Department of Medical and Biochemical Microbiology, Leibniz Center for Medicine and Biosciences, Borstel, Niemcy, Visiting Professor
- 2007-2008 Institute of Molecular Medicine, Amrita Institute of Medical Science and Research Center, Kochi, Kerala, Indie, Senior Scientist
- 2006-2007 Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Kanada, Visiting Scientist
Max-Planck Institute, Research Unit for Enzymology of Protein Folding, Halle (Saale), Niemcy, Visiting Scientist
- 2005-2006 Department of Biological Chemistry, Yamaguchi University, Japonia, Visiting Scientist
- 2002-2005 Département de Biochimie Médicale, University of Geneva, Szwajcaria, Scientist
- 1998-2001 Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego, Adiunkt
- 1999-2001 Département de Biochimie Médicale, University of Geneva, Szwajcaria, Post-Doc Fellow
- 1996-1998 Katedra Biologii Molekularnej/Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego, Asystent
- 1995 Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, Wielka Brytania, Honorary Visiting Research Fellow
- 1993-1995 Środowiskowe Studium Doktoranckie z Biologii i Oceanologii przy Uniwersytecie Gdańskim

4. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

- a) Osiągnięciem w myśl ww. Ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik 5, objęty tytułem:

Regulowane zmiany strukturalne i składanie lipopolisacharydów

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Klein, G.,** Lindner, B., Brabetz, W., Brade, H. and Raina, S. (2009) *Escherichia coli* K-12 suppressor-free mutants lacking early glycosyltransferases and late acyltransferases: minimal lipopolysaccharide structure and induction of envelope stress response. *Journal of Biological Chemistry* 284: 15369-15389.
IF₂₀₀₉ 5.328, IF_{5 year (2004-2008)} 5.824, MNiSW₂₀₀₉ 24, liczba cytowań: 40
2. **Klein, G.,** Lindner, B., Brade, H. and Raina, S. (2011) Molecular basis of lipopolysaccharide heterogeneity in *Escherichia coli*: envelope stress-responsive regulators control the incorporation of glycoforms with a third 3-deoxy- α -D-manno-oct-2-ulosonic acid and rhamnose. *Journal of Biological Chemistry* 286: 42787-42807.
IF₂₀₁₁ 4.773, IF_{5 year (2006-2010)} 5.513, MNiSW₂₀₁₁ 35, liczba cytowań: 16
3. **Klein, G.,** Müller-Loennies, S., Lindner, B., Kobylak, N., Brade, H. and Raina, S. (2013) Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*: incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. *Journal of Biological Chemistry* 288: 8111-8127.
IF₂₀₁₃ 4.6, IF_{5 year (2008-2012)} 5.12, MNiSW₂₀₁₃ 35, liczba cytowań: 11
4. **Klein, G.,** Kobylak, N., Lindner, B., Stupak, A. and Raina, S. (2014) Assembly of lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the essential LapB heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry* 289: 14829-14853.
IF₂₀₁₄ 4.573, IF_{5 year (2009-2013)} 4.936, MNiSW₂₀₁₄ 35, liczba cytowań: 16
5. **Klein, G.** and Raina, S. (2015) Regulated control of the assembly and diversity of LPS by noncoding sRNAs. *BioMed Research International* 2015: 153561.
IF₂₀₁₅ 2.134, IF_{5 year (2010-2014)} 2.149, MNiSW₂₀₁₄ 20, liczba cytowań: 5
6. **Klein, G.,** Stupak, A., Biernacka, D., Wojtkiewicz, P., Lindner, B. and Raina, S. (2016) Multiple transcriptional factors regulate transcription of the *rpoE* gene in *Escherichia coli* under different growth conditions and when the lipopolysaccharide biosynthesis is defective. *Journal of Biological Chemistry* 291: 22999-23019.
IF₂₀₁₅ 4.258*, IF_{5 year (2010-2014)} 4.403, MNiSW₂₀₁₆ 35, liczba cytowań: 2
*publikacja z roku 2016, brak aktualnego IF, podany z 2015 roku

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Cel naukowy: Identyfikacja czynników wymaganych do składania kluczowego komponentu części pozacytoplazmatycznej komórki LPS oraz regulacja odpowiedzi komórkowej na zaburzenia w części pozacytoplazmatycznej komórki poprzez podjednostki sigma i ich regulatory w tym regulatorowe sRNA.

I. Wprowadzenie

Bakteria *Escherichia coli*, podobnie jak inne organizmy, odpowiada na poziomie molekularnym na różnorodne stropy środowiskowe poprzez przeprogramowanie swojej maszyny transkrypcyjnej. Na przykład, dwie podjednostki sigma polimerazy RNA, RpoH (σ^{32}) i RpoE (σ^E), są kluczowe w wytworzeniu odpowiedzi szoku cieplnego, która rozpoznaje i reaguje na zmiany prowadzące do nieprawidłowego fałdowania białek. Czynniki σ^{32} i σ^E odpowiadają na zjawiska niepoprawnego sfałdowania białek w sposób specyficzny względem przedziału komórkowego. Zgodnie z tym σ^E ulega indukcji na skutek różnorodnych procesów niewłaściwego fałdowania białek w części pozacytoplazmatycznej komórki, jak i znaczących zmian w kompozycji elementów składowych tej części komórki. Ponadto czynnik σ^E reguluje wiele kluczowych procesów, które są wymagane do zachowania

integralności błony zewnętrznej i do biogenezy składników tworzących ją. Obejmuje to kontrolę ekspresji szeregu genów, które uczestniczą w biosyntezie lipopolisacharydu (LPS) lub w jego modyfikacjach. I co ważne, część członków regulonu RpoE bierze udział w transporcie LPS, podczas gdy pozostali regulują ekspresję komponentów błony zewnętrznej albo poprzez promowanie fałdowania białek błony zewnętrznej (OMPs) (kodujące ramię regulonu σ^E tzw. feed-forward) albo przez regulację obniżającą ekspresję OMPs, gdy ich synteza jest niepożądana, z wykorzystaniem RpoE-kontrolowanych niekodujących sRNA (niekodujące ramię regulonu σ^E , powodujące represję).

Część pozacytoplazmatyczna komórek bakterii Gram-ujemnych, do których należy również *E. coli*, posiada dwie, różniące się błony: błonę wewnętrzną (IM) i błonę zewnętrzną (OM). Oddzielone są one peryplazmą, będącą hydrofilowym przedziałem komórkowym, w którym znajduje się warstwa peptydoglikanu. Błona zewnętrzna jest asymetryczną dwuwarstwą lipidową z fosfolipidami tworzącymi wewnętrzną część błony i LPS umieszczonymi w części zewnętrznej. LPS to główny amfifilowy składnik błony zewnętrznej. Pomimo tego, że lipopolisacharydy są wysoce heterogenne pod względem struktury, posiadają one wspólną architekturę, na którą składa się zakotwiczony w membranie lipid A (endotoksyna), oligosacharyd rdzeniowy, dzielący się na rdzeń wewnętrzny i rdzeń zewnętrzny, oraz, u form gładkich bakterii, polisacharyd *O*-swoisty (*O*-antygen). Lipid A tworzą połączone wiązaniem $\beta(1\rightarrow6)$ dwie reszty glukozaminy, które są podstawione resztami kwasów tłuszczowych o różnej długości, a także posiadają grupy fosforanowe. Lipid A i rdzeń wewnętrzny są generalnie zachowawcze ewolucyjnie co do struktury. Posiadają jednak niestechiometryczne podstawienia, które w znaczny sposób kontrolują oporność na kationowe przeciwbakteryjne peptydy, takie jak polimyksyna B, oraz mają istotne znaczenie dla adaptacji do niekorzystnych warunków w gospodarzu i w środowisku.

LPS zapewnia funkcję bariery przepuszczalności błony zewnętrznej i z tego względu jest niezbędny do życia komórek *E. coli*. Niezbędność LPS przejawia się m.in. tym, że wszystkie enzymy, biorące udział w syntezie prekursora LPS Kdo₂-lipid IV_A, są produktami genów koniecznych do życia. Również za translokację LPS i za jego składanie odpowiedzialne są produkty genów niezbędnych do życia. W trakcie identyfikacji 51 niekoniecznych do życia genów, kodujących białka, które są wymagane we wzroście w górnym limicie wysokiej temperatury, stwierdzono, że produkty ośmiu z tych genów biorą udział w biosyntezie rdzenia LPS (Murata *et al.*, 2011). Tym samym odkrycia te podkreślają fizjologiczne znaczenie zrozumienia struktury LPS, jak i jej wpływu na przewodzenie sygnału poprzez czynnik sigma RpoE. W związku z tym główne cele pracy można podsumować jako: (i) Regulacja ekspresji genu *rpoE* i molekularne podstawy odpowiedzi na zaburzenia w biogenezie LPS, które wpływają na aktywność RpoE (Klein *et al.*, 2003, Klein *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2016). (ii) Minimalna struktura LPS umożliwiająca bakteryjny wzrost oraz poszukiwanie czynników regulatorowych, które zapewniają zbalansowaną biosyntezę LPS i sprzęgają syntezę LPS z jego translokacją (Klein *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2014). (iii) Identyfikacja czynników regulatorowych, które kontrolują heterogenność LPS, akumulacja specyficznych form LPS w warunkach stresowych oraz odkrycie nowych modyfikacji, takich jak inkorporacja kwasu glukuronowego (GlcUA) (Klein *et al.*, 2011, Klein *et al.*, 2013). (iv) Pośredniczona przez sRNA kontrola biosyntezy LPS i jego modyfikacji - odkrycie nowych sRNAs, takich jak SlrA i RirA (Klein *et al.*, 2011, Klein *et al.*, 2014, Klein and Raina 2015, Klein *et al.*, 2016, Klein and Raina, 2017).

W prezentowanej rozprawie habilitacyjnej przedstawione są główne wyniki, które doprowadziły do nowych odkryć. I tak w pracy Klein *et al.*, 2009 najważniejsze dokonania to: (i) Pierwsza konstrukcja i charakterystyka szczepów, syntetyzujących minimalną strukturę LPS, która składa się tylko z Kdo₂-lipid IV_A i umożliwia wzrost *E. coli*. (ii) Pierwsza konstrukcja i szczegółowa analiza wolnych od supresorów mutantów pozbawionych białka WaaA [transferaza kwasu 3-deoksy- α -D-manno-okt-2-ulozonowego (Kdo)], które syntetyzują nieglikozylowany lipid IV_A. Praca ta również po raz pierwszy wykazała, że późne acylotransferazy LpxL i LpxM mogą włączać łańcuchy acylowe, odpowiednio laurylowe i mirystylowe, bez wymogu wcześniejszej inkorporacji Kdo w warunkach powolnego wzrostu, kwestionując w ten sposób uprzedni dogmat zależności od Kdo. (iii) Wykazanie, że w szczepach pozbawionych heptozylotransferazy WaaC występuje EptB-zależna inkorporacja fosfoetanolaminy (*P*-EtN) do drugiej reszty Kdo kosztem niewłączenia *P*-EtN do lipidu A, pomimo indukcji systemu dwuskładnikowego BasS/BasR, który pozytywnie reguluje modyfikację lipidu A przez *P*-EtN i 4-amino-4-deoksy-L-arabinozę (L-Ara4N). Podstawą wyjaśnienia powyższego powiązania jest *rpoE*-zależna indukcja transkrypcji genu *eptB* w mutancie $\Delta waaC$. (iv) Jednokopije pozagenowe supresory, które

pozwołyły na wzrost mutantów $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$, syntetyzujących LPS będący Kdo₂-lipid IV_A, oraz mutantów $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$, syntetyzujących tetraacylowany LPS, zidentyfikowały specyficzne jednoaminokwasowe zmiany w białku transporterowym MsbA. Ponieważ nadekspresja genu *msbA* również częściowo przywraca wzrost powyższych mutantów, sugeruje to, że u bakterii syntetyzujących opisaną minimalną strukturą LPS z tetraacylowanym lipidem A występują zaburzenia w transporcie LPS. (v) Pokazano też, iż mutanty $\Delta waaA$ i $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$ mają nieprawidłowości w podziale komórkowym, a także posiadają obniżone poziomy białek FtsZ i PpiD. (vi) Badanie aktywacji szlaków przekazywania sygnałów, które odpowiadają na zjawiska występujące w części pozacytoplazmatycznej komórki pokazało, że mutanty $\Delta waaA$ i $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$ wykazują niespotykane dotąd indukcje odpowiedzi pośredniczonych przez Cpx i RpoE, a molekularne podstawy tych odpowiedzi zostały następnie zanalizowane. (vii) Analiza spektrometrią masową LPS z mutantu $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ doprowadziła do zaskakującego odkrycia, że szczep ten syntetyzuje prawie wyłącznie glikoformy LPS, które posiadają trzecią resztę Kdo i ramnozę (Rha). W tym czasie nie były znane molekularne podstawy zróżnicowanej akumulacji różnych glikoform oraz biochemiczne podstawy inkorporacji trzeciej reszty Kdo i Rha, a tym samym zostały one zbadane bardziej szczegółowo, co opisano w poniżej przedstawionej publikacji.

Biochemiczne i genetyczne podstawy WaaZ-zależnej inkorporacji trzeciej reszty Kdo oraz wprowadzenia Rha przyłączonej albo do drugiej albo do trzeciej reszty Kdo (Klein *et al.*, 2011). (i) Jak wyjaśniono powyżej, w szczepie $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ prawie wyłącznie występują glikoformy, zawierające trzecią resztę Kdo i Rha. Mutant ten posiada też konstytutywną indukcję czynnika sigma RpoE. Z tego powodu został zanalizowany LPS z kilku szczepów, w których dochodzi do regulacji aktywności RpoE. Ponieważ szczepy pozbawione czynnika anty-sigma RseA wykazują maksymalnie indukowany szlak RpoE, to właśnie LPS z mutantu $\Delta rseA$ został szczegółowo zbadany. Interesującym jest to, że LPS ze szczepu $\Delta rseA$ składa się tylko z glikoform z trzecim Kdo i Rha, posiadających charakterystyczne skrócenie w rdzeniu zewnętrznym. (ii) Stąd szczegółowej analizie poddano powyższą dramatyczną zmianę w kompozycji LPS z mutantu $\Delta rseA$ i ogólnie w warunkach indukujących RpoE. Badane zmiany strukturalne LPS zostały przypisane zwiększonej transkrypcji genu *waaZ* i jednoczesnej translacyjnej represji syntezy WaaR przez RpoE-regulowany sRNA RybB. W ten sposób wyjaśniono skrócenie glikoform z trzema resztami Kdo o terminalny disacharyd Hex-Hep oraz po raz pierwszy pokazano rolę sRNA RybB w powstawaniu zmian w rdzeniu LPS. (iii) Następnie zaprezentowano, że w warunkach indukujących RpoE nowe glikoformy z trzema resztami Kdo posiadają Rha na trzeciej reszcie Kdo, a P-EtN, w wyniku aktywacji RpoE-regulowanej transkrypcji genu *eptB*, na drugiej reszcie Kdo (Klein *et al.*, 2011). Niniejsza transkrypcyjna indukcja genu *eptB* przeciwdziała translacyjnej represji EptB przez niekodujący sRNA MgrR. (iv) W ramach opisywanej pracy badania dotyczyły również tego, w jakim stopniu systemy dwuskładnikowe, członkowie regulonu RpoE oraz alarmon ppGpp przyczyniają się do regulacji i przełączeń syntezy różnych glikoform. I tak przełączenie do syntezy glikoformy z trzecim Kdo wymaga ppGpp, ponieważ szczep $\Delta(rseA\ relA\ spoT)$ syntetyzuje tylko typowe glikoformy z dwoma resztami Kdo w przeciwieństwie do szczepu $\Delta rseA$, w którym obecny jest LPS z trzema resztami Kdo.

W celu odkrycia molekularnych podstaw strukturalnej heterogenności LPS, poddano intensywnej analizie różne sieci zależności, pośredniczące w transkrypcyjnej regulacji genów, których produkty biorą udział w tym procesie. Podczas analizy przedstawionych powyżej wyników doświadczeń (Klein *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2011), stwierdzono, że LPS szczepu *E. coli* K-12, wzrastającego w warunkach ubogich w fosforan (warunki indukujące PhoB/R), posiada kilka pików masowych z dodatkowymi 96 jednostkami masowymi. Akumulacji opisywanych pików nie można było wytłumaczyć na podstawie zmian strukturalnych, które są pośredniczone poprzez znane enzymy wymagane w biosyntezie LPS. Tak więc została przeprowadzona analiza genetyczna, biochemiczna i strukturalna celem identyfikacji powyższej specyficznej zmiany, przypisania jej miejsca przyłączenia oraz identyfikacji genu lub genów uczestniczących w tej zmianie. (i) Analiza profili transkrypcyjnych i badanie LPS ze szczepów z mutacjami w różnych systemach dwuskładnikowych ujawniły, że omawiana zmiana masowa wynikała z inkorporacji kwasu heksuronowego z jednoczesnym brakiem reszty fosforanowej. Tak więc u *E. coli* i *Salmonella*, po indukcji systemu dwuskładnikowego PhoB/R w warunkach ubogich w fosforan, zachodzi inkorporacja GlcUA (Klein *et al.*, 2013). (ii) Reszta GlcUA ulega inkorporacji na trzeciej heptozie (HepIII) w rdzeniu wewnętrznym, przy równoczesnej utracie reszty fosforanowej na HepII. Potwierdzeniem tego są wyniki pokazujące, że szczepy $\Delta waaQ$ (pozbawione HepIII) nie posiadają

GlcUA, natomiast mutanty $\Delta waaY$ (brak reszty fosforanowej na HepII) wykazują zwiększoną inkorporację GlcUA (iii) Gen, kodujący powyższą nową glikozylotransferazę, został zidentyfikowany, nazwany *waaH* i scharakteryzowany na poziomie molekularnym. (iv) Ponadto miejsce przyłączenia GlcUA i jego typ wiązania zostały potwierdzone za pomocą analizy NMR. Stwierdzono, że inkorporacja powyższego cukru jest skorelowana z utrzymaniem zbalansowanej obecności wypadkowych ładunków ujemnych w rdzeniu wewnętrznym LPS. (v) Aby odpowiedzieć na pytanie, czy GlcUA ulega inkorporacji także w szczepach *E. coli* o innych rodzajach rdzenia, przeprowadzono analizę LPS, która wykazała, że rzeczywiście, serotypy *E. coli* o rdzeniach typu R1 i R4 posiadają tę modyfikację na skutek indukcji systemów dwuskładnikowych. (vi) W ramach tej samej pracy Klein *et al.*, 2013 zostały przeprowadzone badania nad transkrypcyjną regulacją genu *waaH*, które wykazały, że jest on pozytywnie regulowany przez PhoB/R. Wyniki doświadczeń udowodniły, że transkrypcja genu *waaH* jest niezależna od indukcji BasS/R. Interesujące jest to, że gen *ugd*, który jest wymagany do syntezy GlcUA i L-Ara4N, jest także pozytywnie regulowany przez PhoB/R dodatkowo do regulacji przez BasS/R, tym samym łącząc powyższe dwa szlaki.

W momencie rozpoczęcia badań pytaniem bez odpowiedzi pozostawało to, w jak sposób bakterie, takie jak *E. coli*, zapewniają kontrolę, aby jedynie całkowicie zsyntetyzowany LPS był dostarczany do systemu transportowego LPS w celu zapobieżenia translokacji niekompletnie zsyntetyzowanych prekursorów LPS. Ponadto nie był w pełni poznany mechanizm, zapewniający ścisłą równowagę pomiędzy ilością fosfolipidów i LPS. Z drugiej strony wiadomo, że właśnie zwiększona ilość LPS lub jakiegokolwiek zaburzenia równowagi między syntezą LPS i fosfolipidów są przyczyną obumierania bakterii. (i) W związku z tym zostały wyizolowane i scharakteryzowane mutacje, które nadawały fenotyp warunkowej letalności i nie były mapowane w znanych genach LPS czy w regulatorowych szlakach RpoE (z konstytutywną indukcją RpoE) oraz Cpx. (ii) Mutacje te zidentyfikowały dwa nowe geny szoku termicznego *lapA* i *lapB*. Białko LapB było niezbędne do wzrostu bakterii, a gen *lapB* mógł ulec delecji tylko w obecności supresorów zmapowanych w genach, których produkty są wymagane w biosyntezie fosfolipidów lub LPS. (iii) Zostało zaprezentowane, że w przypadku braku LapB bakterie syntetyzują więcej LPS ze względu na stabilizację enzymu LpxC. Co ciekawe, u mutantów *lapB* zaobserwowano akumulację prekursorów LPS. Dogłębna analiza mutacji supresorowych ujawniła, że przywrócenie równowagi pomiędzy LPS i fosfolipidami (supresory zmapowane w *lpxC* i *fabZ*), zwiększenie ekspresji genu *murA*, zmniejszenie syntezy LPS lub czynniki, które obniżają odpowiedź stresu pozacytoplazmatycznego pozwalają na usunięcie genu *lapB*. (iv) Analiza biochemiczna pokazała, że białka LapA i LapB stanowią część systemu transportowego Lpt i łączą biosyntezę LPS z jego transportem. Tym samym LapA i LapB współuczyszczają się z białkami Lpt, FtsH, heptozylotransferazą WaaC i ko-chaperonami DnaK/DnaJ. (v) Ponieważ w mutancie $\Delta lapB$ większość wczesnych transferaz glikozylowych i enzymów, takich jak LpxM, ulega agregacji lub akumulacji w niepoprawnej konformacji, sugeruje, że LapB może działać jako białko-rusztowanie dla LPS-specyficznych enzymów zapewniając, że tylko całkowicie zsyntetyzowany LPS jest dostarczony do systemu transportowego Lpt (Klein *et al.*, 2014). (vi) Zgodnie z funkcjonowaniem LapA/B jako część systemu Lpt, nieobecność LapB powoduje obniżenie ilości LptD. Mutacja delecyjna $\Delta lapB$ również wykazywała syntetyczny letalny fenotyp z dysfunkcyjnym wariantem genu *lptD* lub gdy brak było SurA, które jest peryplazmatycznym białkiem wymagającym do fałdowania LptD. (vii) Analizy transkrypcyjne ustaliły, że jeden z promotorów operonu (*lapA lapB*) jest indukowany szokiem termicznym i posiada konsensus sekwencji promotorowej rozpoznawanej przez E σ ³². (viii) Podczas przeprowadzania analizy supresorowej mutantu $\Delta(lapA lapB)$, został zidentyfikowany nowy, niekodujący sRNA SlrA. Mapowanie końca 5' *slrA* mRNA ujawniło, że transkrypcja powyższego sRNA jest regulowana przez RpoE, co zostało później dodatkowo potwierdzone na wielu poziomach z wykorzystaniem fuzji promotorowej *slrA-lacZ*. Zademonstrowano, że omawiany 80 nukleotydowy sRNA jest zlokalizowany w nieulegającym translacji regionie 3' (tzw. 3' UTR) genu *cutC* i jest generowany przez dojrzewanie 308 nukleotydowego pierwotnego transkryptu. Nadprodukcja sRNA *slrA* powoduje represję syntezy najliczniejszej lipoproteiny Lpp. Ponieważ Lpp posiada trzy łańcuchy acylowe, obniżenie ilości Lpp może zapewnić pulę fosfolipidów, która w przeciwnym wypadku, przy braku LapB, jest ograniczona. Tak więc tłumaczy to izolację *slrA* jako wielokopijnego supresora delecji *lapB* (Klein *et al.*, 2014, Klein and Raina, 2015). Nadekspresja *slrA* sRNA tłumiała toksycznie podwyższoną indukcję RpoE. To ujemne sprzężenie zwrotne może być ważnym mechanizmem regulacji *rpoE* mRNA na poziomie post-transkrypcyjnym oraz, gdy SlrA jest

w nadmiarze, przyczyniać się do pominięcia konieczności obecności LapB. (ix) Dodatkowo została przeprowadzona kolejna analiza mutacyjna celem identyfikacji reszt aminokwasowych kluczowych dla funkcji LapB. LapB posiada powtórzenia tetratrikopeptydowe (TPR) oraz C-końcową rubredoksynopodobną domenę. Mutacje typu utraty funkcji zademonstrowały, że powtórzenia TPR oraz domena rubredoksynopodobna są niezbędne do funkcjonowania LapB. Badania nad LapA- i LapB-zależnym składaniem LPS, nad rolą specyficznych niekodujących RNA oraz nad sposobem, w jaki RpoE odpowiada na strukturalne defekty LPS są prowadzone w ramach dalszych prac nad powyższymi zagadnieniami i wynikającymi z nich kolejnymi pytaniami.

Jako kontynuacja badań nad RpoE-regulowaną odpowiedzią na stres pozacytoplazmatyczny, biosyntezą LPS i jego regulowanymi modyfikacjami zostały podjęte kolejne ważne wyzwania, mające na celu szczegółowe zbadanie transkrypcyjnej regulacji genu *rpoE* (Klein *et al.*, 2016). Jak przedstawiono na podstawie wyżej opisanych wyników, zaburzenia w biogenezie LPS indukują transkrypcję genu *rpoE*. Jednakże mechanizm transkrypcyjnej aktywacji na skutek zaburzeń w LPS pozostawał nieznany. Dotychczas wiadomo było, że transkrypcja genu *rpoE* jest po części pozytywnie autoregulowana przez $E\sigma^E$ z jednego z promotorów w odpowiedzi na zaburzenia w równowadze w OMP. Natomiast pozostawało nieznanym, jak regulowany jest dystalny region promotorowy. Po ponownym zbadaniu, przy wykorzystaniu metod genetycznych i biochemicznych, transkrypcyjnych miejsc startu zostało wykazane istnienie pięciu nowych promotorów (P1-P5) zlokalizowanych dystalnie do $E\sigma^E$ -regulowanego promotora. Spośród nich transkrypcja zapoczątkowywana z promotora P2 i P3 korzysta z tego samego miejsca inicjacji, lecz jest regulowana odpowiednio przez podjednostkę sigma RpoN i RpoD. Okazało się, że RpoN-regulowany promotor P2 używa QseF jako AAA aktywatora, natomiast RpoD-regulowany promotor P3 jest poddawany podwójnej pozytywnej regulacji: przez system dwuskładnikowy Rcs i przez CRP-cAMP. Co jest interesujące, zaburzenia w biogenezie LPS indukują RpoD-regulowany promotor P3 w sposób Rcs-zależny. Natomiast promotor P4 jest regulowany przez RpoS, a jego aktywność modulują czynniki, kontrolujące ilość/aktywność RpoS. Ponadto podczas określania czynników, które indukują transkrypcję genu *rpoE*, został zidentyfikowany nowy sRNA RirA. Mapowanie końca 5' *rirA* mRNA pokazało, że sRNA jest zlokalizowany w 5' UTR *waaQ* mRNA i jest wytwarzany przez dojrzewanie powyższego długiego mRNA. Dodatkowe badania wykazały, że nadekspresja *rirA* sRNA prowadzi specyficznie do aktywacji promotora *rpoEP3* na skutek zmniejszenia ilości LPS. Opisany efekt aktywacji wyjaśnia wiązanie się RirA do czynnika transkrypcyjnego RfaH, będącego supresorem terminacji transkrypcji i działającego poprzez wzmocnienie translacji LPS-specyficznych operonów, takich jak *waaQ* (biosynteza rdzenia LPS) i *rfb* (biosynteza O-antygeny). Tak więc RirA może działać poprzez sekwestrację RfaH. Model miareczkowania RfaH przez RirA został poparty obserwacją, że *in vitro* wiązanie RirA do RfaH wymaga miejsc *ops*. Zaprezentowano, że zaburzenia w biogenezie LPS indukują transkrypcję genu *rpoE* poprzez specyficzną aktywację promotora *rpoEP3* i system dwuskładnikowy Rcs. Dodatkowo po raz pierwszy wyjaśniono regulatorową rolę RpoN w połączeniu z systemem Qse w regulacji ekspresji *rpoE*. Obecnie trwają dalsze badania, mające na celu odpowiedzenie na pytanie czy wiązanie RirA sRNA do RfaH powoduje zmianę konformacji, która sprawia, że RfaH jest w stanie przypominającym białko NusG i traci specyficzność względem operonów, posiadających miejsce pauzowania *ops*.

II. Wolne od supresorów mutanty *Escherichia coli* pozbawione wczesnych glikozylotransferaz i późnych acylotransferaz: minimalna struktura lipopolisacharydu oraz indukcja odpowiedzi na stres w peryplazmie i błonie zewnętrznej

Wprowadzenie

Uprzednio sądzono, że Kdo₂-lipid A_{hexa} stanowi minimalną strukturę LPS, która jest wymagana do rozwoju *E. coli* w temperaturze 37°C w pożywce szybkiego wzrostu (Raetz and Whitfield, 2002, Gronow *et al.*, 2010, Missiakas *et al.*, 1996). Taką właśnie strukturę LPS posiadają szczepy $\Delta waaC$ i $\Delta gmhD$, które są żywotne w powyższych warunkach. Jednakże mutanty te wykazują fenotyp temperaturowrażliwości wzrostu powyżej 42°C, znaczące zaburzenia w przepuszczalności błony zewnętrznej oraz konstytutywną, regulowaną przez RpoE indukcję odpowiedzi na stres w peryplazmie i błonie zewnętrznej (Raina and Georgopoulos, 1991). Również wiadomym było, że enzym WaaA, będący transferazą Kdo, jest niezbędny do wzrostu bakterii, a wszystkie znane struktury LPS w rdzeniu

wewnętrzny posiadają jedną lub dwie reszty Kdo przyłączone do lipidu A (Raetz and Whitfield, 2002, Gronow *et al.*, 2010). Ponadto kluczowy dla wczesnych etapów biosyntezy LPS był dogmat, że inkorporacja Kdo do lipidu IV_A jest wymagana przed dołączeniem reszt acylowych późnych kwasów tłuszczowych. Dzięki dodaniu powyższych łańcuchów powstaje heksaacylowany lipid A, do którego następnie przyłączane są kolejno pozostałe reszty cukrowe. Zadaliśmy sobie pytanie, czy bakteria *E. coli* może być żywotna, gdy struktura LPS będzie jeszcze bardziej zredukowana. Aby odpowiedzieć na to pytanie przeprowadziliśmy intensywne badania genetyczne i biochemiczne, w ramach których skonstruowaliśmy szczepy, mające jeszcze bardziej, niż dotychczas opisane przykłady, strukturalnie zmniejszoną makrocząsteczkę LPS. Otrzymane szczepy to albo pochodne mutantów $\Delta waaC$ syntetyzujące tylko tetraacylowany lipid A albo mutanty pozbawione genu *waaA*. Skonstruowane szczepy były wolne od pozagenowych supresorów i zostały uzyskane w ściśle zdefiniowanych warunkach powolnego wzrostu. Tym samym poprzez systematyczną rekombinację genetyczną zostały skonstruowane wolne od supresorów szczepy $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ i $\Delta waaA$. Następnie zweryfikowano je pod kątem posiadania przewidywanej struktury LPS, zbadano właściwości wzrostu powyższych szczepów oraz wpływ nieobecności wymienionych genów na indukcję odpowiedzi na stres w peryplazmie i błonie zewnętrznej.

Konstrukcja chromosomalnych delecji genów *lpxL*, *lpxM*, *lpxP*, *waaC* oraz ich kombinacji, mających wpływ na wzrost i właściwości morfologiczne komórek - Grupa szczepów, pozbawionych genu *waaC* oraz genów kodujących późne acylotransferazy, została skonstruowana na pożywce minimalnej w temperaturze 30°C i 23°C poprzez systematyczne transdukcje w obecności lub przy braku plazmidu kodującego dziki typ genu, który był poddany delecji na chromosomie. Szczep $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ mógł być skonstruowany w temperaturze 30°C lub 23°C w obecności plazmidu, z którego zachodziła ekspresja dzikiego typu genu *waaC* albo *lpxL*. Jednakże bez komplementującego plazmidu szczep $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ mógł być skonstruowany tylko w 23°C, ale nie w temperaturze powyżej niej. Zdolność tworzenia kolonii przez szczep $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$, jak również wzrost w pożywce płynnej, były ściśle ograniczone do warunków powolnego wzrostu i wąskiego zakresu temperatur charakterystycznych również dla wolnego wzrostu. Analiza morfologii komórek mutantu $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ wykazała, że szczep ten tworzy krótkie filamenty od dwóch do trzech razy dłuższe niż prawidłowo ukształtowane komórki izogenicznego szczepu typu dzikiego. Zaobserwowane filamenty komórkowe to rezultat zaburzeń w podziale komórki szczepu $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$. Zaburzenia te są spowodowane zmniejszeniem ilości kluczowego białka podziału komórkowego FtsZ, co potwierdzają zredukowane poziomy tego białka zaobserwowane metodą Western blotting.

Nadekspresja genu *msbA* lub określone mutacje w genie *msbA* mogą spowodować polepszenie wzrostu mutantów Kdo₂-lipid IV_A - Ponieważ wiadomym było, że nadprodukcja transportera MsbA może przywrócić wzrost mutantów $\Delta lpxL$ poprzez zwiększenie transportu lipidu A, badaliśmy czy podobna supresja ma miejsce w stosunku do szczepów syntetyzujących różne pochodne lipidu IV_A. I tak w niniejszej pracy zostało pokazane, że nadekspresja genu *msbA* może umożliwić wzrost szczepu $\Delta(lpxL lpxM lpxP)$ w warunkach szybkiego wzrostu. Ponadto łagodna nadekspresja genu *msbA* w szczepie $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ pozwalała na wzrost tego mutantu bakteryjnego w temperaturze 30°C na bogatej pożywce. Co więcej, stosując podobne warunki ekspresji genu *msbA*, wyizolowano mutacje supresorowe, które umożliwiały wzrost szczepu $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ w temperaturze 37°C na bogatej pożywce. Trzy mutacje supresorowe zostały zidentyfikowane w sekwencji kodującej genu *msbA*. Powodowały one zmianę w resztach aminokwasowych: Leu-279Val, Asp-498Val i Ala-510Pro. Co ciekawe, reszty aminokwasowe Asp-498 i Ala-510, w których wystąpiły mutacje, są zlokalizowane w sąsiedztwie motywu wiążącego ATP. Spośród mutacji supresorowych to mutacja chromosomalna *msbA*-498Val umożliwiała tworzenie kolonii bakteryjnych nawet w temperaturze 37°C na pożywce LA i na pożywce minimalnej. W oparciu o powyższe wyniki stwierdzono, że mutacja *msbA*-498Val w kopii chromosomalnej może powodować supresję szczepu $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$. Ponieważ nadekspresja genu *msbA* prowadziła do supresji $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$ wskazuje to, że szczepy z Kdo₂-lipid IV_A posiadają zaburzoną translokację LPS.

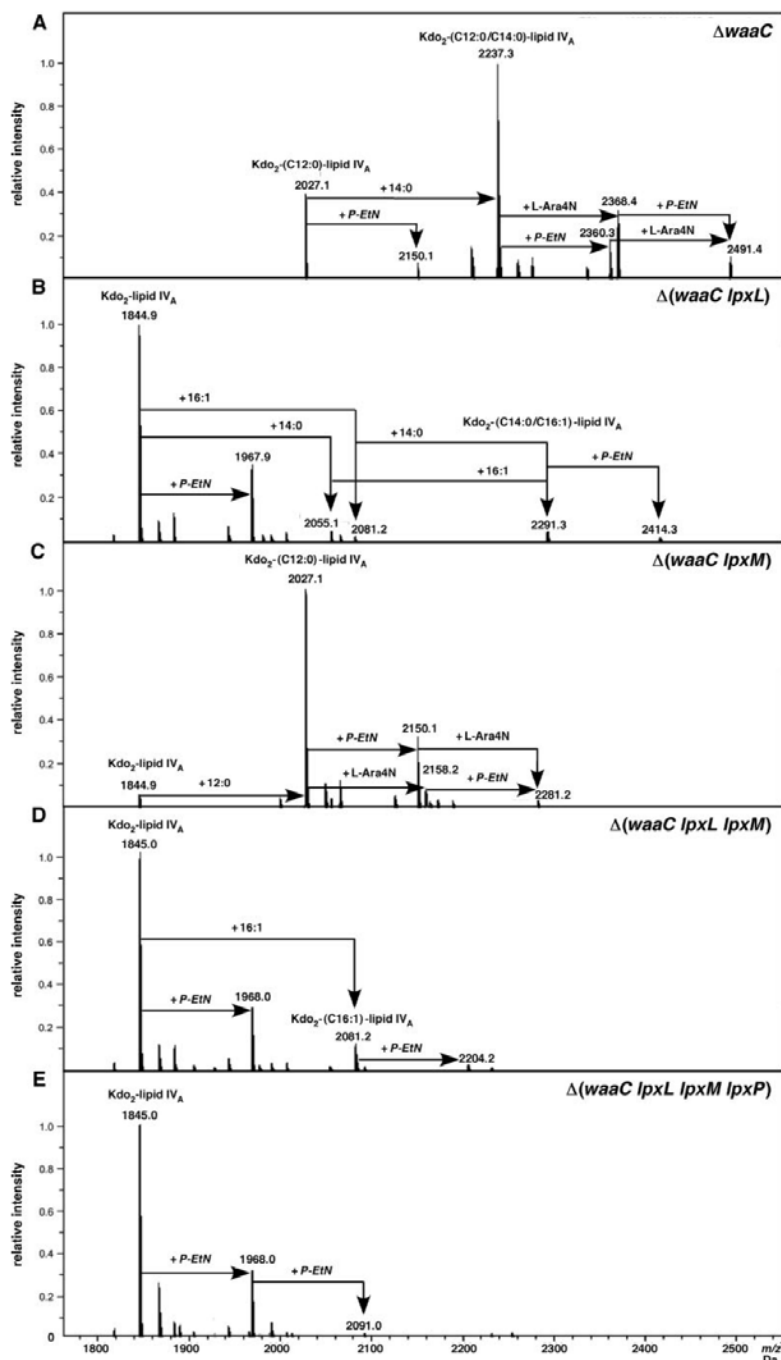
Gen *waaA* nie jest niezbędny w temperaturze poniżej 30°C - Ponieważ wolny od supresorów szczep $\Delta(waaC lpxL lpxM lpxP)$, który syntetyzuje LPS składający się z Kdo₂-lipid IV_A, mógł być skonstruowany tylko w warunkach powolnego wzrostu, wykorzystaliśmy te same warunki do konstrukcji

szczepu z delecją genu *waaA*. Zostało pokazane, że otrzymane delecyjne mutanty *waaA* były wolne od supresorów, ponieważ delecja ta mogła ulec transdukcji w temperaturze 21-23°C na pożywce minimalnej w obecności, jak również przy braku, plazmidu niosącego gen *waaA*. Zaprezentowano, że szczepy $\Delta waaA$ nie posiadały ani mutacji w genie *msbA* ani w genie *yhjD*. Nieobecność Kdo potwierdzono przy użyciu metody „TLC immune-overlay” z wykorzystaniem specyficznych dla Kdo przeciwciał monoklonalnych A20. Jednocześnie, za pomocą analizy metodą spektrometrii masowej wykazano, że w skonstruowanym szczepie występują tylko wolne od glikozylacji pochodne lipidu IV_A. Komórki mutanta $\Delta waaA$ charakteryzowały się także zmienioną morfologią, która objawiała się filamentacją komórek, spowodowaną obniżeniem ilości białka FtsZ. Tak więc w niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano, że w warunkach powolnego wzrostu i w niskiej temperaturze gen *waaA* nie jest niezbędny do

żywołności *E. coli*, chociaż szczepy z delecją *waaA* charakteryzowały się słabym wzrostem.

Strukturalna analiza LPS w warunkach wzrostu modyfikujących lub niemodyfikujących LPS

- LPS został wyekstrahowany ze szczepu dzikiego oraz z jego izogenicznych delecyjnych pochodnych hodowanych w temperaturze 30°C bądź 23°C w bogatej w fosforany pożywce minimalnej M9 lub w ubogiej w fosforany pożywce minimalnej 121. Ostatnia wymieniona pożywka charakteryzuje się występowaniem submilimolowych ilości jonów Zn²⁺ i Fe³⁺. Zastosowanie pożywki 121 umożliwiło nam ujawnienie inkorporacji niestechiometrycznych modyfikacji, które są nieobecne w LPS komórek bakteryjnych, wzrastających w pożywce bogatej w fosforany. Niektóre z modyfikacji LPS zachodzą po peryplazmatycznej stronie błony wewnętrznej, a tym samym odzwierciedlają możliwość i skuteczność translokacji LPS. Jest to ważna zależność, ponieważ tetraacylowany lipid A jest znany jako nieefektywny substrat transportera MsbA. Wykorzystując jednokopijne fuzje promotorowe genów *eptB*, *arnB* i *ugd* regulowanych przez BasS/R, po raz pierwszy dowiedliśmy, że wzrost szczepu typu dzikiego w pożywce 121 aktywuje system dwuskładnikowy BasS/R. Aktywacja ta była wynikiem synergistycznej indukcji spowodowanej ograniczoną ilością fosforanu oraz jednoczesną obecnością jonów Zn²⁺ i Fe³⁺. Ponadto pożywka ta umożliwia wzrost mutantów $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM)$



Rys. 1. Widma masowe LPS z mutanta *waaC* oraz jego pochodnych, wzrastających w warunkach modyfikujących LPS w pożywce 121.

lpxP) i $\Delta waaA$. Zgodnie w powyższych wynikach lipid A z LPS otrzymanego z bakterii hodowanych w pożywce minimalnej 121, oprócz obecności heksaacylowanych, 1,4'-bifosforylowanych komponentów (1796,2 Da), posiadał również komponenty z podstawieniami przez *P*-EtN, przez L-Ara4N oraz z oboma podstawieniami. W przeciwieństwie do tego lipid A z LPS wyekstrahowanego ze szczepu typu dzikiego, wzrastającego w pożywce bogatej w fosforany, nie wykazywał żadnych modyfikacji przez *P*-EtN lub przez L-Ara4N.

Spektrometria masowa LPS wyizolowanego z mutantu $\Delta waaC$ oraz z jego izogenicznych pochodnych pozbawionych późnych acylotransferaz - Analiza kompozycji LPS ze szczepu $\Delta waaC$ wzrastającego w pożywce M9 bogatej w fosforan (warunki niemodyfikujące LPS), jak i w pożywce 121 ubogiej w fosforan (warunki modyfikujące LPS) pokazała obecność wspólnego pików o masie 2237,3 Da, obrazującego 1,4'-bifosforylowany Kdo₂-lipid A_{hexa} (Rys. 1). Ponadto LPS z powyższego szczepu hodowanego w pożywce 121 posiadał także pików masowe odpowiadające inkorporacji L-Ara4N, jak również dodaniu L-Ara4N i *P*-EtN (Rys. 1A). Były także obecne Kdo₂-lipid A_{hexa} oraz Kdo₂-lipid A_{penta} modyfikowane wyłącznie przez *P*-EtN (Rys. 1A). Interesującym jest występowanie modyfikacji pentaacylowanego lipidu A ze szczepów delecyjnych *waaC*, *lpxM* i *lpxL*, gdyż według wcześniejszych informacji LPS tych mutantów nie był modyfikowany przez L-Ara4N (Tran *et al.*, 2005). LPS uzyskany z mutantu $\Delta(waaC\ lpxL)$, hodowanego w pożywce M9, jak i w 121, posiadał wspólny pik masowy charakterystyczny dla Kdo₂-lipidu IV_A. Zgodnie ze znanym podstawieniem palmitynianu (*cis* Δ^9 C16:1) w tą samą pozycję, w której brakuje laurynianu (C12:0), w mutantach $\Delta lpxL$ wzrastających w temperaturze 30°C lub poniżej niej zaobserwowano komponent o masie 2291,3 Da, który odpowiada heksaacylowanemu LPS reprezentującemu Kdo₂-lipid IV_A+C16:1+C14:0. Omawiany heksaacylowany komponent w ogóle nie występował w mutancie $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$, co potwierdza autentyczność powyższego skonstruowanego czterodelecyjnego szczepu. Szczep $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$ nie został opisany aż do niniejszej publikacji. LPS z mutantu $\Delta(waaC\ lpxL)$, rosnącego w pożywce 121, również posiadał Kdo₂-lipid IV_A zawierający dodatkowy albo mirystynian albo palmitynian. Co ciekawe, w LPS ze szczepu $\Delta(waaC\ lpxL)$ została zaobserwowana modyfikacja przez *P*-EtN zarówno formy Kdo₂-lipid IV_A, jak i formy Kdo₂-lipid IV_A+C16:1+C14:0 (Rys. 1B). Tak więc powyższe formy strukturalne są dostępne jako substraty do modyfikacji przez *P*-EtN. LPS z mutantu $\Delta(waaC\ lpxM)$, wzrastającego albo w pożywce M9 albo w 121, wykazywał wspólny pik o masie 2027,1 Da, który odpowiada oczekiwanej strukturze Kdo₂-reszta kwasu laurynowego-lipid IV_A. Podczas analizy LPS z powyższego szczepu hodowanego w pożywce 121 zaobserwowano również pochodne Kdo₂-reszta kwasu laurynowego-lipid IV_A z *P*-EtN i L-Ara4N. LPS wyekstrahowany z mutantu $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM)$ potwierdził indukcję i inkorporację reszty nienasyconego kwasu palmitynooleinowego na skutek aktywności transferazy palmitynianowej LpxP, co przejawiało się obecnością zarówno Kdo₂-lipid IV_A, jak i Kdo₂-reszta nienasyconego kwasu palmitynooleinowego-lipid IV_A (Rys. 1D). Ponadto obie wspomniane formy strukturalne LPS mogą być modyfikowane przez pojedyncze reszty *P*-EtN, co jest potwierdzone przez obecność odpowiednich pików (Rys. 1D).

Autentyczność wolnego od supresorów szczepu $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$ została dowiedziona poprzez obecność wyłącznie tetraacylowanej formy z Kdo₂-lipid IV_A i jednoczesny brak jakichkolwiek heksa- lub pentaacylowanych pochodnych. Co ciekawe, LPS ze szczepu $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$ także posiadał modyfikację przez jedną, jak i również przez dwie reszty *P*-EtN (Rys. 1E). Dołączenie dwóch reszt *P*-EtN nastąpiło na skutek silniejszej indukcji RpoE-regulowanego genu *eptB*, zgodnie z aktywacją transkrypcyjną regulonu *rpoE* w powyższym mutancie. Następstwem opublikowania powyższych wyników było pokazanie, że *eptB* mRNA jest post-transkrypcyjnie hamowane przez PhoP/Q-regulowane MgrR sRNA (Moon and Gottesman, 2009). Z powodu obecności 2 mM CaCl₂ w pożywce, system PhoP/Q prawdopodobnie ulega represji, co prowadzi do braku indukcji MgrR sRNA, a tym samym umożliwia syntezę i translację *eptB* mRNA. Zatem hamowanie systemu PhoP/Q i jednoczesna indukcja RpoE powodują zwiększenie EptB-zależnej inkorporacji *P*-EtN na drugim Kdo. Przedmiotem szczególnego zainteresowania są wyniki pokazujące brak inkorporacji L-Ara4N w LPS mutantów $\Delta(waaC\ lpxL)$ i $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$, przy jednoczesnej obecności pochodnych modyfikowanych przez *P*-EtN. Ponieważ modyfikacja przez L-Ara4N następuje po pośredniczym przez MsbA przeniesieniu LPS na peryplazmatyczną stronę błony wewnętrznej, powyższe wyniki pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków: (i) brak możliwości modyfikacji lipidu A przez L-Ara4N stanowi bardziej wyrazisty wskaźnik zaburzeń w translokacji LPS niż brak inkorporacji *P*-EtN, (ii) LPS ze

masowe LPS ze szczepu $\Delta waaA$, wzrastającego w temperaturze 30°C w pożywce LB, wykazało obecność pików odpowiadającego strukturze tetraacylowanego 1,4'- bifosforylowanego prekursora lipid IV_A , bez jakichkolwiek penta- lub heksaacylowanych pochodnych. Jednak analiza LPS uzyskanego z mutantu $\Delta waaA$, hodowanego w temperaturze 21°C, wykazała bardziej złożoną kompozycję wolnego lipidu A: oprócz pików odpowiadających lipidowi IV_A , pomimo braku Kdo były też obecne piki przypisane pochodnym penta- i heksaacylowanym. Zostały zidentyfikowane cztery różne piki, odpowiadające syntezie odrębnych pentaacylowanych pochodnych lipidu IV_A . Spośród nich dwa piki obrazują dodanie palmitolenu i palmitoylu do prekursora lipid IV_A . Pozostałe dwa piki reprezentują charakterystyczną inkorporację drugorzędowych reszt laurynianu i mirystanu do łańcuchów (R)-3-hydroksymirystynowych zlokalizowanych odpowiednio w pozycjach 2' i 3' dystalnej glukozaminy (Rys. 2B). Ponadto prekursor lipid IV_A był również modyfikowany przez P-EtN, gdy szczep $\Delta waaA$ hodowano w temperaturze 21°C w pożywce 121. Odnośnie heksaacylowania, zaobserwowano piki masowe o przewidywanej kompozycji lipid $IV_A+C16:1+C14:0$ odzwierciedlające inkorporację drugorzędowego kwasu palmitynowego i kwasu mirystynowego do prekursora lipid IV_A . Niezależna od Kdo inkorporacja niektórych drugorzędowych grup laurynowych, w wyniku stosowania podłoża minimalnego i temperatury 21°C, powodowała także syntezę typowego heksaacylowanego lipidu A (pik m/z 1796,1 Da) o przewidywanej kompozycji lipid $IV_A+C16:1+C14:0$ na skutek kolejnego dodania acylowego łańcucha kwasu mirystynowego (Rys. 2D). Tak więc w pracy tej po raz pierwszy zostało pokazane, że *in vivo* w niskiej temperaturze w warunkach powolnego wzrostu lipid IV_A może być wykorzystywany jako substrat dla późnych acylotransferaz bez wymogu uprzedniej inkorporacji Kdo. Także interesująca była LpxP-zależna inkorporacja reszty kwasu palmitynowego C16:1, którego synteza i dołączenie jest preferowane w niskich temperaturach. Inkorporację tą przypisano znaczącemu wzrostowi aktywności RpoE w mutancie $\Delta waaA$, która w konsekwencji prowadziła do podwyższonej, RpoE-zależnej transkrypcji genu *lpxP*.

Obecność LPS z tetraacylowanym lipidem A prowadzi do zmian w kompozycji rdzenia glikoformy - Poprzednie doświadczenia wykazały, że szczep typu dzikiego *E. coli* K-12 posiada kilka glikoform rdzenia oligosacharydowego. Spośród nich jedna z pomniejszych form miała trzy reszty Kdo z jednoczesnym skróceniem rdzenia zewnętrznego o końcowy disacharyd Glc-Hep. Co ciekawe, analiza LPS z mutantu $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ hodowanego w pożywce 121 wykazała, że posiadał on głównie pochodne glikoformy, mającej trzy reszty Kdo, Rha i nawet do czterech reszt P-EtN. Natomiast nie zaobserwowano żadnych pochodnych wskazujących na inkorporację L-Ara4N. Na tym etapie nie były jeszcze poznane genetyczne i molekularne podstawy inkorporacji trzeciego Kdo oraz towarzyszące temu skrócenie rdzenia zewnętrznego, a tym samym zagadnienia te były tematem badań, których wyniki przedstawiono bardziej szczegółowo w Klein *et al.*, 2011.

Ponieważ w niniejszej pracy wykazano, że nadekspresja genu *msbA* prowadzi do supresji syntetycznej letalności $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$, został zanalizowany LPS z wymienionego szczepu z supresją. I rzeczywiście zaobserwowano, że nadekspresja genu *msbA* przywracała syntezę najliczniej występującej glikoformy z dwoma resztami Kdo i doprowadzała do inkorporacji L-Ara4N. Przywrócenie syntezy glikoformy z dwoma resztami Kdo i kompletnym rdzeniem poprzez nadekspresję genu *msbA* w mutancie $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ tłumaczy supresję innych defektów wzrostu u wymienionego mutantu. Ponieważ MsbA przyspieszało transport LPS, również zaobserwowano niektóre prekursorzy LPS. Takie nagromadzenie prekursorów LPS mogło również pojawić się na skutek zmian w niektórych aspektach regulacji czynników składania LPS, co zostało wyjaśnione w Klein *et al.*, 2014.

Synergistyczna indukcja szlaków pozacytoplazmatycznej transdukcji sygnałów CpxR/A i RpoE w szczepach $\Delta waaA$ i $\Delta waaC$ oraz w ich pochodnych, syntetyzujących minimalną strukturę LPS - Fizjologiczne znaczenie syntezy minimalnej struktury LPS, składającej się tylko z pochodnych lipidu IV_A , jak również znaczenie LPS złożonego z Kdo₂-LA_{hexa}, Kdo₂-LA_{penta}, Kdo₂-lipid IV_A , zostało ustalone poprzez śledzenie efektów, które są wywierane przez powyższe formy LPS, na szlaki odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej. Szlaki te są pod kontrolą czynnika sigma RpoE, będącego podjednostką polimerazy RNA, i systemu dwuskładnikowego CpxR/A, a ich zadaniem jest monitorowanie zrównoważonego składu peryplazmy i błony zewnętrznej. Wpływ struktur LPS został mierzony z wykorzystaniem fuzji promotorowych *rpoHP3-lacZ* i *cpxP-lacZ*, odzwierciedlających aktywność specyficzną dla dwóch powyższych szlaków. Szczepy $\Delta waaC$ i $\Delta(waaC\ lpxL)$ wykazywały

konstytutywną, odpowiednio ponad 3- i 4-krotną, indukcję szlaku RpoE. Analogicznie maksymalny wzrost aktywności promotora *cpxP*, podobnie jak w przypadku RpoE-zależnego promotora, został zaobserwowany w kombinacji mutacyjnej $\Delta(waaC\ lpxL)$. Indukcję szlaków RpoE i Cpx potwierdzono ponadto poprzez analizę Western blotting dwóch białek indykatorowych (HtrA i RseB) dla dwóch wspomnianych szlaków przekazywania sygnału. Poziomy obu tych białek były podwyższone, co odpowiadało transkrypcyjnej indukcji systemów RpoE i Cpx w poszczególnych szczepach. Zwiększenie ilości HtrA było bardziej widoczne niż RseB, ponieważ transkrypcja genu *htrA* jest pozytywnie regulowana przez oba systemy: RpoE i Cpx, co prowadzi do addytywnego efektu. Analiza odpowiedzi przewodzenia sygnału w szczepie $\Delta waaA$ ujawniła aż 6-krotną indukcję szlaku RpoE i 8-krotną indukcję szlaku Cpx. A zatem podsumowując, powyższe wyniki sugerują, że zaburzenia w biogenezie LPS powodują wyraźną indukcję szlaków RpoE i Cpx w odpowiedzi na syntezę minimalnej struktury LPS. Molekularne podstawy tych zagadnień szczegółowo zbadano i opisano w pracy Klein *et al.*, 2016.

Wymaganie białka SurA dla żywotności mutantów $\Delta waaC$ - Ponieważ mutant $\Delta waaC$ wykazywał konstytutywną indukcję RpoE-zależnej odpowiedzi stresowej nawet w warunkach permissywnego wzrostu, sugeruje to, że niektóre czynniki komórkowe, które kontrolują syntezę białek błony zewnętrznej, mogą być limitowane, jako że RpoE odpowiada i kontroluje powyższe procesy. Zatem delecyjne pochodne kilku czynników syntezy białek błony zewnętrznej, takie jak *htrA*, *surA*, *fkpA*, *ppiD*, *yfgL* (*bamB*), sRNA *rybB*, *hfq* były badane w mutancie $\Delta waaC$. Spośród nich letalna okazała się być kombinacja $\Delta(waaC\ surA)$. Szczep taki może być skonstruowany jedynie wtedy, gdy gen *surA* lub *waaC* był obecny w dodatkowej ilości kopii na plazmidzie. Wskazuje to na nieodzowne wymaganie białka SurA w mutancie $\Delta waaC$. SurA jest peryplazmatyczną izomerazą *cis/trans* peptydylo-prolilową, konieczną w fałdowaniu białek błony zewnętrznej, w tym transportera LPS LptD. Ponieważ funkcja SurA częściowo pokrywa się z funkcją innego czynnika fałdującego białka błony zewnętrznej PpiD, został zbadany poziom białka PpiD w mutancie $\Delta waaC$. Co interesujące, poziom PpiD był znacząco zredukowany w różnych pochodnych $\Delta waaC$. Stopień redukcji korelował z zaburzeniami wzrostu i poziomem indukcji RpoE. I tak najbardziej znaczące zmniejszenie ilości PpiD było obserwowane w szczepach syntetyzujących LPS, będący Kdo₂-lipid IV_A.

Podsumowanie, wnioski i znaczenie otrzymanych wyników opisanych w pracy Klein *et al.*, 2009 - Do chwili opublikowania wyników w powyższej pracy uważano, że minimalną strukturą LPS, w warunkach wolnych od supresorów, był Re LPS złożony z Kdo₂-LA_{hexa}. W niniejszej pracy systematyczne usuwanie genów, kodujących późne acylotransferazy, oraz kombinacja tych delecji z mutacją $\Delta waaC$ w warunkach powolnego wzrostu, doprowadziły do konstrukcji szczepu $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$. Szczep ten wykazywał wąski przedział wzrostu w pożywce minimalnej, a także syntetyzował LPS złożony z Kdo₂-lipid IV_A. Również gen *waaA*, kodujący transferazę Kdo, może być usunięty w warunkach wolnego wzrostu bez wymogu dodatkowych kopii *MsbA*. Pokazano, że mutant $\Delta waaA$ syntetyzuje lipid IV_A, który może być modyfikowany przez *P*-EtN, a także za pomocą PagP-zależnej modyfikacji, która skutkuje inkorporacją łańcucha kwasu palmitylowego C16:0. Ponieważ ostatnia wymieniona modyfikacja przez PagP zachodzi w błonie zewnętrznej, dowodzi to, że pochodne lipidu IV_A na poziomie podstawowym ulegają transportowi z cytoplazmy do błony zewnętrznej. Jednakże ani Kdo₂-lipid IV_A ani sam lipid IV_A nie był modyfikowany przez L-Ara4N. Co istotne, wykazano, że *in vivo*, bez obecności Kdo, lipid IV_A może służyć jako akceptor do inkorporacji LpxP-zależnego kwasu palmitynowego, a następnie poprzez dodanie łańcucha myristynowego powstaje heksaacylowany lipid A. Ponadto zostały również zidentyfikowane warianty lipidu A z obecnym łańcuchem laurynowym oraz typowy heksaacylowany lipid IV_A+C12+C14. W związku z tym uznano, że może wystąpić Kdo-niezależna późna acylacja w warunkach powolnego wzrostu w temperaturze 21-23°C. Szczepy, syntetyzujące minimalną strukturę Kdo₂-lipid IV_A, wykazywały bardzo wolne tempo wzrostu, a także posiadały mniejsze ilości białka FtsZ, tworzącego pierścień przegrody w czasie podziału komórkowego, oraz białka PpiD, będącego czynnikiem fałdowania białek błony zewnętrznej. Okazało się, że zgodnie z defektami białek błony wewnętrznej, delecja $\Delta(waaC\ surA)$ jest letalna. Mutanty $\Delta waaA$ i $\Delta waaC$ pozbawione późnych łańcuchów acylowych wykazywały konstytutywną hiperindukcję RpoE- i Cpx-zależnych szlaków odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej. W genie *msbA* zostały zidentyfikowane mutacje supresorowe, które pozwalały na wzrost mutantów $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$, jak i $\Delta(waaC\ lpxL\ lpxM\ lpxP)$ w warunkach szybkiego wzrostu. Spośród wspomnianych mutacji supresorowych chromosomalne podstawienie *msbA*-498Val umożliwiało wzrost szczepów, które

syntetyzowały LPS z lipidem IV_A. Co więcej, skład rdzenia oligosacharydowego LPS z mutantą $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ był znacząco zmieniony w warunkach modyfikujących lipid A. W takich warunkach powyższy mutant syntetyzował głównie glikoformę LPS z trzecim Kdo i Rha, jednocześnie skróconą o końcowy disacharyd. Glikoforma ta może posiadać aż do czterech reszt *P*-EtN, natomiast pozbawiona jest L-Ara4N. Nadekspresja produktu genu *msbA* przywracała normalną syntezę glikoformy LPS z dwiema resztami Kdo, a także pozwalała na inkorporację L-Ara4N. Okazało się, że ze względu na indukcję RpoE-regulowanej transferazy fosfoetanolaminy EptB, mutanty $\Delta waaC$ preferencyjnie dołączają *P*-EtN do Kdo niż do lipidu A. Jednakże w przypadku braku EptB, mutant $\Delta(waaC\ eptB)$ posiadał lipid A zmodyfikowany przez *P*-EtN, co wskazuje, że w zależności od indukcji odpowiedzi na stres i kompozycji genetycznej, *P*-EtN może być inkorporowany albo do lipidu A, albo do Kdo, albo do obu powyższych. W kolejnej pracy Klein *et al.*, 2011 skupiono się na molekularnych podstawach inkorporacji trzeciego Kdo, na zmianach w rdzeniu wewnętrznym i zewnętrznym oraz na wymaganiu RpoE-regulowanego, niekodującego sRNA. Jako kontynuacja powyższych badań, w pracy Klein *et al.*, 2016 zostały opisane molekularne podstawy transkrypcyjnej indukcji genu *rpoE* w odpowiedzi na zaburzenia w biogenezie LPS.

III. Molekularne podstawy heterogenności lipopolisacharydów u *Escherichia coli*. Regulatory odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej kontrolują inkorporację glikoform z trzecim kwasem 3-deoksy- α -D-manno-okt-2-ulozonowym i ramnozą

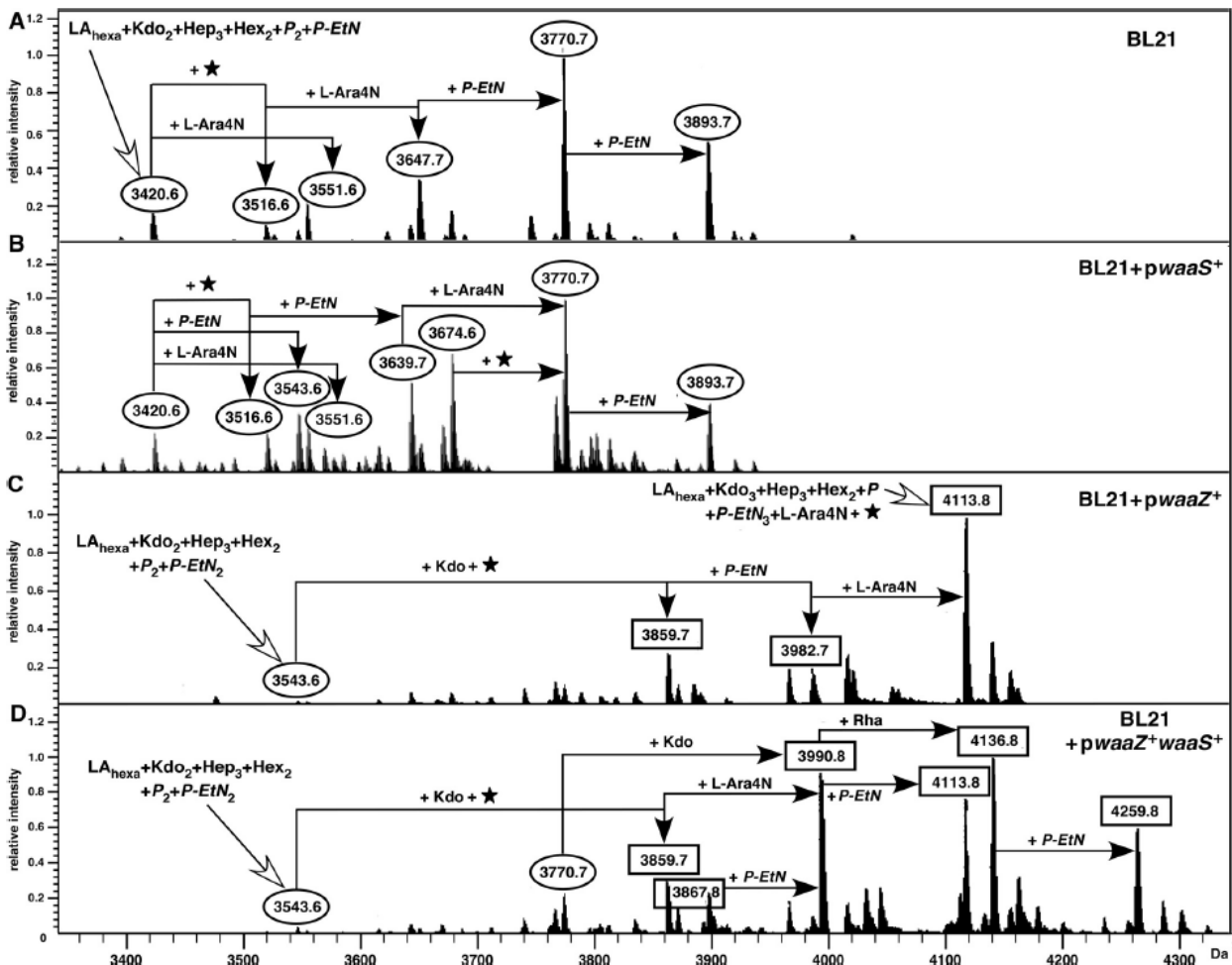
Wprowadzenie

Powszechnie wiadomym jest, że skład LPS jest dość heterogeny. Heterogenność ta powstaje w wyniku niestechiometrycznych modyfikacji lipidu A i rdzenia wewnętrznego. Najczęściej obserwowane modyfikacje lipidu A polegają na dodaniu *P*-EtN i L-Ara4N. Modyfikacje te zachodzą na skutek aktywacji systemu dwuskładnikowego BasS/R. System ten ulega indukcji poprzez ekspozycję na niskie pH, wysokie stężenie jonów Fe³⁺ oraz w pożywce z ograniczoną ilością fosforanów i zawierającą niskie, nie zakłócające fizjologii stężenia jonów Zn²⁺ i Fe³⁺ (Klein *et al.*, 2009). Analogicznie, struktura rdzenia wewnętrznego może być również podstawiona niestechiometrycznie przez reszty takie jak fosforan, Rha, *P*-EtN i dodatkowy Kdo. Trzy wcześniejsze projekty badawcze koncentrowały się na strukturalnych aspektach modyfikacji dodatkowego Kdo powiązanego z disacharydem Kdo. Wyniki jednego ze studiów badawczych pokazały, że nadekspresja genu *waaZ* z *E. coli* K-12 w pozbawionym genu *waaZ* szczepie *E. coli* o rdzeniu R1 prowadzi do zwiększonych ilości trisacharydu Kdo(2→4)Kdo(2→4)Kdo w rdzeniu wewnętrznym (Frirdich *et al.*, 2003). W kolejnej pracy oczyszczono cztery różne glikoformy LPS ze szczepu *E. coli* K-12. Jedną z pomniejszych wyizolowanych form, oznaczoną jako glikoforma IV, posiadała tetrasacharyd Kdo(2→4)[α -L-Rha(1→5)]Kdo(2→4)Kdo połączony z lipidem A (Müller-Loennies *et al.*, 2003). Jednak bezpośredni udział WaaZ w inkorporacji trzeciego Kdo nie został dowiedziony. W trzeciej pracy pokazano, że LPS ze szczepów o tetraacylowanym lipidzie A, na skutek braku późnych acylotransferaz LpxL, LpxM i LpxP, wykazywał prawie wyłącznie syntezę glikoformy IV (Klein *et al.*, 2009). We wszystkich powyższych analizach stwierdzono, że inkorporacji trzeciej cząsteczki Kdo towarzyszy skrócenie rdzenia poprzez nieobecność końcowego disacharydu Hex-Hep. Jednakże molekularne podstawy skrócenia rdzenia zewnętrznego nie zostały poznane. Ponieważ szczepy syntetyzujące tetraacylowany lipid A posiadają zwiększoną aktywność czynnika RpoE (Klein *et al.*, 2009), powstało pytanie czy występuje bezpośrednie czy pośrednie wymaganie aktywności RpoE. Tak więc w ramach niniejszej pracy zostały zidentyfikowane geny strukturalne, które są wymagane w syntezie glikoformy z trzecią resztą Kdo i Rha. W tym celu wykorzystano szczepy z niepolarnymi mutacjami w różnych genach zlokalizowanych w locusie *waa*. Następnie zbadano rolę różnorodnych regulatorów wymaganych w rozpoznawaniu zmian w błonie zewnętrznej, które wpływają na nagromadzenie się poszczególnych glikoform.

Wzrost *E. coli* w pożywce ubogiej w fosforan indukuje syntezę glikoformy IV - Wcześniej w Klein *et al.*, 2009 wykazaliśmy, że wzrost szczepów *E. coli* K-12 w pożywce z ograniczoną ilością fosforanu powoduje inkorporację *P*-EtN i L-Ara4N do lipidu A na skutek indukcji systemu BasS/R. Warunki rozwoju w takiej pożywce również powodują preferowane dodawanie *P*-EtN do drugiego Kdo, natomiast w przypadku mutantów $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ także sprzyjają akumulacji pochodnych glikoformy IV. Porównując kompozycję LPS wyizolowanych ze szczepu *E. coli* K-12 W3110, rosnącego w bogatej

w fosforan pożywce M9 lub w ubogiej w fosforan pożywce 121 zauważono, że w przypadku LPS z bakterii z pożywki 121 w przytłaczającej ilości LPS stanowiły pochodne glikoformy IV o przewidywanym składzie LA_{hexa} (Kdo_3 Rha Hep₃ Hex₃ P₂). Ponadto w warunkach pożywki 121 są obecne glikoformy I i IV z inkorporacją *P*-EtN i L-Ara4N. W przeciwieństwie do tego LPS uzyskany z pożywki M9 wykazywał większość pików masowych, odpowiadających typowej glikoformie I. Wykryto również kilka pików masowych, reprezentujących glikoformę IV. Natomiast z warunków wzrostu w pożywce M9 nie znaleziono żadnych pików masowych LPS odzwierciedlających podstawienie przez *P*-EtN lub L-Ara4N.

***waaZ* i *waaS* są genami strukturalnymi odpowiedzialnymi za inkorporację odpowiednio trzeciego Kdo i Rha** - Wykorzystując fakt, że LPS uzyskany z bakterii wzrastających w pożywce 121 charakteryzował się powszechnym występowaniem glikoformy IV, zanalizowaliśmy LPS z izogenicznych szczepów $\Delta waaZ$, $\Delta waaS$ oraz z innych szczepów z niepolarnymi delecjami genów z locus *waa*, rosnących w pożywce 121. Co istotne, LPS otrzymany z mutantu $\Delta waaZ$ był pozbawiony typowych pików masowych, odpowiadających kompletnej glikoformie IV. Niemniej jednak widma masowe LPS uzyskanego ze szczepu $\Delta waaZ$ nadal zawierały pochodne, odpowiadające LPS ze skróconym rdzeniem zewnętrznym, na skutek utraty terminalnej heptozy i heksozy. Piki te można przypisać pochodnym LA_{hexa} (Kdo_2 Hep₃ Hex₃ P₂). Powyższe wyniki sugerują, że inkorporacja trzeciego Kdo nie wpływa bezpośrednio na skrócenie rdzenia LPS, samo skrócenie zaś może być konsekwencją udziału innych czynników regulatorowych. Ponadto w widmie masowym LPS z mutantu $\Delta waaZ$ nie były obecne pochodne z inkorporacją Rha. Brak lub obecność Rha została również stwierdzona poprzez analizę GC/MS. W LPS z mutantu $\Delta waaS$ wykazano występowanie pików masowych o przewidywanej inkorporacji trzeciego Kdo, lecz pozbawionych Rha. Ponadto LPS ze szczepu $\Delta waaS$ również zawierał typowe piki masowe odpowiadające glikoformie I. Brak inkorporacji Rha w mutantach $\Delta waaZ$, lecz obecność glikoform z trzecim Kdo w mutantach $\Delta waaS$ ujawniło, że wcześniejsza inkorporacja trzeciego Kdo jest koniecznym warunkiem dodania Rha. Jednakże *WaaZ*-zależna inkorporacja trzeciego Kdo nie



Rys. 3. Inkorporacja trzeciego Kdo i Rha w szczepie *E. coli* BL21 w wyniku ko-nadekspresji genów *waaZ* i *waaS*.

wymaga wcześniejszej obecności Rha. To, że gen *waaZ* jest rzeczywiście genem strukturalnym zostało potwierdzone poprzez przywrócenie syntezy glikoform z trzecim Kdo, kiedy $\Delta waaZ$ uległa komplementacji przez gen *waaZ* typu dzikiego.

Rola i kolejność powyższych inkorporacji zostały dodatkowo potwierdzone w pochodnej BL21 szczepu *E. coli* B. Wcześniejsze badania wykazały, że LPS szczepów *E. coli* B nie posiada galaktozy, a jego rdzeń zawiera mniej heptoz i heksoz niż inne typy rdzeni (Jansson *et al.*, 1981). Jednakże genetyczne podstawy powyższych zmian strukturalnych nie były przedmiotem badań i nie było wiadomo, czy *E. coli* B posiada geny *waaZ* i *waaS*. W związku z tym został zsekwencjonowany locus *waa* pochodnej BL21 szczepu *E. coli* B. Analiza sekwencji DNA wykazała, że przy ogólnej kompozycji przypominającej typ rdzenia R1, w locus *waa* jest obecny element IS zlokalizowany w genie *waaT*. Ze względu na to, że element IS występuje w genie *waaT*, region rdzenia pochodnej szczepu *E. coli* B jest skrócony. Co więcej, geny *waaZ* i *waaS* są nieobecne. Stąd jest to idealny szczep do identyfikacji kolejności wydarzeń związanych z WaaZ-zależną inkorporacją trzeciego Kdo oraz ze strukturalnym wymaganiem dla dodania Rha przez WaaS. Analiza LPS z pochodnych *E. coli* B ujawniła piki masowe, odpowiadające strukturze składającej się z LA_{hexa} (Kdo₂ Hep₃ Hex₂ P₂ P-EtN). LPS ten również posiadał dodatkowe niestechiometryczne modyfikacje poprzez P-EtN, L-Ara4N oraz pochodne z dodatkowymi 96 Da (Rys. 3A). W szczepie BL21 stwierdzono brak inkorporacji trzeciego Kdo i Rha, co jest zgodne z nieobecnością genów *waaZ* i *waaS* w genomie powyższego szczepu. Następnie plazmid z systemem ekspresji opartym na polimerazie faga T7, posiadający z *E. coli* albo gen *waaZ*, albo gen *waaS*, albo oba geny *waaZ* i *waaS*, został wprowadzony do szczepu BL21. Nadekspresja samego genu *waaS* ujawniła obecność pików masowych takich, jak w szczepie rodzicielskim BL21 bez inkorporacji reszty Rha (Rys. 3B). Natomiast indukcja ekspresji genu *waaZ* spowodowała powstanie nowych pików masowych, odpowiadających dodaniu trzeciej reszty Kdo (Rys. 3C). Ponadto ko-nadekspresja genów *waaZ* i *waaS* pokazała inkorporację trzeciego Kdo i również dodanie Rha (Rys. 3D). Jednakże nie zostały wykryte żadne piki z przewidywanym dodaniem Rha bez uprzedniej inkorporacji KdoIII. A zatem fakt inkorporacji Kdo₃+Rha w szczepie *E. coli* B po ko-nadekspresji genów *waaS* i *waaZ* uzupełnia wyniki otrzymane ze szczepów $\Delta waaS$ i $\Delta waaZ$ *E. coli* K-12. Podsumowując, wyniki te potwierdzają, że *waaS* i *waaZ* są strukturalnymi genami, których produkty są wymagane do inkorporacji odpowiednio Rha i trzeciego Kdo.

Strukturalne wymagania dla inkorporacji *in vivo* trzeciego Kdo - W pracy Klein *et al.*, 2009 wykazano, że szczepy syntetyzujące tetraacylowany lipid A preferencyjnie posiadają glikoformy z trzecim Kdo. A zatem etapy późnego acylowania lipidu A nie są wymagane do inkorporacji trzeciego Kdo. W pracy tej LPS z niepolarnych mutantów delecyjnych, pozbawionych indywidualnie genów kodujących produkty, które biorą udział w różnych etapach biosyntezy rdzenia, zostały zbadane celem określenia minimalnej struktury LPS, do której może nastąpić inkorporacja trzeciego Kdo. Brak modyfikacji LPS przez trzeci Kdo i Rha zaobserwowano w mutantach $\Delta waaC$, $\Delta waaF$, $\Delta waaG$ i $\Delta waaP$. Natomiast glikoformy z trzecim Kdo+Rha znaleziono w szczepach, które nie mają zdolności do inkorporacji *O*-antygeny, takich jak $\Delta waaU$ i $\Delta waaL$. Powyższe wyniki sugerują, że inkorporacja HepI, HepII, GlcI oraz fosforylacja HepI są kluczowymi wymaganiami dla inkorporacji Kdo₃+Rha. Minimalną strukturę LPS, która jest zdolna do inkorporacji Kdo₃+Rha, zaobserwowano w szczepie $\Delta waaO$. LPS z mutantu $\Delta waaO$, z chromosomalną ekspresją genów *waaZ* i *waaS*, posiadał piki masowe odpowiadające heksaacylowanemu lipidowi A z Kdo₃ Rha Hep₂ Hex₂ P. Nadekspresja genu *waaZ* w mutancie $\Delta waaG$ bądź $\Delta waaP$ nie powodowała inkorporacji Kdo₃+Rha. Wyniki te sugerują, że zarówno fosforylacja HepI, jak i minimalna struktura rdzenia zewnętrznego z dwoma Hep i z dwoma Hex jest *in vivo* niezbędna do syntezy pochodnych z trzecim Kdo i Rha. Ponadto, wykorzystując pochodne szczepu $\Delta(waaO waaB)$, stwierdzono, że jednoczesny brak Gal i GlcII nie pozwala na inkorporację trzeciego Kdo.

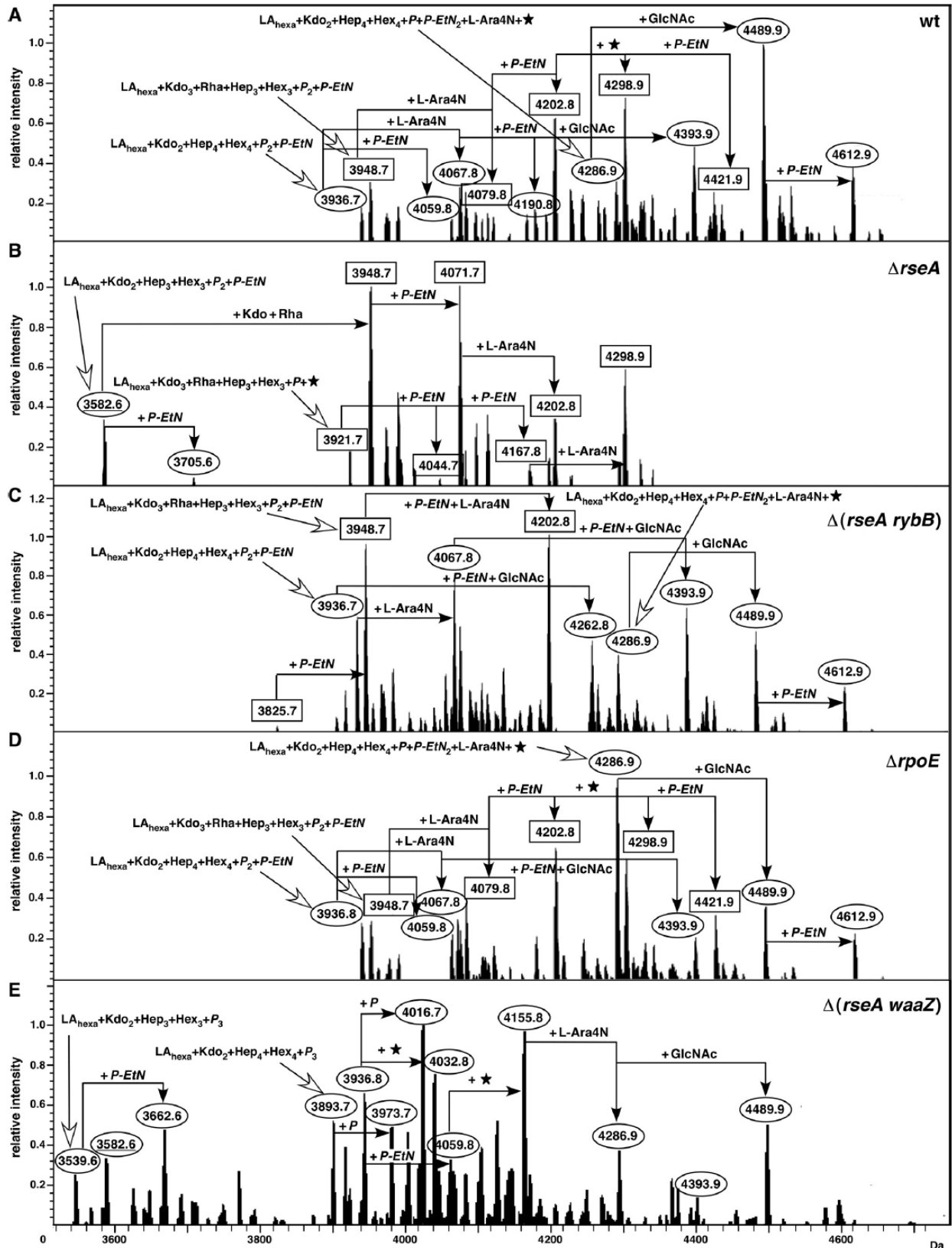
Regulacja ekspresji genu *waaZ* - Aby zrozumieć molekularne podstawy preferencyjnej syntezy glikoform z trzecim Kdo w warunkach wzrostu z ograniczoną ilością fosforanu, poddano analizie poziom białka WaaZ-FLAG i aktywność transkrypcyjną genu *waaZ* w powyższych warunkach. Wyniki z obu analiz wykazały, że przeniesienie z pożywki bogatej w fosforan do pożywki ubogiej w fosforan powodowało prawie dwukrotny wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *waaZ*, co było poparte prawie

podobnym wzrostem poziomu WaaZ-FLAG. Wyniki te wyjaśniają zwiększoną syntezę glikoform z trzecim Kdo w pożywce z ograniczoną ilością fosforanu.

Indukcja RpoE prowadzi do preferencyjnej akumulacji LPS o glikoformach IV i V z trzecim Kdo -

Jest dobrze udokumentowanym, że główną funkcją czynnika sigma RpoE jest kontrola biogenezy białek błony zewnętrznej oraz niektórych etapów translokacji LPS. W Klein *et al.*, 2009 ustalono ponadto, że aktywność RpoE jest indukowana, gdy występują zaburzenia w biogenezie LPS. RpoE kontroluje także niektóre niestechiometryczne modyfikacje, takie jak dołączanie *P*-EtN do drugiego Kdo. Tym samym w pracy tej została zbadana potencjalna regulacja heterogeniczności LPS przez RpoE. Cel ten został osiągnięty poprzez analizę LPS z mutantów wykazujących konstytutywną indukcję RpoE oraz przez wykorzystanie szczepów posiadających mutacje w genach, których produkty regulują biosyntezę/modyfikację LPS. Zatem LPS został zanalizowany z izogenicznych szczepów z niepolarnymi delecjami genów *rseA*, *rseB*, regulatora sRNA *hfq*, *micA*, *rybB*, *rpoS*, *mgrR*, *eptB* i *yrbC/D*. Spośród wszystkich wymienionych mutantów największe zmiany w kompozycji LPS zaobserwowano w mutancie $\Delta rseA$ (Rys. 4B). Ponieważ RseA jest czynnikiem anty-sigma względem RpoE, mutacja $\Delta rseA$ wywoływała konstytutywną indukcję regulonu *rpoE*. Mutanty $\Delta rseA$ syntetyzowały LPS, składający się wyłącznie z pochodnych glikoformy z Kdo₃+Rha. Tylko piki masowe z dwiema resztami Kdo były prekursorami glikoformy IV, z charakterystycznym brakiem terminalnego disacharydu Hep-Hex oraz o całkowitej kompozycji LA_{hexa} (Kdo₂ Hep₃ Hex₃ P₂ *P*-EtN). Natomiast mutanty *rseB*, *hfq* i *rpoS* charakteryzowały się LPS podobnym do typu dzikiego z glikoformami z dwiema resztami Kdo, a także z trzecim Kdo. Ponieważ mutanty *rseB* i *hfq* posiadały prawie 2-krotnie podwyższoną aktywność RpoE, drastyczne zmiany znalezione przede wszystkim w mutantach $\Delta rseA$ sugerują przesunięcie do glikoform z trzecim Kdo, co wymaga maksymalnej indukcji RpoE, jak zostało zauważone w mutantach $\Delta rseA$. Aby upewnić się, że zaobserwowana synteza głównie glikoform z trzecim Kdo była WaaZ-zależna, został skonstruowany podwójny mutant $\Delta(waaZ rseA)$. W LPS powyższego mutantu stwierdzono brak jakichkolwiek pochodnych z Kdo₃+Rha. Jednakże pewne piki masowe z LPS z mutantu $\Delta(waaZ rseA)$ odpowiadały niektórym rodzajom LPS syntetyzowanym przez szczep $\Delta waaR$. Stanowią one prekursorzy pozbawionej terminalnego disacharydu glikoformy IV, dodatkowo nieposiadające Kdo₃+Rha. Wyniki te sugerują, że synteza glikoform z trzecim Kdo, będąca następstwem indukcji RpoE w mutantach *rseA*, może wynikać z regulacji poziomu białka WaaR. Konkluzja ta również została wysnuta na podstawie odkryć, że transkrypcja genu *waaZ* nie jest bezpośrednio regulowana przez E σ^E .

Pozycja Rha jest podyktowana obecnością *P*-EtN na drugiej reszcie Kdo - Jak pokazano powyżej, wzrost w pożywce ubogiej w fosforan powoduje znaczące przesunięcie w kierunku akumulacji glikoform z Kdo₃+Rha. Jak zostało zaprezentowane na przykładzie mutantu $\Delta rseA$, przesunięcie ku występowaniu Kdo₃+Rha jest najbardziej silne i wyraźne w warunkach indukujących RpoE. W Klein *et al.*, 2009 także pokazano, że obecność pożywki 121, posiadającej 2 mM Ca²⁺, była wystarczającym warunkiem do wystąpienia niestechiometrycznego podstawienia *P*-EtN na drugim Kdo. Co więcej, relatywna inkorporacja *P*-EtN zależy od indukcji genu *eptB*, kodującego transferazę fosfoetanolaminy specyficzną dla drugiego Kdo. Transkrypcja genu *eptB* jest indukowana na skutek aktywacji RpoE. W związku z tym zostało szczegółowo zbadane połączenie Kdo-Rha w warunkach obecności i przy braku *P*-EtN na drugim Kdo. Były to ważne badania, ponieważ drugi Kdo jest również miejscem dla niestechiometrycznej substytucji przez *P*-EtN. Tak więc została zanalizowana kompozycja kilku izolowanych pików masowych z przewidywaną obecnością Kdo+Rha. LPS do powyższych doświadczeń został uzyskany albo ze szczepu pozbawionego genu *eptB* albo ze szczepu, w którym preferencyjnie dochodzi do ekspresji *eptB*, jak np. w mutancie $\Delta rseA$. Z LPS, uzyskanego albo ze szczepu typu dzikiego albo z mutantu $\Delta rseA$, wyizolowano potrójnie naładowane jony cząsteczkowe, które następnie poddano fragmentacji na skutek dysocjacji wiązań wywołanej kolizją. Widma MS/MS rodzicielskich pików jonowych, z przewidywaną obecnością dwóch reszt *P*-EtN, ujawniły obecność pików masowych, których skład może być wyjaśniony przez jednoczesną utratę 366,3 Da. Powodem tego może być powstanie rozszczepienia Kdo+Rha z odgałęzienia tetrasacharydu Kdo₃+Rha. Oznacza to, że Rha jest połączona z terminalnym KdoIII. Pozostałe piki masowe z widm MS/MS powyższych jonów rodzicielskich ujawniły piki jonowe, których powstanie można objaśnić dalszą, jednoczesną utratą Kdo+*P*-EtN. Zaobserwowane, nowe formy LPS zostały oznaczone jako glikoforma V.



Rys. 4. Inkorporacja trzeciego Kdo, na skutek konstytutywnej indukcji czynnika sigma RpoE w mutantach $\Delta rseA$, jest regulowana przez niekodujące sRNA *rybB*.

Dekonwolucja wielokrotnie naładowanych form w widmach, a następnie fragmentacja dodatkowych pików jonowych odpowiadających glikoformie V z *P-EtN* na drugim Kdo pokazała, że w analizowanych pikach zawsze występował KdoIII+Rha. Ta interesująca zmiana, spowodowana przez substytucję *P-EtN*

na Kdo, która determinuje obecność Rha na KdoIII, nie była obserwowana, gdy jon rodzicielki nie posiadał *P*-EtN na drugim Kdo. Tak więc obecność *P*-EtN na KdoII prowadzi do dodania Rha do trzeciego Kdo. Ponieważ stwierdzono, że inkorporacja Rha wymaga uprzedniego dodania trzeciego Kdo, w warunkach EptB-zależnego dołączenia *P*-EtN do KdoII najbardziej preferowaną pozycją dla Rha jest trzeci Kdo. Aktywacja RpoE, jak to ma miejsce w przypadku mutanta $\Delta rseA$, prowadzi do konstytutywnej indukcji ekspresji genu *eptB*. W celu jeszcze bardziej dokładnego wyjaśnienia powyższych wyników, została przeprowadzona analiza MS/MS izolowanych pików masowych z LPS szczepu $\Delta eptB$. Widma fragmentacji pików masowych wykazały, że we wszystkich przypadkach odcięty terminalny trzeci Kdo nie posiadał Rha. W przeciwieństwie do tego widma fragmentacji izolowanych pików jonowych o tej samej masie ze szczepów *eptB*⁺ ujawniały jednoczesną utratę Kdo+Rha z tetrasacharydowego odgałęzienia Kdo₃+Rha. Ponadto w widmach fragmentacji pików jonowych z mutanta $\Delta eptB$ nie zaobserwowano żadnych pików jonowych, odpowiadających fragmentacji Kdo+*P*-EtN. Tak więc stwierdzono, że inkorporacja *P*-EtN na drugim Kdo jest konieczna do syntezy glikofory V z przełączonym dodaniem Rha do terminalnego, trzeciego Kdo.

Kontrolowany przez RpoE, niekodujący, mały RNA *rybB* pośredniczy w regulacji glikofory IV oraz akumulacja glikofory V poprzez *rybB*-zależne hamowanie translacji WaaR - RpoE reguluje syntezę głównych białek błony zewnętrznej komórki poprzez hamowanie translacji mRNA genów kodujących te białka. Ta translacyjna represja odbywa się dzięki kontrolowanym przez RpoE, działającym w *trans* sRNA: RybB i MicA. Aby odpowiedzieć na pytanie, czy któryś z powyższych sRNA również reguluje syntezę poszczególnych glikoform, skonstruowano izogeniczne mutanty delecyjne *rybB* i *micA*, a następnie delecje te wprowadzono do mutanta $\Delta rseA$. Analiza LPS ze szczepu $\Delta(rseA\ rybB)$ pokazała przywrócenie syntezy glikofory I, jak również to, że kompozycja badanego LPS przypomina tą ze szczepu typu dzikiego. Natomiast wprowadzenie mutacji $\Delta micA$ do szczepu $\Delta rseA$ powodowało jedynie częściową supresję odnośnie syntezy glikofory I. Tak więc wyniki te sugerują, że synteza glikoform z trzecią resztą Kdo jest bezpośrednio regulowana przez sRNA RybB. Zatem zbadano poziom białek WaaZ i WaaR otrzymanych z pojedynczych kopii chromosomowych z wykorzystaniem pochodnych z C-końcowym epitopem FLAG. Analiza poziomów ilościowych WaaZ-FLAG wykazała, że w fazie stacjonarnej wzrostu komórki następuje zwiększenie ilości badanego białka w szczepie $\Delta rseA$ w porównaniu do szczepu typu dzikiego. Można stąd wnioskować, że w szczepie $\Delta rseA$ włączenie trzeciej reszty Kdo przynajmniej w części zależne jest od nagromadzenia białka WaaZ w fazie stacjonarnej. Nie wystarcza to jednak do wyjaśnienia kompozycji LPS, w której skład wchodzi głównie pochodne glikofory IV i V. Co ciekawe, poziom innego białka WaaR-FLAG był znacząco obniżony w szczepie $\Delta rseA$, a w szczepie $\Delta(rseA\ rybB)$ dochodziło do przywrócenia jego ilości do poziomu zbliżonego do szczepu typu dzikiego. Wszystkie powyższe wyniki pokazały, że synteza białka WaaR podlega hamowaniu translacyjnemu poprzez sRNA *rybB*, powstające w wyniku aktywacji RpoE, co skutkuje inkorporacją trzeciej reszty Kdo z jednoczesnym skróceniem LPS o terminalny disacharyd Glc-Hep. Zatem akumulacja glikofory IV i V spowodowana jest w szczególności zmniejszeniem ilości białka WaaR na poziomie translacji.

Mutanty $\Delta waaR$ wykazują zwiększoną inkorporację trzeciej reszty Kdo, co prowadzi do preferencyjnej akumulacji glikofory IV i V - W oparciu o ustalenia, że obniżony poziom białka WaaR w mutancie $\Delta rseA$ bądź, ogólnie mówiąc, warunki wzrostu w pożywce 121 są odpowiedzialne za indukcję syntezy glikofory IV i V ze skróconym rdzeniem zewnętrznym, została zbadana struktura LPS z mutanta $\Delta waaR$. W mutancie z niepołączoną delecją genu *waaR* głównie występował LPS, będący glikoformą IV i V z Kdo₃+Rha. Wyniki analizy LPS mutanta $\Delta waaR$ sugerują, że brak białka WaaR lub obecność przypuszczalnie preferowanych prekursorów o kompozycji Hep₃ Hex₃ wysoce sprzyja inkorporacji trzeciego Kdo, prowadząc do syntezy glikofory IV i V. Analiza LPS mutanta $\Delta waaR$, hodowanego w warunkach bogatych w fosforany, również ujawniła szereg pików masowych charakterystycznych dla glikofory IV. W ten sposób *in vivo* LPS ze szczepu $\Delta waaR$ jest korzystnym substratem do inkorporacji trzeciego Kdo. W związku z tym można stwierdzić, że WaaR determinuje przełączenie pomiędzy glikoformą I i IV. Ponadto w szczepie $\Delta waaR$ do włączenia trzeciego Kdo nie jest wymagana indukcja systemów BasS/R i PhoB/R.

Glikofory IV i V z trzecim Kdo, występujące w mutancie $\Delta rseA$, są nieobecne w jego pochodnej $\Delta(relA\ spoT\ rseA)$ - Alarmon guanozyno-3'-5'-bipirofosforan (ppGpp) jest powszechnym sygnałem

stresu głodu. W momencie wejścia w stacjonarną fazę wzrostu ppGpp reguluje aktywację alternatywnych czynników sigma, jak również konkurencję pomiędzy różnymi czynnikami sigma. ppGpp jest także znany z udziału w regulacji systemu dwuskładnikowego PhoB/R oraz RpoS. Tak więc został poddany analizie LPS z izogenicznych szczepów ppGpp⁰ (*relA spoT*) i Δ (*relA spoT rseA*). Wprowadzenie mutacji Δ *rseA* do szczepu Δ (*relA spoT*) (ppGpp⁰) znosiło akumulację pików masowych odpowiadających glikoformie IV i V, podczas gdy szczep Δ (*relA spoT*) posiada LPS taki, jak szczep typu dzikiego. Zatem mutant Δ (*relA spoT rseA*) nie posiadał jakichkolwiek wykrywalnych ilości LPS z trzecim Kdo i Rha, które dominują w szczepie rodzicielskim Δ *rseA*. Wręcz przeciwnie, były obecne tylko piki masowe odpowiadające glikoformie I. Co ciekawe, nie tylko akumulacja glikoformy IV i V uległa supresji, lecz również nie odnotowano pików masowych z przewidywaną inkorporacją L-Ara4N, które występują zarówno w szczepie Δ *rseA*, jak i Δ (*relA spoT*). Analizy pików masowych, odpowiadających lipidowi A, ujawniły obecność piku o masie 1920,2 Da (L_{Ahexa}P-EtN) i brak piku odzwierciedlającego dodatnie L-Ara4N. Tym samym ppGpp kontroluje zarówno kompozycję rdzenia LPS, jak i modyfikację lipidu A w warunkach indukujących RpoE. Pokazuje to, że u *E. coli* włączenie L-Ara4N nie tylko wymaga indukcji BasS/R, ale jest dodatkowo dostrajane przez ppGpp. Niniejsza praca po raz pierwszy wykazała obecność u *E. coli* strukturalnych zmian w lipidzie A oraz w rdzeniu LPS, które są zależne od ppGpp.

Preferencja glikoformy I lub IV i ich wpływ na poziomy białek błony zewnętrznej - Bezspornym jest, że mutant Δ *rseA* wykazuje konstytutywnie podwyższoną aktywność RpoE, co prowadzi do zmniejszenia ilości białek błony zewnętrznej. Jest to przypisane indukcji kontrolowanych przez RpoE niekodujących RNA, które regulują obniżenie syntezy białek błony zewnętrznej. Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy wykazały, że mutant Δ *rseA* głównie syntetyzuje LPS złożony z glikoformy IV i V. Tak więc zadaliśmy pytanie, czy ogólnie rzecz biorąc przełączenie z glikoformy I do glikoformy IV i V również odzwierciedla *in vivo* wszelkie zmiany w poziomie białek błony zewnętrznej. Odpowiedź na powyższe pytanie jest bardzo ważna, ponieważ kombinacja Δ (*rseA rybB*) prowadzi do przywrócenia prawidłowej kompozycji białek błony zewnętrznej, a także do powrotu do syntezy glikoformy I. W ten sposób zostało ustalone znaczenie inkorporacji trzeciego Kdo (glikoforma IV i V) dla składu białek błony zewnętrznej. Osiągnięto to poprzez zastosowanie kilku różnych pojedynczych mutacji oraz ich kombinacji, których rezultatem była synteza albo glikoformy I albo glikoformy IV i V. Całkowite lizaty komórkowe zostały przygotowane ze szczepu dzikiego oraz z mutantów Δ *rseA*, Δ (*relA spoT*), Δ (*relA spoT rseA*), Δ *waaR* i Δ *waaZ*. Spośród wykorzystanych szczepów, mutanty Δ *waaZ* i Δ (*relA spoT rseA*) posiadały LPS, w którego skład wchodziła głównie glikoforma I. W przeciwieństwie do nich mutanty Δ *rseA* i Δ *waaR* syntetyzowały przede wszystkim glikoformę IV i V. Zgodnie z oczekiwaniami u mutantu Δ *rseA* występowały obniżone poziomy głównych białek błony zewnętrznej, lecz mutant Δ *waaR*, o niemalże podobnym składzie LPS, posiadał ilości białek błony zewnętrznej zupełnie takie, jak szczep typu dzikiego. Wyniki te wskazują, że indukcja lub preferencyjna obecność glikoformy IV i V nie przyczynia się do redukcji ilości białek błony zewnętrznej. Badanie ilości białek błony zewnętrznej u mutantu Δ (*relA spoT rseA*) wykazało bardzo obniżone ich poziomy, natomiast szczep Δ *waaZ* miał poziomy białek błony zewnętrznej wysoce zbliżone do szczepu typu dzikiego, mimo tego, że oba mutanty posiadają taki sam typ LPS będący glikoformą I. Co ciekawe, u mutantu Δ (*relA spoT*) także występują zredukowane poziomy białek błony zewnętrznej, które nie ulegają supresji w szczepie Δ (*relA spoT rseA*), pomimo że budowa LPS w odniesieniu do glikoformy I oraz glikoformy IV i V jest znacznie inna. Reasumując, wyniki te sugerują, że *in vivo* preferencyjna synteza glikoformy I bądź glikoformy IV i V nie wpływa znacząco na biogenezę białek błony zewnętrznej. Wyniki te są zgodne z brakiem jakiegokolwiek indukcji RpoE w mutancie Δ *waaR*.

Regulacja różnorodności LPS przez systemy BasS/R i PhoB/R w mutancie Δ *rseA* - Ponieważ wzrost *E. coli* w pożywce ubogiej w fosforan powodował wyraźne przesunięcie ku obecności glikoformy IV i V, zostało zanalizowane czy system dwuskładnikowy BasS/R lub PhoB/R, bądź oba wymienione systemy są wymagane do uzyskania powyższego fenotypu. Badanie LPS wyekstrahowanego z izogenicznych szczepów Δ *basR* i Δ *phoB* wykazało obecność glikoformy I z pełnym rdzeniem oraz glikoformy IV. Jednakże LPS z mutantów Δ *basR* ujawniał znacznie mniejsze zróżnicowanie w porównaniu z LPS ze szczepu typu dzikiego czy też z mutantu Δ *phoB* z powodu braku niestechiometrycznego dołączenia P-EtN i L-Ara4N do lipidu A. W widmach masowych LPS z mutantu Δ *basR* były obecne piki masowe, odpowiadające glikoformie IV i V z dwoma kolejnymi resztami P-EtN oraz z dodatkowym podstawieniem o 96 jednostkach masowych. Pokazuje to, że w odróżnieniu od dodania P-EtN do lipidu

A, które jest zależne od BasS/R, niestechiometryczna inkorporacja *P*-EtN do drugiego Kdo lub HepI jest niezależna od BasS/R. Co istotne, w LPS ze szczepu $\Delta(basR\ phoB\ rseA)$ występują piki masowe odpowiadające glikoformie I, jak też glikoformie IV i V, w odróżnieniu od LPS ze szczepu $\Delta rseA$, który posiada głównie glikoformę IV i V. Wyniki te wskazują, że indukcja obu systemów dwuskładnikowych BasS/R i PhoB/R przyczynia się do syntezy/inkorporacji glikoformy IV i V w mutancie $\Delta rseA$, choć pojedynczo oba systemy BasS/R i PhoB/R nie są niezbędne do przełączenia w strukturze glikoform.

Fizjologiczne znaczenie WaaZ-zależnej syntezy glikoform z trzecim Kdo - W niniejszej pracy wykazano, że aktywacja szlaku RpoE preferencyjnie indukuje syntezę glikoformy IV i V, co zaobserwowano w mutancie $\Delta rseA$. Ponieważ mutant $\Delta waaR$ akumuluje takie same glikoformy jak szczep $\Delta rseA$, postanowiliśmy zbadać status aktywności RpoE, gdy gen *waaR* jest nieobecny. Pomimo podobnego składu LPS w obu mutantach, aktywność RpoE-zależnych promotorów nie była indukowana w mutancie $\Delta waaR$ w odróżnieniu od maksymalnej aktywacji RpoE w szczepie $\Delta rseA$. Tak więc zainteresowania nasze skierowaliśmy ku specyficznemu wymaganiu białka WaaR. O ile brak białka WaaZ w mutancie $\Delta rseA$ nie powodował żadnych zauważalnych zmian we wzroście bakteryjnym, o tyle został zaobserwowany bezwzględny wymóg WaaZ w szczepie $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$. Szczep $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ nie wytwarza kolonii na pożywce LA w temperaturze 30°C. Pokazaliśmy, że wolny od supresorów szczep $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ może być skonstruowany na pożywce LA w temperaturze 21-23°C. Tak otrzymany szczep $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP)$ również syntetyzował LPS, składający się głównie z glikoform, które posiadały trzecią resztę Kdo, aczkolwiek lipid A był tetraacylowany. Co ciekawe, żywotny mutant $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP\ waaZ)$ mógł być skonstruowany tylko na pożywce minimalnej w temperaturze 21-23°C, lecz nie w pożywce LA w tej temperaturze. Niniejszy wymóg białka WaaZ został potwierdzony poprzez konstrukcję mutantu $\Delta(lpxL\ lpxM\ lpxP\ waaZ)$ w pożywce LA, gdy komplementujący gen *lpxL* lub *waaZ* został dostarczony w *trans* z plazmidu. A zatem gen *waaZ* jest niezbędny do wzrostu bakteryjnego, w pożywce LA w niskiej temperaturze, szczepów syntetyzujących LPS z tetraacylowanym lipidem A.

Podsumowanie, wnioski i znaczenie otrzymanych wyników opisanych w pracy Klein *et al.*, 2011 - W niniejszej pracy jednym z podstawowych i ważnych odkryć było stwierdzenie, że wzrost *E. coli* w pożywce ubogiej w fosforan powodował wyraźne przesunięcie w kompozycji LPS, którego konsekwencją była zwiększona akumulacja glikoform z trzecim Kdo i charakterystycznym skróceniem rdzenia zewnętrznego. W typowych warunkach wzrostu glikoforma ta zazwyczaj występuje w małych ilościach. Przed rozpoczęciem naszych badań nie był zidentyfikowany strukturalny gen, który pośredniczy w transferze trzeciej reszty Kdo. Co więcej, nie były analizowane molekularne podstawy heterogenności składu LPS. W prezentowanej pracy wyniki spektrometrii masowej LPS otrzymanych z izogenicznych szczepów *E. coli* z niepolarnymi mutacjami w locus *waa* lub z nadekspresją odpowiadających im genów wykazały, że *waaZ* i *waaS* są strukturalnymi genami wymaganymi do inkorporacji odpowiednio trzeciej reszty Kdo, przyłączonej do disacharydu Kdo, i Rha. W związku z powyższym, LPS z mutantu $\Delta waaZ$ zawierał głównie glikoformę I, zaś była nieobecna glikoforma IV z trzecim Kdo. Jednakże stwierdzono obecność pików masowych, które odpowiadają prekursorom glikoformy IV. Prekursory te były bez terminalnego disacharydu Hep-Hex oraz bez trzeciego Kdo. Wyniki te sugerują, że skrócenie rdzenia zewnętrznego nie jest bezpośrednim następstwem inkorporacji trzeciego Kdo. Co ciekawe, w LPS uzyskanym z mutantu $\Delta waaZ$ nie znaleziono pików masowych, mających Rha. Zostało wykazane, że dołączenie Rha wymaga uprzedniego sekwencyjnego wytworzenia trisacharydu Kdo. Do wyjaśnienia tego procesu posłużyła strukturalna analiza LPS ze szczepu BL21, będącego pochodną *E. coli* B, który w sposób naturalny nie posiada genów *waaZ* i *waaS*. Nadekspresja w szczepie BL21 genu *waaZ*_{*E. coli*} albo genu *waaS*_{*E. coli*}, albo obu tych genów jednocześnie wykazała, że w szczepie tym dochodzi do inkorporacji Rha do rdzenia wewnętrznego LPS tylko po WaaZ-zależnym dodaniu trzeciego Kdo.

Systematyczna analiza LPS z różnych mutantów *waa* z nadekspresją lub bez nadekspresji genu *waaZ* ustaliła, że *in vivo* do LPS z mutantu $\Delta waaO$ (pozbawionego α -1,3-glukozylotransferazy), o minimalnej strukturze rdzenia Kdo₂ Hep₂ Hex₂ P₁ zakotwiczonego do lipidu A, może być dołączona trzecia reszta Kdo oraz Rha bez nadekspresji genów *waaZ* i *waaS*.

Wiele doświadczeń, przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, mających na celu badanie molekularnych podstaw różnorodności LPS, ujawniło nakładające się kontrole przez czynnik sigma

RpoE, systemy dwuskładnikowe (BasS/R, PhoB/R) oraz ppGpp. Usunięcie RseA, będącego specyficznym dla RpoE czynnikiem anty-sigma, doprowadziło niemal do wyłącznej obecności glikoform z trzecim Kdo związanym z disacharydem Kdo. Towarzyszyła temu jednoczesna inkorporacja Rha, która była przyłączana albo do terminalnej trzeciej reszty Kdo albo do drugiej reszty Kdo w zależności od obecności lub braku *P*-EtN na drugim Kdo, a także równoczesne skrócenie rdzenia zewnętrznego. W przypadku braku RseA czynnik sigma RpoE jest maksymalnie aktywny i stąd wszyscy członkowie jego regulonu ulegają konstytutywnej indukcji. W ten sposób w powyższych warunkach także ulega indukcji gen *eptB*, który jest transkrybowany przez RpoE. Indukcja ta może przewyciężyć hamowanie translacji *eptB* mRNA przez *mgr* sRNA, co skutkuje preferencyjną inkorporacją *P*-EtN na drugim Kdo. Modyfikacja ta prowadzi do syntezy glikoformy V, która jest najbardziej rozpowszechnioną strukturą LPS w warunkach indukujących RpoE.

Glikoformy, które posiadają trzecią resztę Kdo, zawsze mają skrócenie rdzenia o terminalny disacharyd Hep-Hex. Skrócenie to w mutancie $\Delta rseA$ zostało przypisane obniżonemu poziomowi glikozylotransferazy WaaR, który to poziom został przywrócony do typu dzikiego, włącznie z kompozycją LPS, z chwilą wprowadzenia delekcji *rybB* sRNA. Zatem RybB nie tylko hamuje translację różnych genów kodujących poryny, lecz także *waaR* mRNA. Zgodnie z faktem, że *waaR* mRNA jest celem hamowania przez RybB, szczep $\Delta waaR$ posiada LPS przede wszystkim z trzecim Kdo bez jakiegokolwiek wymogu obecności warunków ubogich w fosforan. Zostało również pokazane, że akumulacja w mutancie $\Delta rseA$ glikoformy z trzecim Kdo i L-Ara4N w lipidzie A wymaga ppGpp, co było zniesione w mutancie $\Delta(ppGpp^0 rseA)$. Opisana rola RybB sRNA i alarmonu ppGpp w regulacji biosyntezy LPS była pierwszą tego typu kontrolą dla powyższych ważnych regulatorowych molekuł.

Włączenie trzeciej reszty Kdo i towarzyszące temu skrócenie rdzenia zewnętrznego może mieć szereg istotnych konsekwencji. Tego rodzaju formy LPS ze skróconym rdzeniem zewnętrznym nie mogą dołączyć *O*-antygeny, ponieważ miejsce przyłączenia wymaga terminalnej heptozy, która jest nieobecna w glikoformie IV i V. W ten sposób szczepy syntetyzujące te glikoformy potencjalnie mogą być defektywne pod względem przeżycia w gospodarzu. W pracy tej również wykazano, że szczep $\Delta(waaZ lpxL lpxM lpxP)$, syntetyzujący tetraacylowany lipid A, wykazywał syntetyczną letalność w temperaturze 21-23°C, co wskazuje na duże znaczenie włączenia trzeciego Kdo.

Analiza widm masowych LPS z szeregu pochodnych *E. coli* K-12 oraz *E. coli* B zidentyfikowała nową modyfikację, wynikającą z dodania 96 jednostek masowych do regionu rdzenia. Ta nowa modyfikacja nie została wcześniej zaobserwowana. Była ona specyficznie indukowana, kiedy *E. coli* wzrastała w warunkach ubogich w fosforan. Wstępne wyniki wykazały, że modyfikacja ta powstaje w wyniku inkorporacji reszty HexA (176,01 Da) na HepIII z towarzyszącą utratą reszty fosforanowej na HepII. Modyfikacja ta została zanalizowana w Klein *et al.*, 2013.

IV. Molekularne i strukturalne podstawy zmian rdzenia wewnętrznego lipopolisacharydów u *Escherichia coli*. Inkorporacja kwasu glukuronowego oraz fosfoetanoloaminy w regionie heptozy

Wprowadzenie

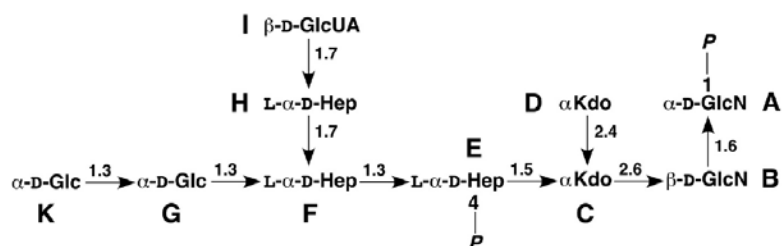
Jest dobrze udokumentowane, że LPS często posiada niestechiometryczne podstawienia w lipidzie A i w rdzeniu wewnętrznym. We wcześniejszej pracy wyczerpująco zostały zanalizowane molekularne podstawy różnorodności LPS u *E. coli* K-12 (Klein *et al.*, 2011). Ponieważ RpoE kontroluje i odpowiada na główne defekty błony zewnętrznej, podczas powyższej analizy również badaliśmy RpoE i jego regulatory. Indukcja RpoE okazała się prowadzić do bardzo zwiększonej ilości glikoform z trzecią resztą Kdo i skróconym rdzeniem zewnętrznym. Jest to regulowane przez translacyjne hamowanie glikozylotransferazy WaaR poprzez RpoE-zależny *rybB* sRNA. Ponadto indukcja RpoE powoduje preferencyjną akumulację glikoformy V z Rha dołączoną do trzeciej reszty Kdo i z *P*-EtN na drugim Kdo dzięki transkrypcyjnej indukcji RpoE-regulowanego genu *eptB*. Również zostało zaprezentowane, że różnorodność LPS jest dodatkowo regulowana przez systemy dwuskładnikowe PhoB/R i BasS/R (Klein *et al.*, 2011). System PhoB/R reaguje na ograniczenia fosforanu i kontroluje modyfikacje LPS, które częściowo pokrywają się z tymi, które są regulowane przez system BasS/R. Poza tym system BasS/R jest silnie indukowany w warunkach z ograniczoną ilością fosforanu, gdy pożywka posiada submilimolarne stężenia jonów Zn^{2+} i Fe^{3+} (Klein *et al.*, 2009). Wykazano, że w takich warunkach wzrostu widma

masowe LPS ze szczepu dzikiego *E. coli* K-12, a także ze szczepu *E. coli* B, charakteryzują się kilkoma sygnałami o 96 jednostek masowych wyższymi niż sygnały z LPS otrzymanego z bakterii wzrastających w warunkach bogatych w fosforany, takich jak pożywka M9 czy LB. Modyfikacja ta, specyficzna dla regionu rdzenia, występuje w glikoformie I (z dwoma resztami Kdo dołączonymi do lipidu A), jak również w glikoformie IV i V (z trzema resztami Kdo) (Klein *et al.*, 2011). Opisywaną modyfikację stwierdzono w rdzeniu LPS, gdy lipid A był albo tetraacylowany albo heksaacylowany. Nie była ona indukowana przez podjednostkę sigma RpoE o funkcji ekstracytoplazmatycznej ani przez system dwuskładnikowy BasS/R (Klein *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2011). Ponadto tak zmodyfikowany LPS posiada aż do trzech reszt *P*-EtN. Jedna z reszt została przypisana do lipidu A, kolejna do drugiej reszty Kdo, a trzecia do ufosforylowanej HepI. Aż do tego czasu nie został zidentyfikowany gen kodujący transferazę *P*-EtN specyficzną dla HepI.

Tak więc w pracy Klein *et al.*, 2013 została ustalona struktura chemiczna LPS, zawierającego niestechiometryczną modyfikację, która powodowała dodanie netto 96 jednostek masowych. Opisano, że nowa modyfikacja rdzenia wewnętrznego LPS z *E. coli* wynika z dodania GlcUA do HepIII z jednoczesną utratą fosforu na HepII. Dzięki wykorzystaniu różnych metod genetycznych i biochemicznych zidentyfikowano gen, który koduje produkt, będący nową glikozylotransferazą. Omawiana modyfikacja na HepIII została potwierdzona w szczepie *E. coli* B, K-12, w szczepach o rdzeniach typu R2 i R4 oraz w szczepach *Salmonella*. Analiza mutacyjna oraz badanie strukturalne LPS pozwoliło nam na identyfikację transferazy fosfoetanolaminowej, odpowiedzialnej za dodanie *P*-EtN do ufosforylowanej HepI. Kodujący ją gen nazwaliśmy *eptC*. Konstrukcja delecyjnych pochodnych genu *eptC* wykazała ważną rolę modyfikacji przez *P*-EtN ufosforylowanej HepI w kontrolowaniu funkcji przepuszczalności błony zewnętrznej, a tym samym duże fizjologiczne znaczenie tej modyfikacji.

Strukturalna analiza deacylowanego LPS - Jak pokazano wcześniej, LPS ze szczepu *E. coli* B jest mniej zróżnicowany niż LPS ze szczepu *E. coli* K-12, ponieważ składa się z heksaacylowanego lipidu A, posiadającego dwie reszty Kdo, trzy Hep, dwie Hex i fosforan (Klein *et al.*, 2011). W powyższym LPS masa dużej ilości cząsteczek jest o 96 jednostek masowych wyższa niż znane odpowiednie glikoformy *E. coli* K-12 (Klein *et al.*, 2011). W związku z tym zbadano LPS ze szczepu *E. coli* B, który to LPS po *O*- i *N*-deacylacji ujawnił, na drodze wysokowydajnej chromatografii anionowymiennej (HPAEC), jeden, główny oligosacharyd i kilka mniejszych frakcji. Główny oligosacharyd wyodrębniono za pomocą semipreparatywnej HPAEC, a za pomocą GLC-MS po metanolizie i peracetylacji zostały zidentyfikowane główne sygnały Glc, Hep, Kdo i kwasu heksuronowego obok słabych sygnałów z disacharydów, składających się z kwasu heksuronowego-Hep, Hep₂ i GlcN₂. Wzór fragmentacji kwasu heksuronowego w GLC-MS był identyczny z autentycznym peracylowanym GlcUA.

Budowa chemiczna wyizolowanego głównego oligosacharydu została określona poprzez jedno- i dwuwymiarową ¹H-, ¹³C- i ³¹P-spektroskopię NMR. Przyporządkowanie sygnałów wykazało, że badany



Rys. 5. Struktura chemiczna głównego oligosacharydu z deacylowanego LPS ze szczepu *E. coli* B.

w miejscach wiązania i wzajemna korelacja sygnałów w NOESY wykazały, że reszty Hep tworzyły trisacharyd $\alpha\text{Hep}(1\rightarrow7)\text{-}\alpha\text{Hep}(1\rightarrow3)\alpha\text{Hep}$, powszechnie występujący w regionie rdzenia LPS z *E. coli*, który jest przyłączony w pozycji O-5 do wewnętrznej reszty Kdo (C). Reszty αGlc były dwiema pierwszymi resztami rdzenia zewnętrznego połączonymi wiązaniem (1 \rightarrow 3), dołączonymi w pozycji O-3 do środkowej Hep (reszta F). Natomiast βGlcUA było przyłączone do O-7 bocznego łańcucha Hep (H), co zostało wywnioskowane z korelacji sygnałów NOESY między anomerycznym protonem oraz H-7a i -7b powyższej Hep, a także z przesunięć chemicznych w niskim polu tych ostatnich sygnałów.

oligosacharyd był dekasacharydem, składającym się z dwóch αGlc , trzech *L-glycero- α -D-manno-heptoz*, dwóch Kdo, jednej αGlcN (reszta A), jednej βGlcN i jednego kwasu heksuronowego, który poprzez wicynalne ³J_{H,H} stałe sprzężeń został zidentyfikowany jako βGlcUA (reszta I, ³J_{H1,H2} 8 Hz), co przedstawiono na Rys. 5. Przesunięcia chemiczne w niskim polu sygnałów ¹H i ¹³C

Jednocześnie był nieobecny fosforan powszechnie występujący w pozycji O-4 środkowej Hep (F). A zatem wyniki te po raz pierwszy wykazały, że LPS otrzymany z *E. coli*, wzrastającej w warunkach ubogich w fosforan, posiada GlcUA dołączony do HepIII, a jego obecności towarzyszy brak fosforanu na HepII.

Określenie minimalnej struktury LPS, do której może nastąpić inkorporacja GlcUA - Badania opisane w Klein *et al.*, 2011 ujawniły, że LPS ze szczepu *E. coli* K-12, wzrastającego w warunkach z ograniczoną ilością fosforanu, posiada dodatkowe, nowe cząsteczki różniące się od znanych glikoform o 96 jednostek masowych. Takie piki masowe z dodatkowymi 96 Da znaleziono w glikoformach zarówno z dwoma, jak i z trzema resztami Kdo z całkowitym rdzeniem wewnętrznym, co prowadziło do powstania glikoformy VI i VII. Jak opisano powyżej, ta sama modyfikacja została zaobserwowana w szczepie *E. coli* B i wynikała właśnie z dodania GlcUA. Postanowiliśmy zatem zbadać molekularne podstawy tej inkorporacji. Modyfikacji przez GlcUA brakowało w LPS ze szczepów delecyjnych *waaC*, *waaG*, *waaO*, *waaP* i *waaQ*. Natomiast była ona obecna w LPS z mutantą $\Delta waaR$, który jest pozbawiony terminalnego disacharydu Hex-Hep, co dowodzi, że modyfikacja przez GlcUA powinna występować proksymalnie do GlcII. Modyfikacja ta również występuje w mutancie $\Delta waaB$, stąd Gal najwyraźniej nie jest wymagana do inkorporacji GlcUA. Ponieważ w przypadku braku WaaQ HepII nie jest fosforylowana, zbadaliśmy rolę fosforylacji HepII w modyfikacji przez GlcUA. WaaY jest przypuszczalnie kinazą odpowiedzialną za fosforylację HepII. Co ciekawe, LPS z mutantą $\Delta waaY$ wykazywał relatywnie bardziej prominentne piki, odpowiadające inkorporacji GlcUA. Analiza pików masowych LPS z kilku izogenicznych pochodnych szczepu *E. coli* K-12 oraz *E. coli* B wykazała, że dodanie GlcUA było zawsze związane z jednoczesną utratą jednej reszty fosforanowej. Wyniki te sugerują, że dodanie GlcUA do bocznej HepIII jest niekompatybilne z obecnością fosforanu na HepII. Wyjaśnia to liczną przewagę pików masowych posiadających GlcUA w mutancie $\Delta waaY$. W związku z tym zwiększona inkorporacja GlcUA w mutancie $\Delta waaY$ jest spowodowana obecnością nieufosforylowanego akceptora dla tej modyfikacji. Ponadto modyfikacja ta nie wymaga indukcji RpoE-zależnej odpowiedzi stresowej.

Identyfikacja genu *waaH*, kodującego transferazę GlcUA, jako członka regulonu PhoB/R - Ponieważ glikoformy zawierające GlcUA są unikalnie obserwowane w LPS uzyskanym z bakterii hodowanych w warunkach ubogich w fosforan, zasadnym było przypuszczenie, że albo gen kodujący potencjalną glikozylotransferazę może być indukowany przez aktywację PhoB/R albo produkt genu jest aktywowany na skutek aktywacji PhoB/R. System dwuskładnikowy PhoB/R jest silnie indukowany w czasie głodu fosforanowego. LPS ze szczepu z niepolarną delecją genu *phoB* był identyczny jak LPS ze szczepu dzikiego, lecz nie miał GlcUA.

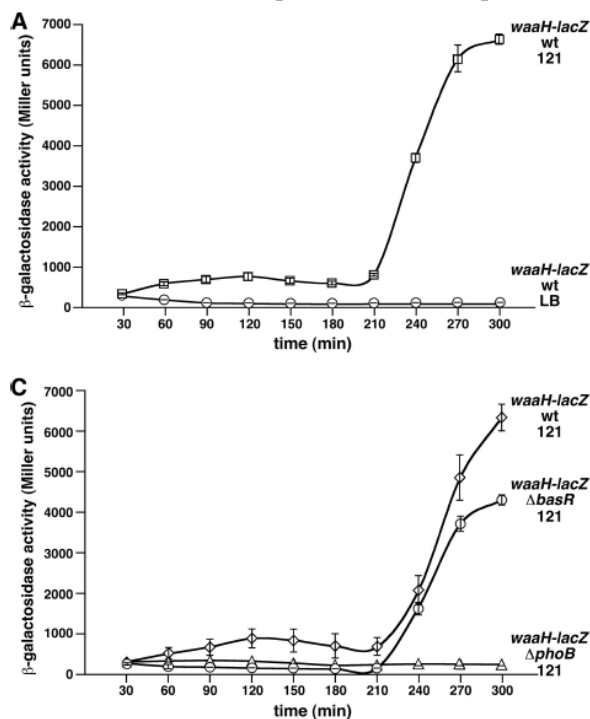
Aby zidentyfikować strukturalny gen kodujący transferazę GlcUA, zostały zbadane rozmaite dostępne macierze z warunków indukujących PhoB. Doprowadziło nas to do przeanalizowania przypuszczalnej ORF *yibD*, gdyż jej przewidywana sekwencja aminokwasowa sugeruje homologię do rodziny glikozylotransferaz 2 (typ GT-A), a transkrypcja genu *yibD* jest silnie indukowana po aktywacji PhoB/R. Jednakże bezpośrednia *in vivo* regulacja nie była uprzednio przedmiotem badań. ORF *yibD* znajduje się poza locus *waa*, w 81,62 min na chromosomie *E. coli* pomiędzy ORF *yibO* o nieznannej funkcji i genem *tdh*. Minimalna sekwencja kodująca ORF *yibD* została sklonowana w ściśle regulowanym systemie ekspresyjnym. Na podstawie zaprezentowanej funkcji (modyfikacja rdzenia spowodowana dodaniem kwasu heksuronowego), ORF *yibD* oznaczono jako *waaH*. Przewidywany skład aminokwasowy tej glikozylotransferazy wskazuje, że jest to polipeptyd o 344 resztach aminokwasowych. Po łagodnej indukcji i frakcjonowaniu komórkowym, a następnie oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa stwierdzono, że WaaH jest związane z błoną wewnętrzną. Poszukiwanie homologii z wykorzystaniem wielu różnych baz danych wykazało, że przewidywana sekwencja aminokwasowa WaaH ma prawie 20% identyczność z sekwencją WabO z *Klebsiella pneumoniae*. Pokazano, że WabO jest glikozylotransferazą specyficzną dla inkorporacji GalA w LPS *K. pneumoniae* (Fresno *et al.*, 2007).

Następnie zostały skonstruowane niepolarne, w ramce odczytu mutanty delecyjne *waaH*. W wyniku analizy LPS, uzyskanego z mutantą $\Delta waaH$, zaobserwowano całkowity brak pików masowych, posiadających modyfikacje przez GlcUA (dodanie 96 lub 176,1 jednostek masowych). Kluczowe piki masowe o 4298,9 Da, 4489,9 Da i 4612,9 Da są nieobecne w LPS z mutantą $\Delta waaH$. Są to te same piki

masowe, których brak jest w LPS z mutantu $\Delta phoB$, ale są obecne w LPS z izogenicznego szczepu dzikiego. Analiza MS/MS pojedynczych pików masowych o 4298,9 Da i 4489,9 Da wykazała widma fragmentacji z przewidywanym GlcUA przyłączonym do heptozy rdzenia wewnętrznego. Metoda GLC-MS potwierdziła brak GlcUA w LPS ze szczepu $\Delta waaH$, a jego obecność w szczepie typu dzikiego. Brakujące przyłączenie GlcUA w mutancie $\Delta waaH$ zostało całkowicie przywrócone poprzez wprowadzenie sklonowanego genu *waaH*, ulegającego ekspresji ze ściśle kontrolowanego promotora *ptac*.

W celu dalszego wykazania, że gen *waaH* jest genem strukturalnym dla transferazy GlcUA, został skonstruowany mutant $\Delta waaH$ *E. coli* B. Analiza jego LPS nie wykazała obecności żadnych pików masowych, odpowiadających modyfikacjom przez GlcUA, które występowały w izogenicznym szczepie dzikim. Co ciekawe, w przeciwieństwie do *E. coli* K-12, w szczepie *E. coli* B BL21(DE3) stwierdzono konstytutywną indukcję regulonów BasS/R i PhoB/R nawet w pożywce LB. Odzwierciedlały to piki masowe reprezentujące inkorporacje L-Ara4N i *P*-EtN w lipidzie A oraz GlcUA w rdzeniu. Do analizy LPS wykorzystano następną łagodną nadekspresję genu *waaH* sklonowanego pod promotorem polimerazy T7 w szczepie BL21 $\Delta waaH$. Również bez głodu fosforanowego w szczepie tym występowały najbardziej charakterystyczne piki masowe z inkorporacją GlcUA. Wszystkie te wyniki wskazują, że WaaH jest wymagane do włączenia GlcUA w szczepach *E. coli* K-12 i *E. coli* B.

GlcUA w szczepach *E. coli* o innych typach rdzenia oraz w szczepach *Salmonella* - Analiza sekwencji genomowych szczepów *E. coli* o innych typach rdzenia oraz szczepów *Salmonella* wykazała, że wszystkie one zawierają gen *waaH*. Jednakże do momentu publikacji niniejszej pracy nie zanotowano obecności GlcUA u *Salmonella* czy u *E. coli*. Aby zidentyfikować warunki, w których można zaobserwować inkorporację GlcUA, do wzrostu *E. coli* i *Salmonella* zastosowaliśmy pożywkę z dodatkiem metawanadanu amonu (NH_4VO_3). NH_4VO_3 jest niespecyficznym inhibitorem fosfataz (Zhou *et al.*, 1999), który potencjalnie indukuje wiele różnych systemów dwuskładnikowych. LPS wyizolowaliśmy ze szczepu dzikiego *E. coli* K-12, z przedstawicieli z rdzeniem typu R1, R2, R3 i R4 oraz ze szczepu *Salmonella minnesota* R345. Piki masowe, wskazujące na inkorporacje GlcUA, zaobserwowano we wszystkich przypadkach z wyjątkiem szczepów z rdzeniem typu R1 i R3. Obecność GlcUA w LPS została potwierdzona za pomocą analizy GLC-MS poprzez zastosowanie porównania ze standardem kwasu hialuronowego.



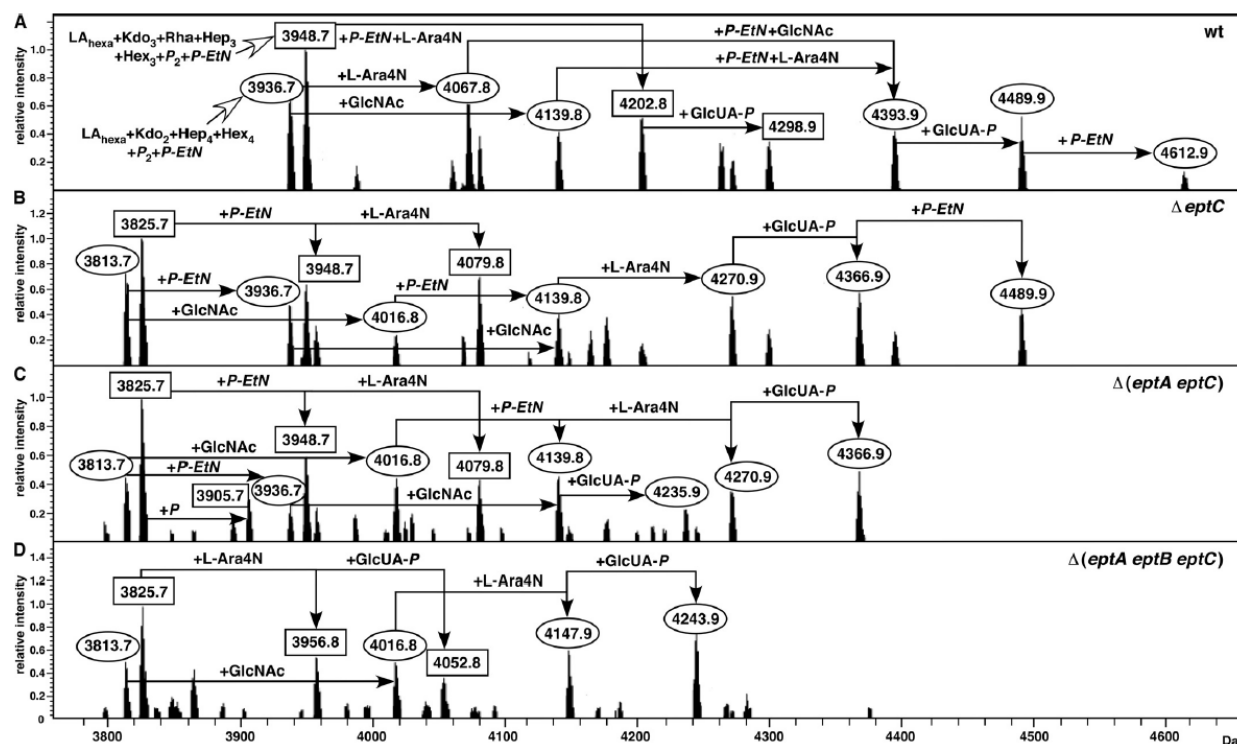
Rys. 6. Aktywność promotora *waaH* wymaga indukcji systemu dwuskładnikowego PhoB/R.

Jednakże transkrypcja z promotora *ugd* wymaga zarówno aktywacji PhoB/R, jak

i BasS/R. Taką podwójną kontrolę przez wymienione systemy dwuskładnikowe zapewnia UDP-kwas glukuronowy, będący prekursorem dla syntezy GlcUA i L-Ara4N. Transkrypcja promotora genu *ugd* jest misternie wyważona, ponieważ BasS/R reguluje syntezę L-Ara4N (udział w modyfikacji lipidu A), a PhoB/R kontroluje zmiany w rdzeniu LPS, obejmujące transfer GlcUA.

Gen *eptC* jest wymagany do dodania *P*-EtN do HepI rdzenia wewnętrznego LPS - LPS *E. coli* K-12 często zawiera niestechiometryczne substytucje przez reszty *P*-EtN. Podstawienia *P*-EtN mogą wystąpić w lipidzie A, na drugiej reszcie Kdo, jak również na HepI rdzenia wewnętrznego. Dodanie *P*-EtN do Kdo wymaga produktu genu *eptB*, zaś w inkorporację *P*-EtN do lipidu A zaangażowany jest gen *eptA*, który jest indukowany przez BasS/R. Natomiast gen odpowiedzialny za dodanie *P*-EtN do HepI oraz jego regulacja, nie były znane u *E. coli*. W oparciu o analizę metodą spektrometrii masowej LPS uzyskanego z szeregu różnych izogenicznych szczepów, wzrastających w warunkach z ograniczoną ilością fosforanów, można było zaobserwować piki masowe z przewidywaną obecnością wszystkich trzech reszt *P*-EtN. *E. coli* posiada trzy dodatkowe ortologii EptA i EptB. Są one kodowane przez ORF oznaczone jako *ybiP*, *yhjX*, and *yijP*. Zostały skonstruowane pojedyncze delecyjne pochodne trzech ORF, które następnie były łączone albo z pojedynczą delecją genu *eptA*, albo genu *eptB*, albo z jednoczesną kombinacją obu tych delecji. Spośród trzech delecji powyższych ORF, szczep z usuniętym genem *yijP* charakteryzował się LPS nieposiadającym pików masowych z trzema resztami *P*-EtN (4612,9 Da) (Rys. 7B). W związku z tym gen ten oznaczono jako *eptC*.

Zgodnie z wymogiem EptC do transferu *P*-EtN, LPS ze szczepów o kombinacjach delecji $\Delta(eptA\ eptC)$, $\Delta(eptB\ eptC)$ i $\Delta(eptA\ eptB)$ posiadał tylko jedną substytucję przez *P*-EtN. Główną, uderzającą różnicą między widmami masowymi LPS otrzymanego z mutantów $\Delta eptC$ i $\Delta(eptA\ eptC)$ jest obecność tylko jednej reszty *P*-EtN w LPS ze szczepu $\Delta(eptA\ eptC)$ w porównaniu z dwoma podstawieniami przez *P*-EtN w LPS z mutantu $\Delta eptC$. Zgodnie z powyższymi wynikami, LPS ze szczepu $\Delta(eptA\ eptB\ eptC)$ nie miał żadnych pików masowych z przewidywaną inkorporacją *P*-EtN (Rys. 7). Co ciekawe, LPS uzyskany ze szczepu $\Delta(eptA\ eptB\ eptC)$, pozbawionego wszystkich trzech genów *ept*, posiada piki masowe odpowiadające inkorporacji L-Ara4N i GlcUA (Rys. 7D). Tak więc brak transferaz *P*-EtN nie ma wpływu na obecność innych niestechiometrycznych modyfikacji. W związku z tym LPS ze szczepu $\Delta eptC$ nie wykazuje żadnych innych znaczących różnic ani w akumulacji różnych glikoform ani



Rys. 7. Inkorporacja *P*-EtN na HepI wymaga funkcjonalnej obecności genu *eptC*. w kompozycji lipidu A. Stąd możemy stwierdzić, że funkcja EptC jest specyficzna dla inkorporacji *P*-EtN do ufosforylowanej HepI, ponieważ dwie

inne znane transferazy *P*-EtN mają inną specyficzność.

Regulacja genu *eptC* - W poprzednich pracach (Klein *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2011) wykazano, że dodanie *P*-EtN do HepI nie jest regulowane przez indukcję ani RpoE ani systemu BasS/R. Wiadomym jest, że transkrypcja genu *eptA* wymaga indukcji BasS/R (modyfikacja lipidu A), natomiast gen *eptB*, którego produkt jest wymagany do dodania *P*-EtN do drugiej reszty Kdo, jest regulowany przez RpoE (Reynolds *et al.*, 2005, Klein *et al.*, 2009). A zatem został zanalizowany szczep $\Delta(eptB\ basR)$, gdyż powinna być odzwierciedlona w nim aktywność genu *eptC* niezależna od systemu dwuskładnikowego BasS/R. Analiza LPS uzyskanego ze szczepu $\Delta(eptB\ basR)$ w warunkach indukujących PhoB/R pokazała, że posiada on jedną resztę *P*-EtN na ufosforylowanej HepI. Wyniki te sugerują, że indukcja PhoB/R odgrywa kluczową rolę w transkrypcyjnej aktywacji genu *eptC*. W celu głębszego zbadania regulacji genu *eptC*, została skonstruowana pojedyncza, chromosomalna fuzja transkrypcyjna *eptC-lacZ*. Pomiar aktywności β -galaktozydazy wykazał, że była ona około 6-krotnie wyższa w pożywce ubogiej w fosforan niż w pożywce M9 bogatej w fosforan. Co interesujące, aktywność fuzji promotorowej *eptC-lacZ* w szczepie $\Delta phoB$ była znacznie zredukowana. Tym bardziej było to widoczne, gdy pożywka była pozbawiona jonów Zn^{2+} . Natomiast aktywność *eptC-lacZ* była tylko dwukrotnie zredukowana w mutancie $\Delta basR$ w porównaniu z ponad 4- do 5-krotną redukcją w szczepie $\Delta phoB$. Potwierdza to wyniki uzyskane z analizy LPS, że główny, pozytywny regulator transkrypcji *eptC* jest PhoB-zależny. Ponieważ aktywność fuzji *eptC-lacZ* nie była całkowicie zniesiona w mutancie $\Delta phoB$, sugerowało to, że jest obecna konstytutywna, podstawowa aktywność transkrypcyjna, która jest niezależna zarówno od PhoB, jak i od BasR. Wyniki te dodatkowo potwierdza obecność w szczepie $\Delta(eptB\ phoB\ basR)$ kilku pików masowych z przewidzianą inkorporacją *P*-EtN. Co ciekawe, wyniki te również pokazują, że indukcja genu *eptC* u *E. coli* K-12 nie wymaga aktywacji BasS/R.

EptC jest wymagane do funkcjonowania błony zewnętrznej - Jako że główną funkcją LPS jest zapewnienie bariery przepuszczalności, stosując szczepy z delecjami genów *ept* postanowiliśmy zbadać potencjalną rolę modyfikacji LPS przez niestechiometryczne substytucje *P*-EtN. Szczep $\Delta eptC$ wykazywał silne defekty wzrostu w obecności niskich stężeń SDS (0,25%) ze zmniejszoną zdolnością (10^3) tworzenia kolonii. Przy takim stężeniu SDS szczep typu dzikiego oraz jego izogeniczne pochodne $\Delta eptB$ i $\Delta eptA$ nie wykazywały żadnych defektów wzrostu. Przy wyższych stężeniach SDS (1%), zdolność tworzenia kolonii w mutancie $\Delta eptC$ była zredukowana (10^5), aczkolwiek nie zaobserwowano żadnego znaczącego efektu na żywotność szczepu typu dzikiego czy też innych mutantów *ept*. Ponieważ ekspresja genu *eptC* zwiększa się w obecności jonów Zn^{2+} , również zbadaliśmy, czy EptC jest wymagane do tolerancji na zwiększone stężenie Zn^{2+} . Mimo, że bakterie typu dzikiego mogą wzrastać aż do stężenia $200\ \mu M\ Zn^{2+}$, wzrost mutantu $\Delta eptC$ był wysoce atenuowany, nawet przy stężeniu $150\ \mu M\ Zn^{2+}$. I ponownie, tak jak w przypadku wrażliwości na SDS, mutant $\Delta eptC$ był wrażliwy na Zn^{2+} , natomiast mutanty $\Delta eptB$ i $\Delta eptA$ nie były wrażliwe. Interesującym jest to, że mutacja $\Delta eptB$ była zdolna do supresji fenotypu wrażliwości na Zn^{2+} szczepu $\Delta eptC$. Jednakże takiej supresji nie zaobserwowano w przypadku kombinacji $\Delta(eptA\ eptC)$.

Podsumowanie, wnioski i znaczenie otrzymanych wyników opisanych w pracy Klein *et al.*, 2013 - W pracy tej zostały zanalizowane genetyczne i strukturalne podstawy niestechiometrycznych zmian w rdzeniu wewnętrznym LPS bakterii *E. coli*. Po raz pierwszy zademonstrowano inkorporację β GlcUA jako nową modyfikację HepIII. Ponadto został zidentyfikowany nowy gen, oznaczony *waaH*, którego produkt jest odpowiedzialny za włączenie β GlcUA do LPS. W równoległych doświadczeniach zbadano modyfikację przez *P*-EtN ufosforylowanej HepI oraz jej fizjologiczne znaczenie. Odpowiedzialna za to transferaza *P*-EtN została zidentyfikowana i oznaczona EptC.

Przyporządkowanie strukturalne GlcUA zostało oparte na analizie oczyszczonego oligosacharydu ze szczepu *E. coli* B. Na wybraniu niniejszego szczepu zaważyło to, iż budowa jego LPS jest mniej złożona w porównaniu z LPS z *E. coli* K-12 i łatwo można badać występowanie niestechiometrycznych modyfikacji lipidu A oraz rdzenia. W analizie GLC-MS wzór fragmentacji i czas retencji derywatyzowanego kwasu heksuronowego był identyczny ze standardowym GlcUA z kwasu hialuronowego. Analiza NMR wykazała, że β GlcUA był przyłączony do O-7 Hep łańcucha bocznego. Poza tym była nieobecna reszta fosforanowa powszechnie spotykana w pozycji O-4 środkowej Hep.

Aby zrozumieć strukturalne i regulacyjne podstawy inkorporacji GlcUA, wykazano, że GlcUA jest specyficznie wbudowywany do LPS *E. coli* K-12 w warunkach ubogich w fosforan. Dołączenie to

wymaga obecności HepII, a także aktywacji systemu PhoB/R i jednocześnie jest niezależne od BasS/R. Gen kodujący glikozylotransferazę odpowiedzialną za inkorporację GlcUA został zidentyfikowany i oznaczony *waaH*. LPS uzyskany ze szczepów *E. coli* K-12 bądź *E. coli* B pozbawionych genu *waaH* nie posiadał GlcUA, a jego inkorporacja może zostać przywrócona, jeśli dziki typ genu *waaH* jest dostarczony z plazmidu.

Powyższe badania wykazały, że transkrypcja genu *waaH* jest pozytywnie regulowana przez system dwuskładnikowy PhoB/R w sposób zależny od fazy wzrostu. Jest to skoordynowane z transkrypcją genu *ugd*, wyjaśniając tym samym genetyczne podstawy omawianej modyfikacji. Pokazano ponadto, że dodanie niespecyficznego inhibitora fosfataz NH_4VO_3 do pożywki bogatej w fosforan również indukuje modyfikację LPS przez substytucję GlcUA. Stosując pożywkę uzupełnioną NH_4VO_3 , GlcUA także stwierdzono w preparatach LPS uzyskanych z *Salmonella*, jak i z *E. coli* o rdzeniu typu R2 i R4. Ponieważ geny *waaQ* i *waaH* są obecne w szczepach *E. coli* o wszystkich typach rdzenia oraz u kilku członków *Enterobacteriaceae*, takich jak *Salmonella* i *Shigella*, możemy spekulować, że LPS modyfikowany przez GlcUA powinien być obecny w powyższych bakteriach. Jest dość prawdopodobnym, że *waaH*-zależna inkorporacja GlcUA ma adaptacyjne znaczenie w warunkach wzrostu takich jak głód fosforanowy, który może naturalnie występować u bakterii rosnących na zewnątrz żywiciela. W przypadku *E. coli* K-12, mutanty $\Delta waaH$, w połączeniu z delecją *arnT*, okazały się być bardziej wrażliwe na Fe^{3+} . Jest to interesujące, gdyż inkorporacja zarówno GlcUA, jak i L-Ara4N wymaga Ugd-zależnej syntezy UDP-kwasu glukuronowego.

W pracy tej zostało podkreślone, że fosforylacja HepII wymaga uprzedniej inkorporacji HepIII pośredniczonej przez WaaQ. Wysunęliśmy sugestię, że dołączenie GlcUA uniemożliwia WaaY-pośredniczoną fosforylację HepII lub obecność ujemnie naładowanego GlcUA jest niekompatybilna z występowaniem dodatkowej, ujemnie naładowanej reszty na HepII. Co więcej wykazano, że nieufosforylowana HepII jest *in vivo* lepszym substratem do inkorporacji GlcUA, ponieważ modyfikacja ta była wysoce preferowana w mutancie *waaY*. Taka właśnie inkorporacja GlcUA, kosztem fosforanu, może mieć zarówno wartość strukturalną, jak i może być mechanizmem kompensacyjnym w celu odzyskania ujemnego naładowania przez dodanie kwasowego cukru. W ten sposób WaaH-pośredniczone podstawienie GlcUA, wykluczające fosforylację HepII, zostało wyjaśnione na podstawie substratowej preferencji i ważności utrzymania wypadkowego ładunku ujemnego.

Biosynteza rdzenia wewnętrznego LPS, obejmująca fosforylację HepI oraz dodanie *P*-EtN, ma kluczowe znaczenie dla przepuszczalności błony zewnętrznej. Uprzednio zajmowano się rolą WaaP, jednakże gen kodujący transferazę *P*-EtN nie został opisany u *E. coli*. W niniejszej pracy wykazaliśmy, że gen kodowany przez OFR *yijP* jest odpowiedzialny za transfer *P*-EtN do ufosforylowanej HepI. Gen ten został oznaczony *eptC*. Analiza spektrometrią masową LPS uzyskanego z mutantu $\Delta eptC$ pokazała niestechiometryczną inkorporację *P*-EtN w lipidzie A i jedynie brak substytucji *P*-EtN specyficznej dla rdzenia. Ponadto analiza MS/MS izolowanych pików masowych ze szczepu $\Delta(eptA eptC)$ z przewidywaną substytucją *P*-EtN jednoznacznie pokazała, że *P*-EtN była tylko obecna na Kdo. Modyfikacja Kdo przez *P*-EtN zależy jedynie od EptB i dlatego uznaliśmy, że funkcja EptC jest dedykowana modyfikacji HepI przez *P*-EtN. Potwierdzeniem tych wniosków było to, że piki masowe wskaźnikowe dla modyfikacji przez *P*-EtN były nieobecne w widmach LPS uzyskanego ze szczepu $\Delta(eptA eptB eptC)$. W pracy tej również zostało pokazane, że PhoB/R pozytywnie reguluje EptC-zależną inkorporację *P*-EtN, chociaż modyfikacja przez *P*-EtN może występować też na poziomie podstawowym bez potrzeby wymagania indukcji systemów regulatorowych. Jeśli chodzi o fizjologiczne znaczenie inkorporacji *P*-EtN przez EptC na ufosforylowanej HepI to jest ona niezbędna do odporności na różnorodne czynniki, które destabilizują błonę zewnętrzną jak SDS, czynniki chelatujące jak EDTA oraz poddanie działaniu subletalnych stężeń Zn^{2+} . Stwierdzenie to było oparte o wyniki badań, które wskazują, że spośród mutantów *ept* tylko mutant *eptC* wykazuje wrażliwość na łagodne dodanie detergentów, takich jak SDS, jak również na subletalne stężenia Zn^{2+} w pożywce.

V. Składanie lipopolisacharydu u *Escherichia coli* wymaga koniecznego do życia białka szoku termicznego LapB

Wprowadzenie

U bakterii, takich jak *E. coli*, występuje około 2×10^6 cząsteczek LPS, które pokrywają 75% powierzchni komórki. Szacuje się, że bakterie te syntetyzują prawie 70 000 cząsteczek LPS na minutę (Nikaido, 1996). LPS jest obecny wyłącznie w części zewnętrznej błony zewnętrznej, a ponieważ synteza LPS odbywa się w cytoplazmie, stąd konieczność efektywnej translokacji LPS oraz sprzężenia pomiędzy dwoma procesami zachodzącymi przed translokacją: biosyntezą LPS i jego składaniem przy błonie wewnętrznej. Koordynacja powyższych procesów nie była dotychczas przedmiotem badań ze względu na złożoność przebiegu biosyntezy i translokacji LPS, które wymagają ponad 50 białek. Nie została również opisana żadna molekularna kontrola zapewniająca to, że tylko całkowicie zsyntetyzowany LPS ulega translokacji, przy jednoczesnym zapobieganiu translokacji form prekursorowych LPS. Proporcja pomiędzy LPS a fosfolipidami podlega precyzyjnej regulacji i jest utrzymywana w stosunku 0,15:1 (Nikaido, 1996). Każde zaburzenie równowagi ilości LPS i fosfolipidów jest toksyczne i powoduje obumieranie komórek. Co ważne, w biosyntezie LPS i w biosyntezie fosfolipidów wykorzystywany jest ten sam wspólny prekursor (*R*)-3-hydroksymirystynian. W celu utrzymania równowagi pomiędzy LPS i fosfolipidami, a tym samym umożliwienia zrównoważonego wzrostu, ilości białek FabZ i LpxC są *in vivo* ściśle skorelowane. Zasadniczym punktem kontrolnym, który zapewnia balans pomiędzy LPS i fosfolipidami, jest regulowana *in vivo* proteoliza białka LpxC. LpxC jest odpowiedzialne za pierwszy, nieodwracalny etap w biosyntezie LPS. LpxC jest niestabilnym enzymem, a jego ilość jest regulowana przez proteolizę pośredniczoną przez FtsH. Jednakże *in vitro* proteoliza pośredniczona przez FtsH jest dość nieefektywna i prawdopodobnie wymaga dodatkowych czynników, które kontrolują reakcję proteolizy. Również było nieznanym, jak na poziomie molekularnym są współregulowane ilości oraz aktywności białek LpxC i FabZ. Tak więc w niniejszej pracy, wykorzystując narzędzia genetyczne i biochemiczne, podjęto się rozwiązania fundamentalnych kwestii dotyczących: regulacji ilości LPS, pełnej biosyntezy LPS poprzedzającej jego translokację oraz sprzężenia syntezy LPS z translokacją.

Pierwszym etapem znalezienia na poziomie genetycznym molekularnej kontroli składania LPS było przewidywanie, że geny, w których wszelkie mutacje mogą blokować powyższy proces, a mutacje utraty funkcji prowadzą do masowej indukcji odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej, mają kluczowe znaczenie dla żywotności bakterii. Przypuszczenie to było oparte na naszych badaniach, które ustaliły, że poważne zaburzenia w biosyntezie LPS, gdy bakteria syntetyzuje LPS będące pochodnymi tylko Kdo₂-lipidu IV_A lub tylko lipidu IV_A, prowadzą do toksycznej indukcji szlaków RpoE i Cpx (Klein *et al.*, 2009). Mutacje, zmapowane w locus 28', które w podobny sposób powodowały silną indukcję szlaków RpoE i Cpx, uprzednio wielokrotnie zidentyfikowaliśmy w naszym laboratorium. Jednakże produkty genów, w których występowały powyższe mutacje, nie były związane ani ze znanymi białkami systemu translokacji Lpt, ani z białkami biosyntezy LPS, ani z peryplazmatycznymi czynnikami fałdowania białek. Charakterystyka omawianych mutacji wykazała, że ich locus składa się z dwóch genów, których transkrypcja jest regulowana przez podjednostkę sigma szoku cieplnego RpoH. Geny te oznaczono *lapA* i *lapB*. Spośród nich gen *lapB* okazał się być niezbędny dla wzrostu bakterii w standardowych warunkach hodowli laboratoryjnej i mógł być usunięty tylko w pożywce minimalnej w temperaturze 30°C, ale nie powyżej niej. Takie mutanty $\Delta lapB$ syntetyzowały nadmierną ilość LPS, w której znaczną część stanowiły formy prekursorowe. Badania biochemiczne dowiodły, że białka LapA i LapB mogą łączyć syntezę LPS z jego translokacją, ponieważ współuczyszczą się one z wczesnymi glikozylotransferazami oraz z kompleksem Lpt, którego komponenty przechodzą przez wszystkie przedziały części pozacytoplazmatycznej komórki. Na podstawie niezbitych dowodów zaproponowaliśmy, że białko LapB razem z proteazą FtsH reguluje ilość LpxC. W procesie tym LapB służy jako białko-rusztowanie w błonie wewnętrznej, które reguluje zakończenie biosyntezy LPS przed jego translokacją. Co więcej, białka LapA i LapB współuczyszczą się z LPS. Zgodnie z powyższą konkluzją zaobserwowano, że w mutantach $\Delta lapB$ wiele biosyntetycznych enzymów specyficznych dla LPS albo jest nieprawidłowo sfałdowanych albo ulega agregacji, powodując jednocześnie dysfunkcję systemu Lpt, na co wskazuje zmniejszona ilość LptD w błonie zewnętrznej.

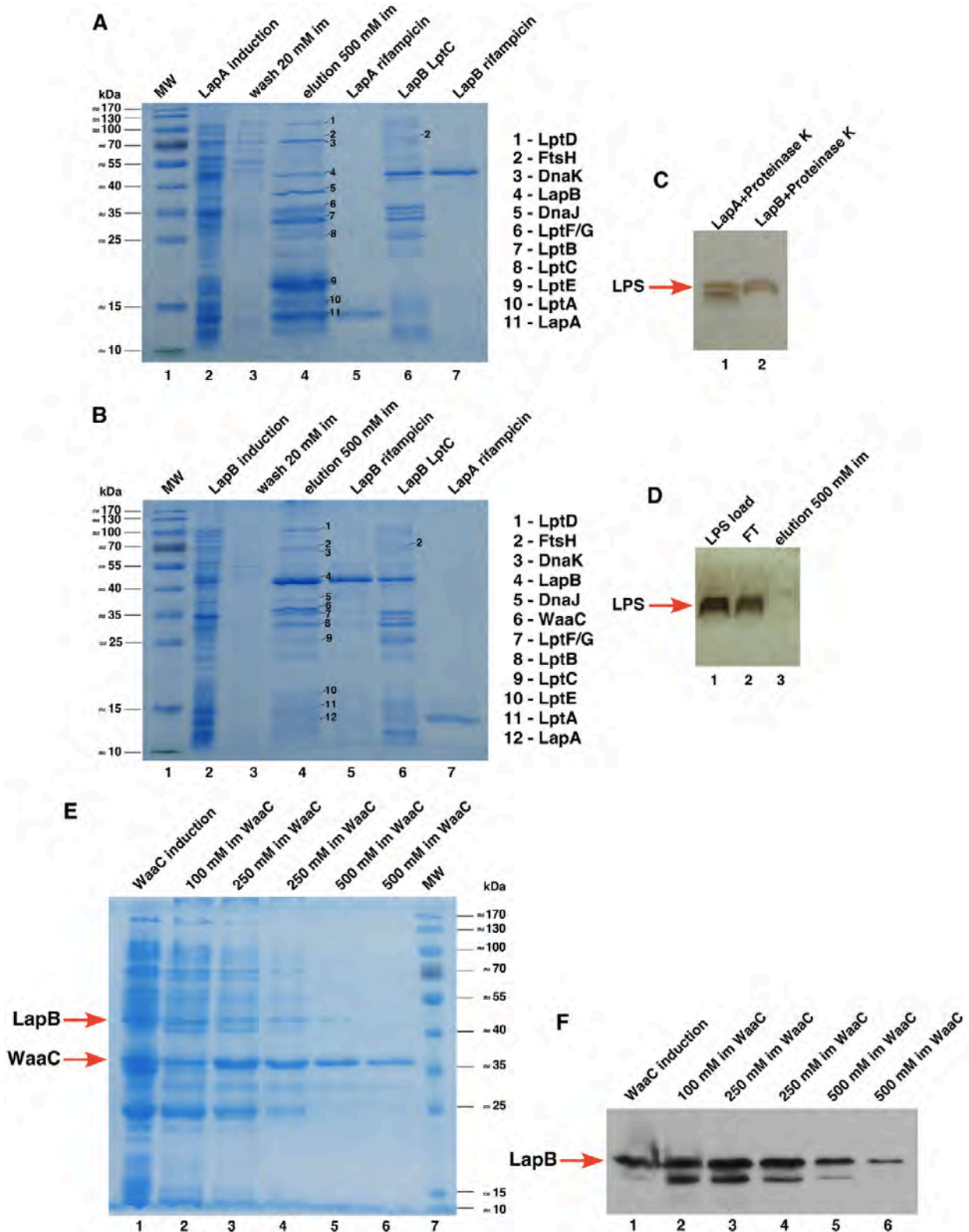
Niezbędny do życia gen *lapB* jest genem szoku cieplnego i ulega ko-transkrypcji z genem *lapA* - Jak

pokazano w Klein *et al.*, 2009, znaczące defekty w biosyntezie LPS powodują indukcję pozacytoplazmatycznych odpowiedzi stresowych zależnych od RpoE i Cpx ze znaczącą utratą właściwości wzrostu. W pracy Klein *et al.*, 2014, rozszerzyliśmy powyższy temat badawczy, którego głównym celem było poznanie czynników wymaganych w składaniu LPS. Jak wcześniej wspomniano, identyfikacja w naszym laboratorium mutacji zmapowanych w locus 28', powodujących indukcję odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej oraz zaburzenia w przepuszczalności błony zewnętrznej, sugerowała rolę produktów genowych z tego locus w składaniu LPS lub w translokacji LPS. Jednakże uprzednio żadna z funkcji nie została przypisana powyższym produktom genowym. W niniejszej pracy wykazano, że omawiane mutacje zostały zmapowane w dwóch genach o nieznannej funkcji: *yciS* i *yciM*. Ponieważ pokazaliśmy, że produkty tych genów odgrywają ważną rolę w składaniu LPS, oznaczyliśmy je jako geny *lapA* i *lapB*. Zostało skonstruowanych wiele pochodnych delecyjnych wspomnianych genów, a delecje poddano transdukcji w różnych temperaturach do różnorodnych, dobrze scharakteryzowanych, powszechnie używanych szczepów typu dzikiego w obecności lub przy braku komplementujących plazmidów. Analiza powyższych konstruktów genetycznych wykazała, że $\Delta lapB$ i $\Delta(lapA lapB)$ bez supresorów mogą być skonstruowane tylko w szczepie BW25113 w pożywce minimalnej M9 w temperaturze 30°C, ale nie w temperaturze 37°C lub powyżej niej. Ale nawet w temperaturze 30°C szczepy $\Delta lapB$ i $\Delta(lapA lapB)$ wykazywały zaburzenia wzrostu. Mutacje $\Delta lapB$ i $\Delta(lapA lapB)$ mogły być poddane transdukcji do szczepów W3110 i BW20207 tylko w obecności komplementujących plazmidów. W przeciwieństwie do tego szczep $\Delta lapA$ może być skonstruowany we wszystkich tłach genetycznych z prawidłową częstotliwością i wykazuje zaburzenia wzrostu tylko w temperaturze 43°C i powyżej niej. Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że gen *lapB* jest niezbędny do żywotności bakterii w standardowych warunkach hodowli laboratoryjnej, a jego usunięcie powoduje szereg znaczących zaburzeń wzrostu.

Wcześniejsze badania w naszym laboratorium wykazały zwiększoną transkrypcję genu *lapB* w wysokiej temperaturze (Murata *et al.*, 2011). Stąd w niniejszej pracy za pomocą analizy 5' RACE badaliśmy transkrypcyjną regulację tego genu przy wykorzystaniu RNA uzyskanego z temperatury 30°C i po krótkim przeniesieniu do temperatury 42°C. Wyniki badań pokazały, że transkrypcja genów *lapA* i *lapB* jest inicjowana z trzech promotorów oznaczonych P1, P2_{hs} i P3. Spośród nich transkrypcja z promotora P2_{hs} jest specyficznie indukowana w wysokiej temperaturze, a elementy promotorowe -10 i -35 przypominają sekwencje konsensusowe promotorów szoku termicznego, regulowanych przez RpoH. Dwa kolejne promotory, P1 i P2, są podobne do promotorów rozpoznawanych przez główną podjednostkę sigma RpoD. Region -10 promotora P3 posiada rozbudowany element -10 (motyw TGG), a promotor P1 jest zlokalizowany powyżej genu *pgpB*. Inicjacja transkrypcji z promotora P1 sugeruje sprzężenie transkrypcji *lapAB* z syntezą fosfolipidów, jako że gen *pgpB* koduje fosfatazę fosfatydyloglicerofosforanową.

Regulacja genów *lapAB* przez szok termiczny została dodatkowo potwierdzona przez pomiar aktywności jednokopijnej fuzji promotorowej P2_{hs}-*lacZ* oraz przez pomiar poziomu LapA-FLAG i LapB-FLAG w temperaturze 30°C i po przeniesieniu do temperatury 42°C. Wyniki powyższych doświadczeń pozwoliły nam stwierdzić, że transkrypcja genów *lapA* i *lapB* posiada przebieg klasycznej indukcji szoku termicznego, po której następuje typowe nagłe wygaszenie indukcji. Wzór opisanej indukcji porównywalny jest z indukcją dobrze poznanych genów operonu *groESL*.

Mutanty $\Delta lapB$ i $\Delta rpoH$ posiadają zaburzenia w biogenezie LPS - Analiza LPS wykazała, że w mutancie $\Delta lapB$ jest więcej LPS niż w rodzicielskim szczepie dzikim. Obecność zaś szybciej migrujących form LPS odzwierciedla występowanie niedojrzałych form LPS. Wykorzystanie spektrometrii masowej do badania LPS otrzymanego ze szczepu typu dzikiego oraz z izogenicznej pochodnej $\Delta lapB$ hodowanych w permissywnych warunkach wzrostu w temperaturze 30°C w pożywce M9 i w pożywce 121 ubogiej w fosforan wykazało istotne różnice takie jak (i) duży wzrost całkowitej heterogeniczności LPS ze szczepu $\Delta lapB$. (ii) Nagromadzenie w szczepie $\Delta lapB$ wielu pików masowych odpowiadających: strukturze LPS składającej się z Kdo₂-lipidu A, intermediom z różnymi wariantami skróconego rdzenia i kilku pikom kompletnego LPS. (iii) W widmach LPS ze szczepu $\Delta lapB$ również obecność pików masowych, odpowiadających akumulacji pentaacylowanych pochodnych lipidu A. Wyniki te wskazują, że nawet w warunkach permissywnego wzrostu delecja genu *lapB* powoduje zwiększenie ilości LPS, którego kompozycja pokazuje zaburzenia w biosyntezie lipidu A oraz rdzenia LPS. Ponieważ wprowadzenie do mutantu $\Delta lapB$ dzikiego typu genu *lapB* sklonowanego



Rys. 8. Współczyszczanie LapA i LapB z białkami Lpt.

defektywne zmiany w LPS ze szczepu $\Delta lapB$ są spowodowane wyłącznie brakiem funkcji białka LapB, a nie obecnością jakichkolwiek ekstragenowych supresorów.

Ponieważ geny *lapA* i *lapB* są ko-transkrybowane, a jeden z ich promotorów jest regulowany przez RpoH, również został zanalizowany LPS ze szczepów $\Delta lapA$ i $\Delta rpoH$. LPS ze szczepu $\Delta lapA$ także

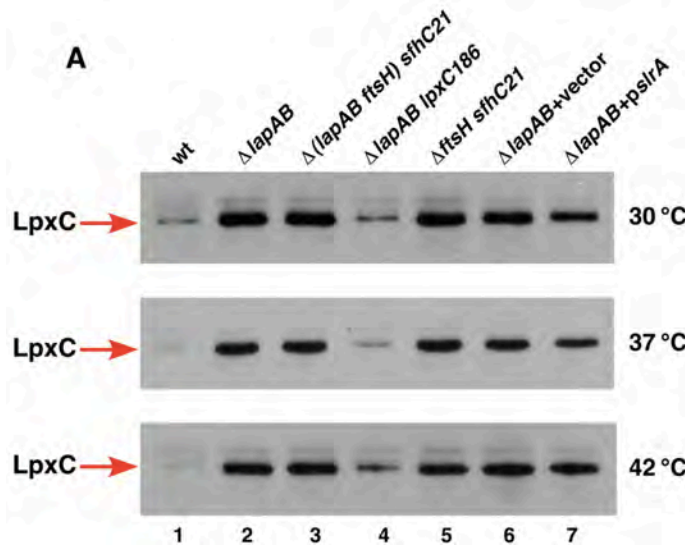
posiadał kilka pochodnych prekursorów, ale defekty nie były tak dotkliwe, zgodnie z występowaniem tylko niewielkich zaburzeń wzrostu opisywanego mutantu bakteryjnego. Natomiast LPS uzyskany ze szczepu $\Delta rpoH$, hodowanego w warunkach permissywnego wzrostu, zawierał kilka pochodnych prekursorowych, które były również obecne w LPS ze szczepu $\Delta lapB$. Wyniki te są spójne z faktem, że transkrypcja operonu *lap* jest pośredniczona przez RpoH.

Ponieważ LPS ze szczepu $\Delta lapB$ zawierał wiele pentaacylowanych pochodnych, lipid A został również zbadany poprzez analizę spektrometrią masową. Analiza ta potwierdziła, że występowała akumulacja pentaacylowanych pochodnych LPS nieobecnych w szczepie dzikim. Co ciekawe, lipid A ze szczepu $\Delta lapB$ także posiada nietypowe heksaacylowane formy powstałe na skutek zastąpienia łańcucha mirystylowego przez łańcuch laurylowy.

Białka LapA i LapB współczyszczą się z transestracytoplazmatycznym kompleksem Lpt - W celu określenia funkcji białek LapA i LapB oraz identyfikacji partnerów oddziaływujących z nimi, białka te zostały oczyszczone. LapA i LapB współczyszczą się ze sobą oraz z kilkoma innymi białkami. Analiza współczyszczanych białek z wykorzystaniem MALDI-TOF ujawniła, że LapA współczyszczą się z białkami: LptE/D, LptBFGC, LptA i DnaK/J (Rys. 8). Podobnie LapB ulegało ko-elucji z tą samą grupą białek Lpt oraz z FtsH i WaaC. Oddziaływanie LapA i LapB z białkami transportu LPS zostało dodatkowo potwierdzone w doświadczeniach, w których LapB i LptC-His-tag były współindukowane, a następnie poddane oczyszczaniu. Wyniki eksperymentów pokazały, że białka LptC i LapB ulegały ko-elucji, a otrzymane frakcje były dodatkowo wzbogacone obecnością białek LapA, LptBFG, DnaJ i LptE/D. Jednoczesna elucja LapB i białek Lpt wykazała, że LapA i LapB są częścią transestracytoplazmatycznego kompleksu Lpt. Współczyszczanie z heptozylotransferazą I i białkami Lpt potwierdza rolę LapB w sprzężeniu syntezy i translokacji LPS. W procesie tym LapA i LapB mogą stanowić strukturę podobną do rusztowania, służącą do składania LPS. Współczyszczanie FtsH z białkiem LapB może być częścią mechanizmu, który kontroluje ilość LpxC.

Oczyszczone białka LapA i LapB zawierają LPS - Ponieważ białka Lap współczyszczą się z białkami translokacji Lpt i z WaaC, aby otrzymać czyste białka LapA i LapB oraz w pełni zbadać ich właściwości wykorzystano ekspresję kodujących je genów z promotora T7 w obecności rifampicyny. Szczególną uwagę zwrócono na zbadanie obecności LPS w czystych preparatach białek LapA i LapB. Tak więc oczyszczone preparaty białek LapA i LapB poddano trawieniu proteinazą K, a następnie przeprowadzono rozdział w żelach SDS-Trycyna. Obecność LPS została ujawniona poprzez metodę barwienia srebrem, która potwierdziła, że czyste preparaty białek LapA i LapB rzeczywiście zawierają LPS. Powyższe wyniki potwierdzają model, według którego LapA i LapB służą w błonie wewnętrznej jako miejsca dokujące do składania LPS.

Akumulacja LpxC w mutantach $\Delta(lapA lapB)$ - Zostały wyizolowane i scharakteryzowane ekstrageniczne mutacje supresorowe delecyjnych szczepów $\Delta lapB$ i $\Delta(lapA lapB)$, które umożliwiają rozwój w niepermissywnych warunkach wzrostu. Trzy mutacje supresorowe zostały zmapowane w genie *lpxC*. Dwie spośród nich posiadały delecję pojedynczego nukleotydu w elemencie -10 promotora genu *lpxC*. Mutacje te obniżały transkrypcję genu *lpxC*. Trzecia mutacja supresorowa była zmianą pojedynczego nukleotydu w pozycji 557 (prowadząc do substytucji Ile-186 przez Asn-186) i została oznaczona *lpxC186*. LpxC jest niestabilnym białkiem, które bardzo szybko ulega proteolizie przez konieczną do życia proteazę FtsH. Z tego też powodu mutanty *ftsH* akumulują duże ilości białka LpxC, co prowadzi do wzrostu ilości LPS, a przez to toksyczności. Niemniej jednak gen *ftsH* można usunąć w obecności mutacji w genie *fabZ*, takich jak *sfhC21*, które przywracają równowagę między fosfolipidami a LPS. Ponieważ wzrost ilości LPS w mutancie $\Delta(lapA lapB)$ naśladuje fenotyp mutantów *ftsH*, zostały zbadane poziomy ilości białka LpxC w izogenicznych mutantach $\Delta lapB$ i $\Delta ftsH$ przy pomocy techniki Western blot (Rys. 9). Niniejsza analiza wykazała, że mutanty $\Delta(lapA lapB)$ i $\Delta ftsH$ *sfhC21* akumulują duże ilości białka LpxC, które w przeciwnym razie jest prawie niewykrywalne w szczepie dzikim (Rys. 9). Zgodnie z izolacją *lpxC186* jako mutacją supresorową, mutant $\Delta(lapA lapB)$ *lpxC186* miał znacznie obniżony poziom LpxC w porównaniu zarówno z mutantem $\Delta(lapA lapB)$, jak i z $\Delta ftsH$ *sfhC21*. Co ważniejsze, mutanty $\Delta(lapA lapB)$ *ftsH* *sfhC21* i $\Delta(lapA lapB)$ *ftsH*⁺ posiadają podobnie podwyższone poziomy LpxC. Stąd też na podstawie powyższych wyników ustalono, że degradacja LpxC pośredniczona przez FtsH wymaga LapB, co wyjaśnia genetyczne wymaganie genu *lapB* oraz jego niezbędność. Zgodnie z toksycznością spowodowaną przez podwyższony poziom LpxC,



Rys. 9. Akumulacja białka LpxC w mutancie $\Delta(lapA lapB)$.

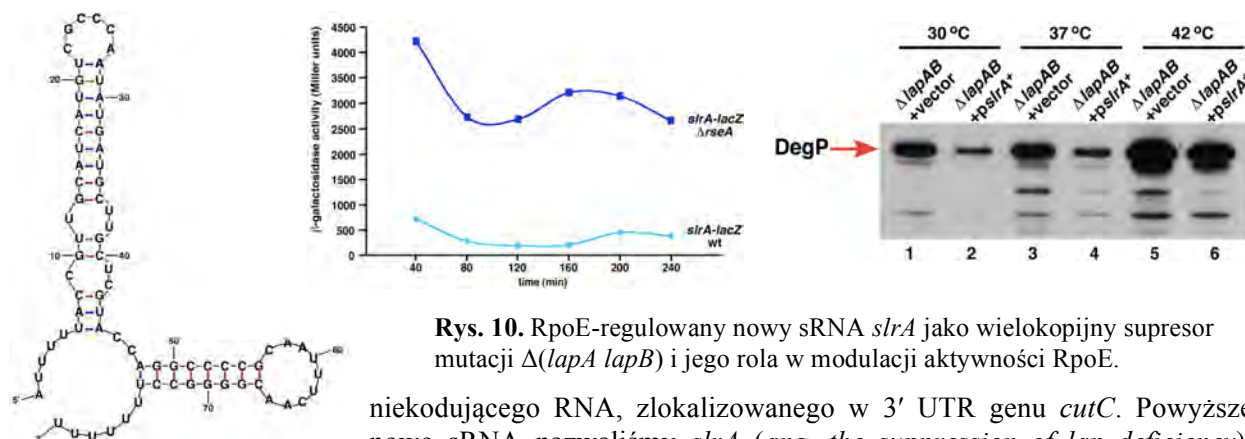
dotychczasowych mutacji supresorowych, oprócz tych w genie *lpxC*, zidentyfikowało mutacje utraty funkcji w operonie *waaQ/G* oraz w genach *gmhA*, *waaC* i *lpp*. *GmhA* jest wymagane do izomeryzacji D-sedoheptulozy 7-fosforanowej do D-glicero-D-manno-heptozy 7-fosforanu, zaś gen *waaC* koduje heptozylotransferazę I. Mutacja supresorowa w genie *waaC* powoduje podstawienie wysoce zachowawczego ewolucyjnie aminokwasu Thr-187 przez Lys-187. Aminokwas Thr-187 białka *WaaC* jest zlokalizowany w miejscu wiązania cukru-nukleotydu. W strukturze krystalicznej kompleksu *WaaC*-ADP β -fosforan oddziałuje z Thr-187, Thr-188 i Lys-192. Analiza spektrometrii masowej LPS z mutantu $\Delta lapB waaC187$ w porównaniu do widma LPS mutantu $\Delta waaC$ ujawniła szereg różnic. LPS szczepu $\Delta lapB waaC187$ posiadał intensywne piki masowe, które odpowiadają $LA_{penta}+Kdo_2$ i $LA_{hexa}+Kdo_2$ z kilkoma pikami masowymi o różnicy 14 Da, wynikającej z polimorfizmu łańcucha węglowego. Podobny polimorfizm łańcucha węglowego odnotowano również u mutantu $\Delta(lapB waaC)$. A zatem w szczepie z mutacją supresorową dochodzi do akumulacji nieparzystych ilości łańcuchów kwasów tłuszczowych, które mogą być substratami dla *LpxC* i *LpxD*, a tym samym przywracać żywotność mutantom $\Delta lapB$. Przywrócenie wzrostu obserwowanego w mutancie $\Delta lapB waaC187$ częściowo można także wyjaśnić zmniejszeniem całkowitej ilości LPS w porównaniu do bardzo podwyższonego poziomu w mutancie $\Delta lapB$. Takie samo uzasadnienie sposobu supresji (obniżenie ilości LPS) można odnieść do częściowego przywrócenia wzrostu mutantów $\Delta lapB$ na skutek wprowadzenia mutacji w genie *gmhA* i w operonie *waaQ/G*.

Wielokopijna supresja ujawnia, że komponenty biosyntezy LPS/fosfolipidów wymagają LapB - Aby zidentyfikować w mutancie $\Delta(lapA lapB)$ czynniki ograniczające, które sprawiają, że funkcja białka *LapB* jest konieczna do życia oraz aby poznać makromolekuły oddziałujące z białkami *LapA/B*, wyizolowaliśmy wielokopijne supresory, które przywracają wzrost powyższego mutantu na pożywce LA w temperaturze 30°C, 37°C lub 42°C. Dzięki temu zidentyfikowaliśmy geny, których produkty są wymagane w biosyntezie fosfolipidów (*fabB*, *fabZ*), przypuszczalnie biorą udział w składaniu LPS (*yceK*) lub w syntezie LPS (*yeaD*), w biosyntezie peptydoglikanu (*murA*, *ydhA*, *yffH*), w regulacji odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej (małe niekodujące sRNA *slrA*, *hicA* i *rscF*) i chaperony (*dnaK* i *dnaJ*). Nadekspresja produktów powyższych genów w różnym stopniu przywraca wzrost mutantom $\Delta(lapA lapB)$ i $\Delta lapB$. Spośród otrzymanych wielokopijnych supresorów bardziej szczegółowo zanalizowaliśmy rolę *SlrA*, *FabZ*, *DnaK/DnaJ* i *YceK*.

Nowy, mały niekodujący RNA *slrA* jako wielokopijny supresor - Przeprowadzone subklonowanie minimalnych fragmentów DNA, które powodowały supresję, doprowadziło do identyfikacji genu *cutC* i położonego powyżej niego 3' UTR, nie wymagającego rejonu promotorowego genu *cutC*. Wyniki te wskazywały na obecność potencjalnego niekodującego regionu w obrębie genu *cutC* i jego sekwencji terminatorowej, które odpowiadały za supresję i mógłby być niekodującym sRNA. Mapowanie końców 5' i 3' mRNA pokazało 307 nt, pierwotny transkrypt, który ulega przetworzeniu do 80-nt dojrzałego,

mutacje, które zmniejszają syntezę lipidu A, takie jak *lpxD36*, *lpxD201* i *lpxA2*, powodują niewielką supresję defektów wzrostu mutantu $\Delta(lapA lapB)$. Dodatkowym potwierdzeniem powyższych wyników było wykazanie, że ten sam allel *sfhC21* genu *fabZ*, który umożliwił delecję genu *ftsH*, może powodować supresję letalnego fenotypu mutantu $\Delta(lapA lapB)$. Stosownie do wymogu *LapB* w utrzymywaniu równowagi między biosyntezą fosfolipidów i LPS, nadekspresja genu *fabZ* również powodowała supresję letalności mutantu $\Delta(lapA lapB)$ oraz przywrócenie wzrostu w temperaturze 42°C w pożywce M9.

Mutacje, które prowadzą do skrócenia rdzenia LPS lub utrata białka *Lpp* powodują supresję defektów wzrostu mutantu $\Delta(lapA lapB)$ - Mapowanie



Rys. 10. RpoE-regulowany nowy sRNA *slrA* jako wielokopijny supresor mutacji $\Delta(lapA lapB)$ i jego rola w modulacji aktywności RpoE.

niekodującego RNA, zlokalizowanego w 3' UTR genu *cutC*. Powyższe nowe sRNA nazwaliśmy *slrA* (ang. *the suppression of lap deficiency*). Miejsce inicjacji transkrypcji ujawniło, że regiony promotorowe -35 i -10 oraz długość sekwencji między nimi przypominają sekwencję konsensusową promotorów regulowanych przez podjednostkę sigma RpoE. Regulacja *slrA* została określona poprzez konstrukcję jednokopijnej fuzji promotorowej genu *slrA*. Niniejsza fuzja promotorowa ulegała aktywacji w sposób specyficzny dla promotorów regulowanych przez RpoE, z charakterystycznym wysokim wzrostem ekspresji w mutancie $\Delta rseA$ (Rys. 10).

Aby poznać funkcję *slrA* sRNA, jego docelowe substraty oraz molekularne podstawy supresji mutantów $\Delta(lapA lapB)$ i $\Delta lapB$, został zanalizowany wpływ nadekspresji *slrA* sRNA na różne fenotypy. Tak więc zbadaliśmy wpływ nadekspresji *slrA* (i) na poziom białka LpxC, (ii) na pośredniczoną przez RpoE odpowiedź stresową w peryplazmie i błonie zewnętrznej, która jest wyjątkowo podwyższona w mutantach $\Delta(lapA lapB)$ oraz (iii) na zmiany w profilu proteomicznym. Immunoblotting całkowitych ekstraktów komórkowych z nadekspresją *slrA* sRNA oraz bez niej ujawnił nieznaczny spadek ilości LpxC w temperaturze 30°C i 37°C, co częściowo może wyjaśnić zaobserwowaną supresję. Również nadekspresja *slrA* zmniejszała podwyższone poziomy członków regulonu RpoE, a zwłaszcza obniżała poziom białka Lpp (Rys. 10). Lpp jest najliczniej występującym białkiem u *E. coli*. Ponieważ Lpp posiada trzy łańcuchy kwasów tłuszczowych, zmniejszenie ilości Lpp zwiększa ilość fosfolipidów, które występują w małej ilości w mutancie $\Delta(lapA lapB)$, a tym samym przywraca równowagę pomiędzy LPS i fosfolipidami. Wyniki te są zgodne z izolacją w genie *lpp* mutacji utraty funkcji, będącej ekstragenicznym supresorem. Zahamowanie syntezy Lpp może być związane z przewidywanym parowaniem zasad *slrA* RNA i *lpp* mRNA w regionie wokół sekwencji AUG i Shine-Dalgarno.

Ponieważ uprzednio zostało pokazane, że mutacje w genie *lpp* powodują supresję fenotypu temperaturowrażliwości mutantów *degP*, skonstruowaliśmy szczep z konstytutywnie podwyższoną ekspresją *slrA* w celu sprawdzenia, czy zwiększona synteza SlrA może prowadzić do supresji fenotypu temperaturowrażliwości mutantu $\Delta degP$. Zgodnie z naszymi przewidywaniami konstrukcja *slrA^C ΔdegP* nie miał fenotypu temperaturowrażliwości w temperaturze 42°C, jaki posiada mutant $\Delta degP$. Reasumując, zmniejszenie ilości białek LpxC i Lpp oraz obniżenie poziomu podwyższonej odpowiedzi stresowej wyjaśnia identyfikację *slrA* sRNA jako wielokopijnego supresora mutantu $\Delta(lapA lapB)$.

Synergistyczny efekt mutacji $\Delta(lapA lapB)$ oraz mutacji $\Delta(dnaK dnaJ)$ i mutacji w nowym, potencjalnym czynnikiem składania LPS - Ponieważ białka DnaK i DnaJ współuczyszczają się z LapA i LapB, a łagodna nadekspresja produktów operonu *dnaKJ* lub genu *yceK* powoduje częściową supresję defektów wzrostu mutantu $\Delta(lapA lapB)$, ich rola została dokładnie zbadana. Tak więc zostały skonstruowane delekcje genów (*dnaK dnaJ*) i *yceK*, które następnie połączono z mutacją $\Delta(lapA lapB)$, w temperaturze 30°C w pożywce M9, a z otrzymanych mutantów wyizolowano i zanalizowano LPS. LPS z mutantu $\Delta(dnaK dnaJ)$ przypominał LPS ze szczepu typu dzikiego. Natomiast LPS z mutantów $\Delta(lapA lapB dnaK dnaJ)$ i $\Delta(lapA lapB yceK)$ posiadał intensywne, pentaacylowane piki masowe, a w porównaniu z mutantem $\Delta(lapA lapB)$ wykazywał nawet bardziej znaczące zaburzenia w biogenezie LPS, przejawiające się ogromną akumulacją prekursorów LPS. Lipid A ze szczepu $\Delta(lapA lapB dnaK dnaJ)$ był nietypowo heksaacylowany z dwoma łańcuchami lauryłowymi, przy nieobecności łańcucha mirystylowego, podobnie jak w szczepie rodzicielskim $\Delta(lapA lapB)$. Zgodnie z synergistyczną rolą molekularnych chaperonów DnaK/DnaJ, łagodna nadekspresja z odpowiadających im genów częściowo zmniejszała akumulację pików masowych odpowiadających prekursorom LPS. Ponieważ DnaK i DnaJ są

głównymi molekularnymi chaperonami cytoplazmy, jest prawdopodobnym, że fałdowanie niektórych LPS-specyficznych enzymów jest pośredniczone przez chaperony. Brak poprawnie sfałdowanych enzymów w miejscu składania LPS, gdzie białka LapA i LapB funkcjonują razem z wewnątrzmembranowym kompleksem Lpt, może być czynnikiem ograniczającym. Tłumaczy to częściową supresję zachodzącą na skutek nadekspresji produktów genów *dnaK* i *dnaJ*. Jest również prawdopodobne, że produkt genu *yceK* uczestniczy w końcowym wstawianiu LPS do błony zewnętrznej, albowiem zakłada się, że YceK współdziała z systemem Lpt. Wyniki te ponownie wskazują na rolę LapA/B w prawidłowym funkcjonowaniu maszynerii Lpt.

Agregacja mirystylotransferazy i wczesnych glikozylotransferaz w mutantach $\Delta(lapA\ lapB)$ - Akumulacja wczesnych produktów pośrednich oraz obecność pentaacylowanego lipidu A w LPS z mutantów $\Delta(lapA\ lapB)$ i $\Delta lapB$ może zachodzić na skutek tego, że LapB jest wymagane w syntezie, fałdowaniu, lokalizacji lub jest potrzebne do aktywności odpowiednich enzymów. Tak więc poziom specyficznych enzymów był monitorowany przy wykorzystaniu epitopów FLAG-tag przyłączonych do ich C-końca w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ albo rosnącym w temperaturze 30°C w pożywce M9 albo po przeniesieniu do niepermissywnych warunków wzrostu. Całkowite ekstrakty komórkowe poddano frakcjonowaniu i analizowano pod względem ich skłonności do agregacji. Zgodnie z akumulacją pentaacylowanego LPS w mutantach $\Delta(lapA\ lapB)$, ilość białka LpxM była obniżona nawet w permissywnych warunkach wzrostu, LpxM migrowało w nieprawidłowy sposób, było podatne na agregację i poddawane proteolizie, co szczególnie uwidoczniło się w niepermissywnych warunkach wzrostu. Analogicznie enzymy WaaC i WaaO ulegały agregacji w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ po przeniesieniu do niepermissywnych warunków wzrostu. Powyższe agregacje oraz proponowana funkcja LapB jako rusztowania dla LPS-specyficznych enzymów korelują z unikalnym wymogiem poszczególnych glikozylotransferaz w integralności peryplazmy i błony zewnętrznej komórki.

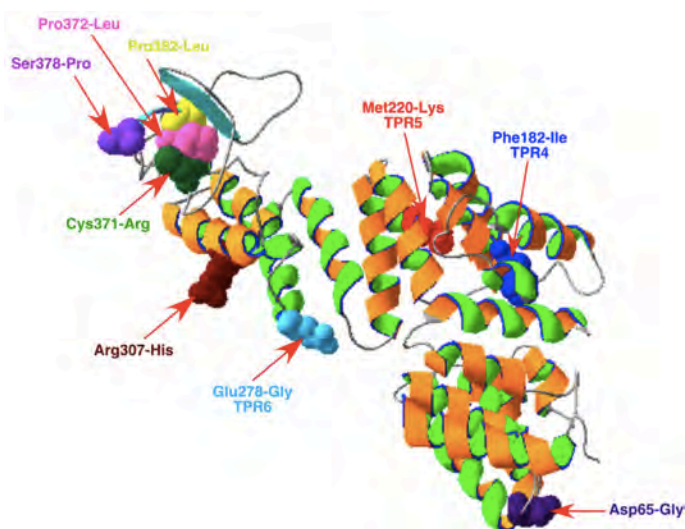
Dysfunkcja systemu Lpt oraz niezbędność białka SurA w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ - Ponieważ LapA i LapB współoczyszczają się z białkami Lpt, spodziewaliśmy się synergistycznego efektu w szczepie $\Delta(lapA\ lapB)$, kiedy jest uszkodzenie systemu Lpt. Fałdowanie białka LptD wymaga peryplazmatycznego katalizatora fałdowania SurA, a allele genu *lptD* o częściowej utracie funkcji wykazywały zaburzenia przepuszczalności. W związku z tym mutacja $\Delta(lapA\ lapB)$ została wprowadzona w permissywnych warunkach wzrostu do szczepu typu dzikiego oraz do szczepu niosącego mutację w genie *lptD*, oznaczoną jako *imp4213*, w obecności lub przy braku plazmidu posiadającego geny *lapA\ lapB* typu dzikiego. Co ciekawe, przy braku genów *lapA* i *lapB* nie mogły być skonstruowane żywotne transduktanty w tle genetycznym z mutacją *imp4213*. Podobnie szczep $\Delta(lapA\ lapB\ surA)$ może być skonstruowany tylko wtedy, gdy albo SurA albo LapB zostało dostarczone w *trans* z plazmidu. Aby głębiej poznać rolę białek LapA i LapB, zanalizowaliśmy ilość białka LptD-FLAG. Analiza ta wykazała, że w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ w niepermissywnej temperaturze występuje 4-5-krotna redukcja ilości LptD we frakcji błony zewnętrznej. Wyniki te pokazują, że pod nieobecność białek LapA/B funkcja białka LptD jest zaburzona i stąd wymóg SurA w utrzymaniu żywotności szczepu $\Delta(lapA\ lapB)$. Podsumowując, wyniki te potwierdzają model, według którego białka LapA/B funkcjonują wspólnie z białkami Lpt w pośredniczeniu składania LPS.

Konstrytuwna indukcja szlaku odpowiedzi na stres w peryplazmie i błonie zewnętrznej oraz szlaku zależnego od RpoH - Ze względu na to, że początkowy screening, który zidentyfikował geny *lapA* i *lapB*, był oparty na podwyższonej odpowiedzi stresowej w peryplazmie i błonie zewnętrznej, zanalizowaliśmy ilościowo poprzednie wyniki. Badanie aktywności RpoE-zależnych promotorów w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ wykazało od 4-krotnej do 9-krotnej indukcji nawet w permissywnych warunkach wzrostu w temperaturze 30°C. Aktywność promotora *cpxP*, zależnego od Cpx, była także 3-krotnie podwyższona. Wyniki te zostały dodatkowo wzbogacone poprzez analizę poziomu proteazy DegP, która jest pod wspólną kontrolą szlaków RpoE i Cpx. W mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ ilość białka DegP była podwyższona w permissywnej temperaturze, a po przeniesieniu do wyższej temperatury następował dalszy wzrost jego ilości. Tak więc możemy wnioskować, że mutanty $\Delta(lapA\ lapB)$ i $\Delta lapB$ charakteryzują się konstytutywną, wysoką ekspresją głównych regulonów stresu w peryplazmie i błonie zewnętrznej (RpoE i Cpx), zgodnie ze swoją pierwotną identyfikacją oraz poważnymi zaburzeniami w składaniu i w biosyntezie LPS.

RpoH wyczuwa niepoprawne sfałdowania białek występujących w cytoplazmie i w błonie

wewnętrznej oraz odpowiada na nie indukcją odpowiedzi szoku cieplnego. Ponieważ w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ wiele enzymów biosyntezy LPS ulega albo agregacji albo niepoprawnemu sfałdowaniu, a delecja genów szoku termicznego *dnaK* i *dnaJ* prowadzi do synergistycznych zaburzeń w LPS, został zbadany wpływ RpoH-zależnej odpowiedzi szoku termicznego. Stwierdzono podwyższony poziom białka DnaK w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ nawet w permissywnych warunkach wzrostu. Po przeniesieniu do wyższych temperatur ilość DnaK ulegała dalszemu podwyższeniu. Jeśli funkcją LapB jest bycie rusztowaniem dla enzymów biosyntezy LPS, w mutantach *lapB* enzymy te nie są prawidłowo umieszczane w miejscu syntezy LPS w cytoplazmie i w błonie wewnętrznej. To z kolei może wywołać RpoH-zależną indukcję szoku termicznego.

Identyfikacja kluczowych reszt aminokwasowych białka LapB oraz zachowawczość ewolucyjna LapA i LapB - Modelowanie LapB wykazało, że posiada ono strukturalne podobieństwo do eukariotycznej transferazy GlcNAc mającej N-kończącą domenę TPR, do eukariotycznej podjednostki APC/C z Cdc/Cut9, do białka MamA wymaganego do składania magnetosomu oraz do wielu innych



Rys. 11. Modelowanie białka LapB z *E. coli*.

LapB może być białkiem multimerycznym. Domena C-kończąca białka LapB (aminokwasy 61-89) posiada przewidywalne sfałdowanie, przypominające region łącznika L β H w C-kończącej domenie LpxD. Struktura krystaliczna LpxD wskazuje, że omawiana pętla łącznika jest zlokalizowana w sąsiedztwie reszt miejsca aktywnego. Zgodnie z naszymi wynikami badań, LapB funkcjonuje w podobny sposób, jak inne białka posiadające TPR, a zatem może służyć jako miejsce dokowania dla składania LPS w błonie wewnętrznej.

Podsumowanie, wnioski i znaczenie otrzymanych wyników opisanych w pracy Klein *et al.*, 2014 - Skoordynowane składanie LPS jest decydującym krokiem w jego kierowaniu do błony zewnętrznej. Jednakże mechanizm sprzężenia syntezy LPS i jego translokacji pozostawał nieznany. W celu poznania zależności powyższych procesów, zostały wyizolowane mutacje, które wpływają negatywnie na biogenezę i składanie LPS. Mutacje te zidentyfikowały dwa nowe geny, kodujące białka szoku cieplnego, które są wymagane w składaniu LPS u *E. coli*. Białka te zostały oznaczone jako LapA i LapB (ang. *lipopolysaccharide assembly protein A and B*). Mutanty *lapB* zidentyfikowano na podstawie kontrolowanej przez podjednostkę sigma RpoE podwyższonej, konstytutywnej odpowiedzi na stres w peryplazmie i błonie zewnętrznej. Szlaki, reagujące na stres w peryplazmie i błonie zewnętrznej, kontrolują kluczowe etapy w biogenezie LPS oraz odpowiadają na zaburzenia w składaniu LPS. Stwierdzono, że gen *lapB* ma istotne znaczenie dla żywotności bakterii w standardowych warunkach wzrostu laboratoryjnego. Wolne od supresorów mutanty $\Delta lapB$ mogą być uzyskane tylko na podłożu minimalnym w temperaturze 30°C w wielu, ale nie we wszystkich tłach genetycznych. Wykazano, że gen *lapB* jest ko-transkrybowany z genem *lapA*, a ich transkrypcja jest kierowana z trzech promotorów, z których jeden (P2) jest regulowany przez szok cieplny. W celu poznania molekularnych podstaw niezbędności białka LapB oraz przyczyn pozacytoplazmatycznej odpowiedzi stresowej, została

zanalizowana kompozycja LPS z różnych mutantów. Ponadto zostały wyizolowane wielokopijne i ekstrageniczne supresory. Oczyszczono również białka LapA i LapB.

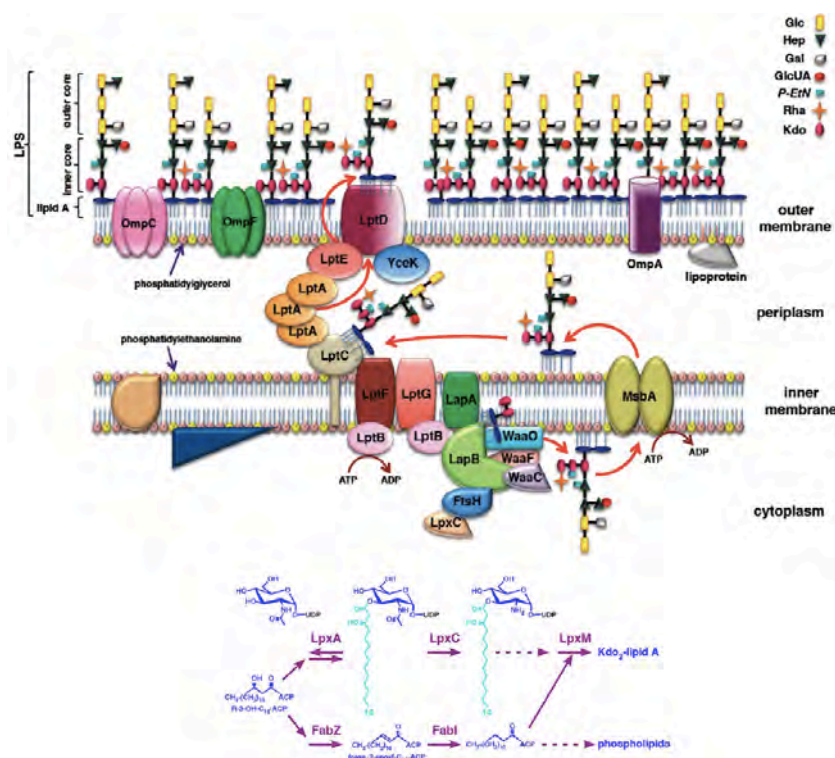
Bazując na analizach biochemicznych białek Lap, charakterystyce LPS z mutantu $\Delta(lapA\ lapB)$ i genetycznej analizie różnych supresorów, można stwierdzić, że wyniki z powyższych badań wskazują na centralną rolę białka LapB w sprzęganiu syntezy i translokacji LPS. Białko LapB bierze udział w szlaku składania lipidu A poprzez regulowanie ilości LpxC oraz albo w dostarczaniu albo w utrzymywaniu fałdowanej kompetencji wczesnych glikozylotransferaz. Ta kluczowa rola jest zgodna z niezbędnością LapB oraz z obecnością w LapB modułów takich jak TPR, które mogą pośredniczyć w oddziaływaniach białko-białko, a także służyć jako rusztowanie dla LPS i dla LPS-specyficznych enzymów. W związku z powyższym, w mutantach $\Delta lapB$ i $\Delta(lapA\ lapB)$ była podwyższona ilość LPS, charakteryzująca się obecnością dużej ilości form o skróconym rdzeniu, z których niektóre były pentaacylowane i wykazywały polimorfizm łańcucha węglowego. Ponadto w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ był bardzo podwyższony poziom białka LpxC, będącego enzymem, który katalizuje pierwszy nieodwracalny etap syntezy lipidu A.

Oczyszczanie LapA i LapB dostarczyło bardzo ważnych wskazówek, dotyczących ich funkcji w oddziaływaniu z białkami Lpt, które pośredniczą w translokacji LPS. W doświadczeniach typu „pull-down” LapA i LapB współczyszczwały się z LPS, białkami Lpt, proteazą FtsH oraz molekularnymi chaperonami DnaK i DnaJ. Specyficzne oddziaływanie zaobserwowano również pomiędzy WaaC i LapB. Zgodnie z zaburzeniami w biogenezie LPS oraz z oddziaływaniem LapA i LapB z białkami Lpt, częściowo funkcjonalny allel *lptD4213* powoduje letalność w szczepie $\Delta(lapA\ lapB)$. Ponadto okazało się, że w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$ w niepermissywnych warunkach wzrostu ilość LptD w błonie zewnętrznej została 4-5-krotnie zmniejszona. Wyniki te mogą wyjaśnić syntetyczną letalność $\Delta(lapA\ lapB\ surA)$, ponieważ SurA jest wymagane do fałdowania LptD. Współczyszczanie LapB i WaaC sugeruje, że białko LapB może łączyć syntezę LPS z translokacją LPS. Jakkolwiek wydaje się, że białka LapA i LapB w powyższym szlaku mogą funkcjonować w połączeniu z kilkoma białkami opiekuńczymi. Konkluzja ta jest oparta na zaobserwowanym współczyszczaniu LapA i LapB z DnaK i DnaJ oraz na częściowej supresji wzrostu, a także zaburzeń w LPS na skutek nadekspresji wymienionych molekularnych chaperonów.

Mutant $\Delta(lapA\ lapB)$ akumulował ekstrageniczne supresory, które zostały zmapowane w genie *lpxC*, *waaC*, *gmhA*, w operonie *waaQ* (biosynteza LPS) oraz w genie *lpp* (koduje lipoproteinę Brauna). Zwiększona synteza FabZ (3-R-hydroksymyristoyl dehydrataza ACP), *slrA* (nowy, regulowany przez RpoE, niekodujący sRNA), lipoproteiny YceK, toksyny HicA lub MurA (UDP-N-acetyloglukozamino 1-karboksywinylotransferaza) powoduje supresję niektórych zaburzeń, występujących w mutancie $\Delta(lapA\ lapB)$. Analiza powyższych supresorów pokazała, że czynniki, które powodują obniżenie ilości LPS, przywracają równowagę pomiędzy komponentami peryplazmy i błony zewnętrznej takimi jak fosfolipidy, LPS i peptydoglikan lub hamują toksycznie podwyższony poziom odpowiedzi regulowanej przez RpoE, mogą obejść letalność mutantów $\Delta(lapA\ lapB)$ i $\Delta lapB$.

Mutant $\Delta(lapA\ lapB)$ gromadził duże ilości LpxC. LpxC katalizuje pierwszy nieodwracalny etap w syntezie lipidu A. Jest to niestabilne białko, którego degradacja regulowana jest przez FtsH. LpxC i FabZ znane są jako kluczowe czynniki w zrównoważonej syntezie lipidu A i fosfolipidów (Rys. 12). To właśnie podwyższony poziom białka LpxC może być jednym z powodów niezbędności LapB. Zgodnie z powyższym, FtsH i LapB współczyszczają się, a mutacje supresorowe, które przywracają wzrost mutantom $\Delta lapB$, zostały zmapowane albo w genie *lpxC* albo w genach, które zmniejszają akumulację LpxC lub biosyntezę LPS. Dwie mutacje supresorowe zmapowane w genie *lpxC* obniżyły podwyższony poziom LpxC. Co ciekawe, mutacja supresorowa *sfhC21* zdefiniowanej mutacji *ftsH* również powodowała supresję defektów wzrostu mutantów $\Delta(lapA\ lapB)$. W równej mierze nadprodukcja nowego, niekodującego sRNA *slrA*, zidentyfikowanego w niniejszej pracy jako wielokopijny supresor, również powodowała nieznaczny spadek nagromadzenia LpxC.

To z kolei może przywrócić równowagę pomiędzy LPS a fosfolipidami, którego zaburzenie wynikało ze wzrostu ilości LpxC, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami o supresorach mutacji *ftsH* zmapowanymi w genie *fabZ*. Niniejsza praca wykazała, że istnieje wbudowany mechanizm, który pomaga w utrzymaniu równowagi w poziomach LapAB-zależnej syntezy LPS oraz fosfolipidów, gdyż jeden z promotorów genów *lapAB* jest zlokalizowany przed genem *pgpB*. Ponieważ w mutantach $\Delta(lapA$



lapB) i $\Delta lapB$ ma miejsce niezrównoważona synteza LPS oraz innych komponentów peryplazmy i błony zewnętrznej komórki, nadekspresja produktu genu *murA* pozwala na wzrost powyższych mutantów w warunkach niepermeabilnych. MurA i LpxA wykorzystują UDP-GlcNAc jako wspólny substrat. Wyjaśnia to wyizolowanie genu *murA* jako wielokopijnego supresora. Nadprodukcja MurA może przesunąć równowagę w kierunku biosyntezy peptydoglikanu, a tym samym zapobiec toksycznemu nagromadzeniu się LPS.

Akumulacja prekursorów LPS powoduje, że albo różne glikozylotransferazy są limitowane przy braku LapB albo LapB jest potrzebne do rekrutacji powyższych glikozylotransferaz do miejsc składania LPS. Jest to

Rys. 12. Zaproponowany model funkcjonowania białek LapA i LapB w składaniu LPS.

spójne z zaobserwowanym współczynszaniem się WaaC i LapB. Zgodnie z powyższymi argumentami kilka kluczowych wczesnych glikozylotransferaz jest podatnych na agregację w niepermeabilnych warunkach wzrostu. W LPS z mutantów $\Delta(lapA lapB)$ i $\Delta lapB$ następuje akumulacja znacznych ilości form lipidu A, które są albo pentaacylowane albo posiadają dodatkowy drugorzędowy łańcuch laurylowy, zastępujący łańcuch mirystylowy. Można to tłumaczyć tym, że w mutancie $\Delta(lapA lapB)$ dochodzi do zwiększonej proteolizy i do redukcji całkowitej ilości białka LpxM. Innym wytłumaczeniem może być to, że LpxM nie jest dostarczany do miejsca składania LPS, gdzie LapB funkcjonuje jako rusztowanie do składania LPS.

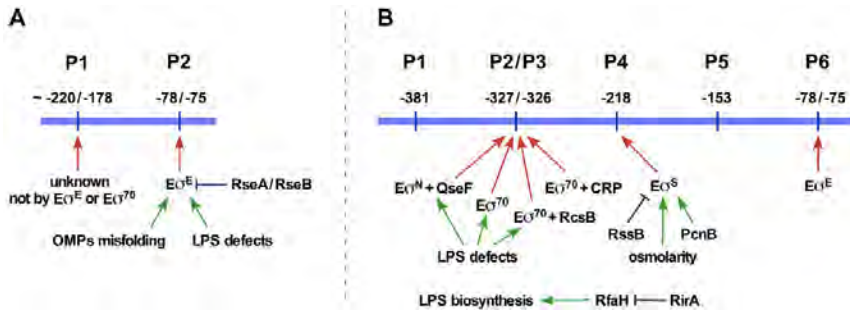
Dodatkowym nowym odkryciem, opisanym w niniejszej pracy, jest identyfikacja SlrA sRNA jako wielokopijnego supresora delekcji genów *lapA* i *lapB*. Zostało pokazane, że powyższy sRNA jest wytwarzany poprzez przetwarzanie pierwotnego transkryptu zlokalizowanego wewnątrz genu *cutC*, a dojrzałe 80-nt *slrA* znajduje się w obrębie 3' UTR *cutC* mRNA. Indukcja SlrA redukuje syntezę Lpp, a także obniża podwyższony poziom indukcji RpoE. Mureinowa lipoproteina Lpp jest numerycznie najliczniejszym białkiem *E. coli* i posiada trzy łańcuchy kwasów tłuszczowych. Tym samym brak Lpp lub zmniejszenie jego ilości może prowadzić do zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych i do przywrócenia równowagi między fosfolipidami i LPS w mutantach $\Delta(lapA lapB)$. Powyższe stwierdzenie dostarcza racjonalnego wyjaśnienia faktu izolacji mutacji supresorowej jako mutacji utraty funkcji w genie *lpp* oraz wielokopijnej supresji przez nadprodukcję *slrA* sRNA.

LapB posiada sześć tetratrikopeptydowych powtórzeń, a na C-końcu domenę rubredoksynową, która jest kluczowa dla aktywności białka. Wyniki opisane w niniejszej pracy wskazują, że LapB, zgodnie z jego niezbędnością, koordynuje fałdowanie białek, uczestniczących w syntezie LPS w błonie wewnętrznej i reguluje proteolizę LpxC, zapewniając w ten sposób zrównoważoną biosyntezę LPS i fosfolipidów.

VI. Wiele czynników transkrypcyjnych reguluje transkrypcję genu *rpoE* u *Escherichia coli* w różnych warunkach wzrostu i gdy jest zaburzona biosynteza lipopolisacharydów

Wprowadzenie

Wraz z odkryciem w latach 90-tych ubiegłego wieku u szeregu bakterii nowej klasy bakteryjnych czynników sigma, zdefiniowanych jako czynniki sigma o pozacytoplazmatycznej funkcji (*ang. extracytoplasmic function, ECF*), stało się jasne, że istnieją specyficzne czynniki sigma, które kontrolują transkrypcję genów, pełniących istotne role w części pozacytoplazmatycznej komórki. U bakterii *E. coli* gen *rpoE*, kodujący alternatywny drugi czynnik sigma szoku termicznego, został zidentyfikowany w 1995 roku, a jego produkt zaliczony do rodziny ECF czynników sigma. W późniejszych badaniach wykazano, że ekspresja genu *rpoE* u *E. coli* jest regulowana na poziomie transkrypcyjnym, jaki i na poziomie post-transkrypcyjnym. Zaobserwowano, że na poziomie transkrypcyjnym ekspresja genu *rpoE* jest regulowana z dwóch promotorów, z których jeden jest rozpoznawany przez $E\sigma^E$ (pozytywna autoregulacja) i odpowiada na zmiany w poziomie białek błony zewnętrznej oraz jest indukowany przez wzrost temperatury. Natomiast transkrypcyjna regulacja dystalnie położonego promotora nie została



Rys. 13. Transkrypcyjna regulacja genu *rpoE*.

W skład powyższego operonu wchodzi jeszcze czwarty gen *rseC*. RseA jest małym, zakotwiczonym w błonie wewnętrznej białkiem, które jednokrotnie przechodzi przez błonę. Jego cytoplazmatyczna domena N-terminalna fizycznie oddziałuje z RpoE wiążąc je, co ogranicza oddziaływanie RpoE z rdzeniem polimerazy RNA w warunkach niestresowych. Peryplazmatyczna domena RseA oddziałuje z RseB, umożliwiając w ten sposób tworzenie się trzyczęściowego kompleksu. Negatywne oddziaływanie RseA na RpoE ustępuje na skutek odpowiedzi na brak równowagi w ilości białek błony zewnętrznej. Jest ono spowodowane silnie regulowaną degradacją RseA przez kaskadę proteaz, powodując uwolnienie RpoE do cytoplazmy, a tym samym pozwalając na oddziaływanie RpoE z rdzeniem polimerazy RNA w celu inicjacji transkrypcji genów należących do regulonu RpoE.

Odkrycie w 2001 roku członków regulonu RpoE (Dartigalongue *et al.*, 2001) oraz kolejne badania dostarczyły dodatkowych, znaczących spostrzeżeń odnośnie funkcji RpoE (Noor *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2009, Klein *et al.*, 2011, Klein *et al.*, 2014). Okazało się, że $E\sigma^E$ transkrybuje ponad 50 genów, które kodują funkcje związane z dojrzewaniem białek błony zewnętrznej, biogenezą LPS, transportem LPS oraz których produkty uczestniczą w fałdowaniu białek w peryplazmie. Zgodnie z funkcją RpoE wymaganą w składaniu LPS, wyniki zaprezentowane w cyklu publikacji przedstawionych w powyższych rozdziałach pokazały, że RpoE bardziej specyficznie reaguje na zaburzenia w biogenezie LPS, w transporcie LPS oraz na brak równowagi w ilości LPS względem fosfolipidów. Tak więc w szczepach *E. coli* syntetyzujących LPS, który składa się tylko z Kdo₂-lipid IV_A lub tylko z lipidu IV_A zaobserwowano niespotykaną, hiperpodwyższoną aktywność RpoE. Podobnie brak zasadniczego czynnika składania LPS LapB, który prowadzi do akumulacji prekursorów LPS oraz do nadmiernej syntezy LPS kosztem fosfolipidów, również bardzo silnie indukuje aktywność RpoE na poziomie transkrypcyjnej indukcji genu *rpoE*. Co ciekawe, indukcja RpoE w szczepach *E. coli* z nienaruszoną maszyną biosyntezy LPS prowadzi do wielu ogólnych zmian w kompozycji LPS, a także do niestechiometrycznych zmian w lipidzie A oraz w rdzeniu wewnętrznym LPS. Najbardziej widocznie przejawia się to w szczepie $\Delta rseA$ z konstytutywną indukcją genu *rpoE*, który posiada prawie wyłącznie glikoformy LPS z trzecim Kdo i z Rha w rdzeniu wewnętrznym, z jednoczesnym skróceniem rdzenia zewnętrznego o terminalny disacharyd. Ta hiperindukcja RpoE powoduje również dołączenie P-EtN do drugiego Kdo kosztem modyfikacji lipidu A przez P-EtN. A zatem RpoE nie tylko reguluje składanie i transport LPS, ale również odpowiada na zaburzenia w biogenezie LPS. Ponieważ transkrypcyjna regulacja genu *rpoE* nie została w pełni poznana, w niniejszej pracy aspekt ten był przedmiotem badań, w których wykorzystano różnorodne narzędzia genetyczne i biochemiczne. Tak więc zostało

skonstruowanych wiele jednokopijnych transkrypcyjnych fuzji, obejmujących region promotorowy genu *rpoE* z wyjątkiem promotora kontrolowanego przez $E\sigma^E$. Uzyskane fuzje promotorowe zostały zanalizowane pod kątem specyficznych sygnałów, które aktywują lub hamują transkrypcję z powyższych promotorów. Cel ten został osiągnięty przez badanie warunków wzrostu, które indukują transkrypcję genu *rpoE* oraz identyfikację czynników, działających w *trans*, które pozytywnie lub negatywnie regulują transkrypcję powyższego genu. Ponadto końce 5' *rpoE* mRNA zostały zmapowane za pomocą czułej metody, wykorzystującej analizę RACE. Dzięki wszystkim powyższym metodom badawczym zostało zidentyfikowanych pięć nowych promotorów, z których każdy reaguje na inne sygnały. Spośród nich transkrypcja z promotora P2, P3 i P4 jest unikatowo regulowana przez RpoN, RpoD i RpoS (Rys. 13). A bardziej szczegółowo, zostało pokazane, że promotor *rpoEP3* odpowiada na zaburzenia w biogenezie LPS.

Zaburzenia w biogenezie LPS oraz sygnały regulujące RpoS, RpoN i CRP zmieniają aktywność transkrypcyjną genu *rpoE* - Ponieważ nie jest znana regulacja regionu promotorowego genu *rpoE*, położonego dystalnie względem promotora transkrybowanego przez $E\sigma^E$, została skonstruowana jednokopijna fuzja promotorowa do genu *lacZ*, która obejmowała region 529 bp powyżej autoregulowanego promotora. Dla ułatwienia fuzję taką nazwano *rpoEP-lacZ*. Niosący ją szczep posłużył do przeprowadzenia nasyconej, losowej mutagenazy transpozonowej oraz do wprowadzenia biblioteki Keio posiadającej zdefiniowane delecje genów, niebędących genami koniecznymi do życia. Mapowanie i sekwencjonowanie mutacji nadających fenotyp podwyższenia aktywności Lac wykazały, że większość z nich była mutacjami insercyjnymi lub delecyjnymi w genach biosyntezy LPS/genach regulatorowych LPS (*waaC*, *waaF*, *rfaH*, *waaG*, *waaP*) oraz kilka w innych loci. Kolejne mutacje, nadające fenotyp podwyższonej aktywności Lac, zostały zmapowane w genach *rssB*, *arcA*, *arcB* i *ecfL*. Mapowanie mutacji, nadających fenotyp obniżonej aktywności Lac, zidentyfikowało geny *ntnC*, *glnA*, *rpoS*, *crp* i *cya* wskazując, że ich produkty mogą odgrywać rolę pozytywnych regulatorów.

W komplementarnej strategii molekularnej, biblioteki całkowitych genomów sklonowane w wektorze o średniej ilości kopi zostały zastosowane w celu identyfikacji klonów, które wykazują fenotyp podwyższonej lub obniżonej aktywności Lac. Powyższa strategia wielokopijna zidentyfikowała gen *qseG* oraz kilka genów kodujących lipoproteiny, które po nadekspresji podwyższają aktywność *rpoEP-lacZ*. Ponadto subklonowanie DNA zidentyfikowało nowy, niekodujący sRNA zlokalizowany między ORF *waaQ* i *waaA*, którego nadekspresja również indukowała aktywność *rpoEP-lacZ*. Szczegółowa analiza wykazała, że powyższy sRNA powstaje poprzez przetwarzanie 5' UTR *waaQ* mRNA. Dodatkowo nadekspresja genu *pcnB*, kodującego poli(A) polimerazę I (PAP I) (Santos *et al.*, 2006), również zwiększała aktywność *rpoEP-lacZ*. Spośród genów, których indukcja powodowała represję aktywności *rpoEP-lacZ*, gen *fliZ* został zidentyfikowany jako ten, którego produkt mógł działać jako negatywny regulator.

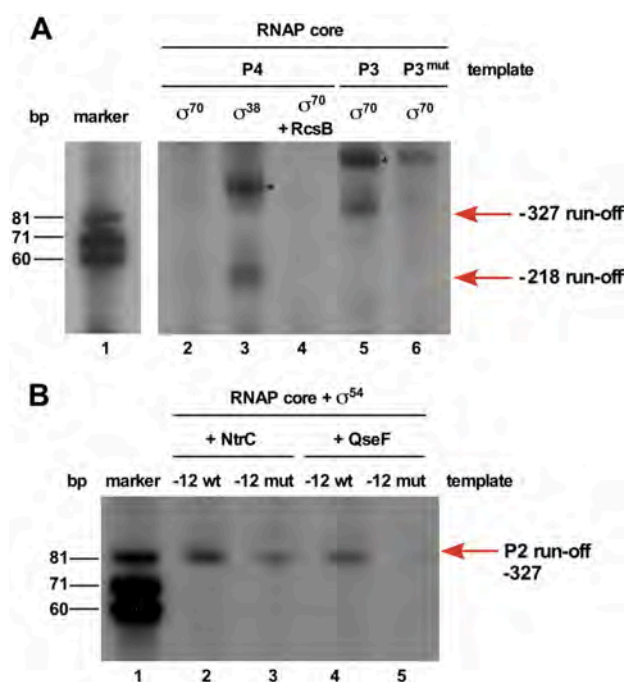
Ilościowe określenie aktywności β -galaktozydazy w różnych warunkach wzrostu w szczepach niosących fuzję *rpoEP-lacZ* wykazało, że fuzja ta jest indukowana w stacjonarnej fazie wzrostu, w wyniku ekspozycji na wysoką osmolarność, w warunkach ograniczonej ilości azotu, ekspozycji na kationowy przeciwdrobnoustrojowy peptyd polimyksynę B, NH_4VO_3 , natomiast ulega represji w pożywce wzbogaconej w glukozę (represja kataboliczna). Dodanie NH_4VO_3 indukuje modyfikacje lipidu A (Zhou *et al.*, 1999, Tam and Missiakas, 2005) oraz PhoB/R-zależną inkorporację do rdzenia wewnętrznego LPS GlcUA przez WaaH. Wyniki te wskazują, że transkrypcja dystalnego regionu promotorowego genu *rpoE* odpowiada na różne sygnały wytwarzane przez zaburzenia w biogenezie LPS, nadprodukcję niektórych lipoprotein, aktywatory RpoN oraz czynniki, które wpływają na stabilność/aktywność RpoS. Powyższe różnorodne sygnały mogą być wykrywane przez wiele szlaków. Wymaga to rekrutacji różnych czynników sigma, systemów dwuskładnikowych, a tym samym potencjalnej obecności wielu promotorów. Dalsza analiza rzeczywiście potwierdziła obecność kilku promotorów oraz zidentyfikowała unikalny mechanizm regulacji poszczególnych promotorów, rekrutujących w każdym przypadku inny czynnik sigma.

Identyfikacja końców 5' *rpoE* mRNA - Biorąc pod uwagę zróżnicowanie sygnałów, które mogą aktywować transkrypcję *rpoE*, inicjacja transkrypcyjna z górnego regionu promotorowego została zbadana za pomocą 5' RACE przy użyciu RNA wyekstrahowanego w różnych warunkach indukcji. Wyniki tych analiz ujawniają wykorzystanie pięciu głównych, nowych transkrypcyjnych miejsc inicjacji

oznaczonych jako P1 (-381), P2 (-327), P3 (-327/-326), P4 (-218) i P5 (-153). Częstotliwość korzystania z promotora P2 (-327) znacząco wzrastała, gdy RNA był ekstrahowany ze szczepu z nadekspresją genu *qseG*. Jednakże, gdy użyto RNA ze szczepu $\Delta waaC$, było wykorzystywane zarówno miejsce inicjacji -327, jak i -326 oraz miejsce -218 odpowiadające promotorowi P4. Ilość plazmidów posiadających koniec 5' promotora P4 wzrastała, kiedy RNA było ekstrahowane z hodowli bakteryjnych zebranych w późnej fazie wzrostu stacjonarnego.

Analiza sekwencji DNA rejonu powyżej miejsca startu transkrypcji (TSS) P2 wykazała, że znajdują się w niej motywy -12 (GC) i -24 (GG) charakterystyczne dla miejsc rozpoznawanych przez podjednostkę sigma RpoN. Miejsce inicjacji transkrypcji *rpoEP3*, odpowiadające pozycji -327 nt, posiada wysoki stopień podobieństwa do konsensusu sekwencji -10 i -35 promotora głównej podjednostki sigma RpoD oraz do rozszerzonej sekwencji -10 promotora. Co więcej, regiony konsensusowe dla miejsc wiązania CRP i aktywatora RcsB wykryto również powyżej promotora P3. Częściowo miejsca te pokrywają się z promotorem P3. Sekwencja DNA regionów -10 i -35 powyżej miejsca inicjacji odpowiadającego promotorowi P4 sugeruje, że są to sekwencje konsensusowe, które mogą być rozpoznawane albo przez $E\sigma^{70}$ albo przez $E\sigma^S$.

Transkrypcja *in vitro* typu „run-off”: promotory P2 i P3 są regulowane przez RpoN i RpoD przy użyciu tego samego miejsca inicjacji transkrypcji - Analiza sekwencji DNA region promotorowego odpowiadającego -327 TSS sugerowała, że inicjacja transkrypcji może być pośredniczona przez polimerazę RNA zawierającą albo podjednostkę sigma RpoN, albo główną podjednostkę sigma RpoD, albo miejsce to jest poddane podwójnemu użytkowaniu. Tak więc przeprowadzono transkrypcję *in vitro* typu „run-off” z zrekonstruowaną polimerazą RNA, posiadającą podjednostkę sigma RpoN oraz

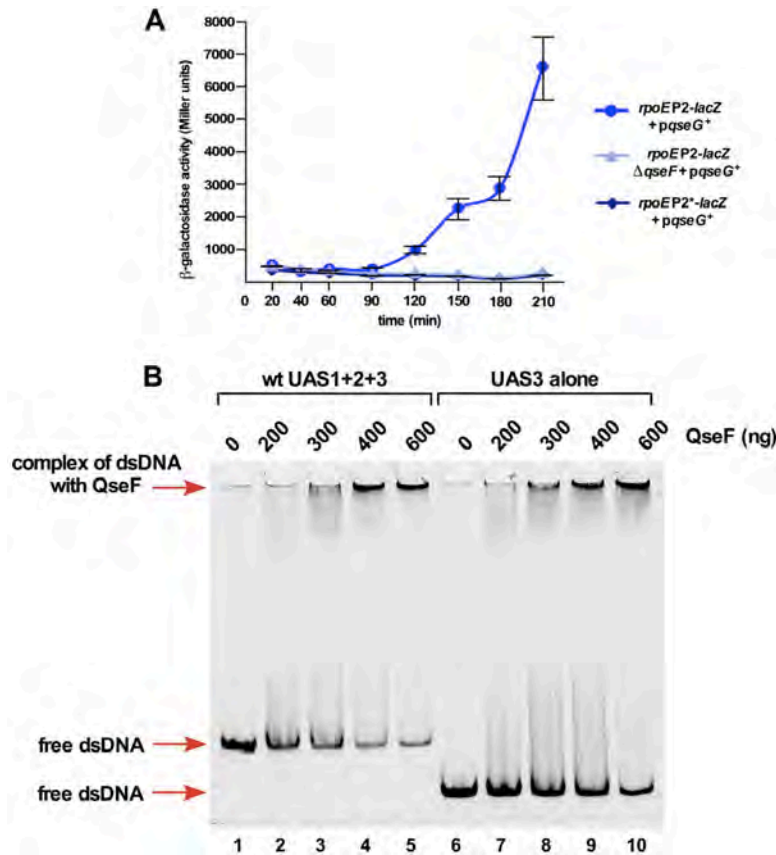


Rys. 14. Transkrypcja *in vitro* typu „run-off” pokazująca wykorzystywanie różnych promotorów genu *rpoE* przez różne formy polimerazy RNA.

jakiegokolwiek aktywatora wydajnie inicjuje transkrypcję. Wielkość transkryptu była podobna do tej, jaką uzyskano z RpoN. Zatem pozycja nukleotydoma -327 wyznacza miejsce inicjacji dla promotora P2 (regulowanego przez RpoN) oraz promotora P3 (regulowanego przez RpoD). W celu potwierdzenia powyższych wyników, konserwowane nukleotydy -7T i -11A zostały odpowiednio zmutowane do -7C i -11G. W przeciwieństwie do matrycy typu dzikiego zmutowana matryca nie może być efektywnie rozpoznawana przez RNAP+RpoD w celu inicjacji transkrypcji (Rys. 14A). Zmutowany promotor P3 został sklonowany i przeniesiony w pojedynczej kopii na chromosom. W badaniach *in vivo* fuzja taka nie reagowała na sygnały, które aktywują promotor *rpoEP3* i wykazywała zmniejszoną aktywność.

W związku z tym uznano, że RpoN i RpoD rozpoznają odpowiednio promotory P2 i P3, które posiadają wspólne miejsce startu inicjacji w pozycji -327 nt powyżej miejsca startu translacji *rpoE*.

QseF (GlrR) pozytywnie reguluje promotor P2 rozpoznawany przez RpoN - Aby zrozumieć mechanizm regulacji transkrypcji różnych promotorów *rpoE*, w wielokopijnych bibliotekach genomowych poszukiwano genów, których nadekspresja indukuje transkrypcję *rpoE*. Jednym z genów, których nadekspresja specyficznie indukowała aktywność promotora *rpoEP2*, był gen *yfhG* (*qseG*). Jego



Rys. 15. Pozytywna regulacja promotora *rpoEP2* przez aktywator QseF.

Ponadto metoda EMSA ujawniła, że QseF może specyficznie wiązać się do trzech zachowawczych ewolucyjnie sekwencji palindromowych TGTCN₁₀GACA oznaczonych UAS1, UAS2 i UAS3 (Upstream Activator Sequence), zlokalizowanych powyżej P2 TSS (Rys. 15B). A zatem można stwierdzić, że RpoN-regulowany promotor *rpoEP2* rekrutuje QseF, który jako aktywator, poprzez system dwuskładnikowy Qse, łączy RpoN i RpoE.

Modulatory RpoS regulują promotor *rpoEP4* - Aby zidentyfikować sygnały i regulatory poszczególnych promotorów, do szczepu niosącego fuzję *rpoEP4-lacZ* zostały wprowadzone różnorodne mutacje w różnych genach, które powodowały aktywację transkrypcji *rpoE*. Tak więc mutacja $\Delta rpoS$ wywoływała około 60% zmniejszenie, podczas gdy $\Delta rssB$ powodowała ponad 35% zwiększenie aktywności promotora *rpoEP4*. RssB pełni funkcję białka adaptorowego, uczestniczącego w szlaku ClpXP-zależnej proteolizy RpoS i tym samym mutanty *rssB* wykazują podwyższony poziom białka RpoS. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi *in vitro* metodą „run-off” pokazującymi jednoznacznie, że promotor *rpoEP4* jest transkrybowany przez $E\sigma^S$ (Rys. 14A). Dodatkowym potwierdzeniem powyższych konkluzji jest obserwacja, że wystawienie na działanie wysokiej osmolarności również powodowało 2-3-krotną indukcję aktywności promotora *rpoEP4*. Wzrost osmolarności zwiększa RprA-zależną translację RpoS. Podobnie nadekspresja genu *pcnB* spowodowała 40% wzrost aktywności promotora *rpoEP4*, podczas gdy indukcja genu *fliZ* hamowała aktywność powyższego promotora o 40%. Gen *pcnB* koduje PAP I, a w przypadku jego braku zwiększa się RssB-zależna proteoliza białka RpoS. FliZ pełni rolę represora RpoS, działając jako jego antagonistą ze względu na nakładające się właściwości wiązania

produkt, QseG, mógłby pośredniczyć w przenoszeniu sygnału. Gen *qseG*, kodujący α -helikalne białko błony zewnętrznej, został scharakteryzowany w enterokrwotocznym szczepie *E. coli* (EHEC) oraz *Edwardsiella tarda*. Gen *qseG* jest transkrybowany w ramach operonu *qseE* (*glrK*) *qseF* (*glrR*). System QseEFG reguluje kluczowe czynniki wirulencji i zapewnia wzajemną komunikację z innymi systemami regulatorowymi, takimi jak PhoP/Q i RcsB/C. Ilościowy pomiar aktywności β -galaktozydazy ujawnił prawie 20-krotny wzrost aktywności promotora *rpoEP2* na skutek nadekspresji genu *qseG*. Jednakże w mutancie $\Delta qseF$ brak było indukcji promotora *rpoEP2* w wyniku nadprodukcji QseG, co dowodzi, że w procesie tym wymagany jest regulator odpowiedzi QseF (Rys. 15A). Wykorzystując zmutowaną jednokopijną fuzję promotorową *rpoEP2*-lacZ* zostało pokazane, że indukcja promotora *rpoEP2* na skutek nadprodukcji QseG również wymaga sekwencji rozpoznawanych przez RpoN.

DNA, co tłumaczy negatywny wpływ nadekspresji genu *fliZ* na aktywność promotora *rpoEP4*. Tak więc powyższe wyniki pokazały, że promotor *rpoEP4* jest regulowany przez RpoS, a warunki, które albo stabilizują podjednostkę sigma RpoS (PAP I) albo destabilizują ją (RssB), zmieniają aktywność promotora *rpoEP4* zgodnie z jego pozytywną regulacją przez RpoS.

Zaburzenia we wczesnych etapach biosyntezy rdzenia LPS indukują transkrypcję promotora *rpoEP3* - Większość *trans*-działających mutacji *Tn10*, które zwiększały aktywność promotora *rpoEP-lacZ*, zostało zmapowanych w genie *waaC* oraz w kilku innych genach z *waa* locus, co sugeruje, że zaburzenia w biogenezie LPS aktywują transkrypcję *rpoE* z dystalnie położonego promotora/promotorów. Aby uniknąć efektu polarności, zostały skonstruowane niepolarne delecje różnych genów *waa*. W celu określenia, który z promotorów jest specyficznie indukowany, gdy LPS jest uszkodzony, powyższe mutanty przeniesiono do szczepów, niosących fuzję genu *lacZ* do promotora P2, P3 i P4.

Ponieważ promotory P2 i P3 używają tego samego TSS, aby rozróżnić sposoby aktywacji powyższych dwóch promotorów skonstruowano dwie różne fuzje promotorowe. Jeden z takich konstruktów posiadał mutacje w promotorze P2 w miejscach rozpoznawanych przez podjednostkę RpoN, podczas gdy druga fuzja promotorowa niosła mutację w elemencie -10 promotora P3 regulowanego przez podjednostkę RpoD. Do szczepów z powyższymi fuzjami zostały wprowadzone allele delecyjne różnych genów *waa*, a następnie oznaczano ilościowo specyficzną aktywność transkrypcyjną poszczególnych promotorów. Analiza ta wykazała, że w mutancie $\Delta waaC$ występuje 7-krotny wzrost aktywności promotora *rpoEP3-lacZ* w porównaniu do jego aktywności podstawowej ze szczepu typu dzikiego. Jednakże mutant $\Delta waaC$ z fuzją *rpoEP2-lacZ* wykazywał tylko od 0.7- do 2-krotnego zwiększenia aktywności po wejściu w fazę stacjonarną. W mutantach $\Delta waaC$ nie zaobserwowano natomiast indukcji RpoS-regulowanego promotora P4. Mutanty $\Delta waaF$, $\Delta waaG$, $\Delta waaP$ i $\Delta waaO$ wykazywały podobną ponad 2-krotną indukcję promotora *rpoEP3*. Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że poważne zaburzenia w LPS w najbardziej zachowawczej ewolucyjnie części rdzenia wewnętrznego oraz nieobecność GlcI indukują aktywność RpoD-zależnego promotora P3.

Transkrypcyjna indukcja genu *rpoE* na skutek zaburzeń w LPS wymaga systemów dwuskładnikowych Qse i Rcs - Aby poznać molekularny mechanizm aktywacji transkrypcji genu *rpoE* spowodowany zaburzeniami w biogenezie LPS, zanalizowaliśmy grupę podwójnych mutantów delecyjnych pozbawionych genów różnych regulatorów w tle genetycznym $\Delta waaC$. Spośród nich szczep $\Delta(waaC rpoN)$ wykazywał około 40-45% obniżenie aktywności *rpoEP2-lacZ* w porównaniu z izogenicznym mutantem $\Delta waaC$. Zgodnie z wynikami *in vitro* otrzymanymi przy wykorzystaniu metody „run-off”, aktywacja fuzji *rpoEP2-lacZ* w szczepie $\Delta(waaC qseF)$ została zmniejszona o ponad 30%, co wskazuje, że pewne zaburzenia w biogenezie LPS są wykrywane poprzez szlaki RpoN i QseF. Wiadomo, że poważne zaburzenia LPS indukują system dwuskładnikowy Rcs. W systemie tym RcsB pełni rolę głównego regulatora odpowiedzi. Dlatego też mutacja $\Delta rcsB$ została poddana transdukcji do szczepu $\Delta waaC$, niosącego fuzję *rpoEP3-lacZ*. Uderzającym jest fakt, że w porównaniu do bardzo podwyższonej aktywacji fuzji *rpoEP3-lacZ* w szczepie $\Delta waaC$, w mutancie $\Delta(waaC rcsB)$ jest prawie całkowicie zniesiona aktywność powyższej fuzji. Dane te sugerują, że systemy Rcs i Qse regulują transkrypcję genu *rpoE* w odpowiedzi na zaburzenia w biogenezie LPS, przy czym system Rcs odgrywa tu znaczącą rolę.

***In vitro* RcsB wiąże się do regionu promotora P3** - Aby ustalić rolę RcsB w regulacji promotora *rpoEP3*, wykorzystując metodę EMSA zbadano zdolność wiązania białka RcsB do DNA zawierającego region powyżej wymienionego promotora. Analiza sekwencji DNA położonej powyżej promotora P3 wykazała, że proksymalnie do regionu -35 promotora P3 jest element sekwencji DNA podobny do sekwencji wiązania RcsB. Wykorzystując fragmenty DNA, posiadające miejsce wiązania RcsB albo typu dzikiego, albo zmutowane, albo usunięte, badano specyfikę wiązania RcsB do kasety wiążącej RcsB. Fragment DNA typu dzikiego, posiadający kasetę wiążącą RcsB, ulegał efektywnemu przesunięciu migracyjnemu w żelu w porównaniu ze zmutowanymi fragmentami DNA o utraconej zdolności wiązania do omawianej kasety. Tym samym wiązanie RcsB powyżej regionu promotora P3 popiera wyniki *in vivo*, pokazujące udział systemu dwuskładnikowego Rcs w regulacji transkrypcji genu *rpoE* z promotora P3.

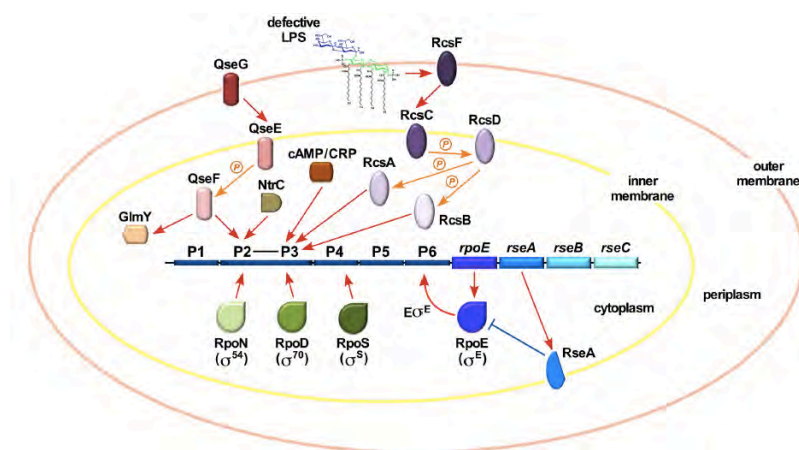
Zaburzenia w składaniu LPS również indukują promotor *rpoEP3* - Wcześniej wykazano, że zrównoważona biosynteza LPS wymaga koniecznego do życia białka LapB, a jego brak znacząco

(Rys. 17E). Reasumując, zaprezentowane wyniki dowodzą, że RirA jest nowym sRNA, który oddziałuje z RfaH, a jego nadmiar obniża ilość LPS poprzez model sekwestracji, co ogranicza dostępność RfaH.

Nadekspresja genów kodujących lipoproteiny indukuje promotor *rpoEP3* - Najbardziej prominentna klasa wielokopijnych induktorów transkrypcji *rpoEP1-P5* zidentyfikowała geny kodujące lipoproteiny. Spośród otrzymanych supresorów zanalizowaliśmy wpływ nadprodukcji genu *yhdV*, ponieważ supresor ten został kilkakrotnie wyizolowany jako inducer aktywności transkrypcyjnej *rpoEP1-P5-lacZ*, a w szczególności *rpoEP3-lacZ*. Pomiar aktywności *rpoEP3-lacZ* wykazał prawie 3.4-krotny jej wzrost. Postulowano, że zwiększona synteza lipoprotein może powodować ograniczenie w dostępie do systemu Lol, który jest wymagany do sortowania lipoprotein, mogących indukować szlak Rcs. Stwierdzenie powyższe zostało poparte zaobserwowaną redukcją aktywacji promotora *rpoEP3* o ponad 50% na skutek nadekspresji *yhdV* w szczepie $\Delta rcsB$. A zatem możemy wnioskować, że system dwuskładnikowy Rcs wyczuwa naruszenia równowagi komponentów błony zewnętrznej na skutek albo zaburzeń w LPS albo nadekspresji lipoprotein, powodując aktywację transkrypcji *rpoEP3*.

Promotor *rpoEP3* jest poddawany represji katabolicznej - Podczas ilościowego oznaczania transkrypcji, wielokrotnie obserwowaliśmy, że aktywność promotora *rpoEP1-P5* jest wyższa w przypadku, gdy wykorzystywany jest glicerol jako jedyne źródło węgla niż gdy źródłem węgla jest glukoza. Efekt represji przez dodanie glukozy był obserwowany szczególnie specyficznym względem promotora *rpoEP3*. Dobrze udokumentowany jest fakt, że w obecności glukozy jest niski poziom cAMP, co powoduje zmniejszenie lub brak ekspresji z promotorów, które wymagają wiązania CRP. Wyniki te są zgodne z identyfikacją insercji Tn10 w genie *cya* oraz z 50% redukcją aktywności *rpoEP3* w mutancie Δcrp . Zostało to następnie poparte analizą EMSA. Migracja specyficznej matrycy DNA, niosącej potencjalne miejsce wiązania CRP powyżej promotora P3, jest efektywnie przesunięta w obecności aktywowanego CRP. Powyższe wyniki pokazały, że istnieje dodatkowa kontrola *rpoEP3* pośredniczona przez cAMP-CRP.

Podsumowanie, wnioski i znaczenie otrzymanych wyników opisanych w pracy Klein *et al.*, 2016 - Podjednostka sigma RpoE jest niezbędna dla żywotności *E. coli*. Reguluje ona funkcje pozacytoplazmatyczne, włączając w to translokację LPS oraz niektóre niestechiometryczne modyfikacje LPS. Transkrypcja genu *rpoE* jest pozytywnie autoregulowana przez $E\sigma^E$ oraz przez nieznanne mechanizmy, kontrolujące ekspresję dystalnie zlokalizowanego promotora/promotorów. Tak więc celem niniejszej pracy było poznanie transkrypcyjnej regulacji genu *rpoE* z regionu promotorowego



Rys. 18. Kointegracja wielu szlaków sygnałowych oraz wymóg różnych czynników transkrypcyjnych w regulacji transkrypcji genu *rpoE* w odpowiedzi na specyficzne bodźce.

wejście w fazę stacjonarną, (iv) przeniesienie do warunków o wysokiej osmolarności, (v) ekspozycję na działanie polimyksyny B, (vi) przeniesienie do warunków wzrostu ubogich w azot, (vii) nadekspresję określonych genów kodujących lipoproteiny. Natomiast w pożywce wzbogaconej w glukozę transkrypcja podlegała represji. Biorąc pod uwagę różnorodność odpowiedzi w różnych warunkach stresowych, zostały zmapowane końce 5' *rpoE* mRNA, prowadząc do identyfikacji co najmniej pięciu nowych miejsc

zlokalizowanego dystalnie do promotora kontrolowanego przez $E\sigma^E$. Konstrukcja rozmaitych fuzji transkrypcyjnych oraz identyfikacja *trans*-działających czynników, które modulują transkrypcję genu *rpoE* wykazały, że dystalny region promotorowy odpowiada na wiele zróżnicowanych bodźców, które mogą być wyczuwane przez różne czynniki transkrypcyjne. Do czynników, które z dystalnego regionu promotorowego zmieniają transkrypcję genu *rpoE* możemy zaliczyć aktywacje przez (i) ciężkie zaburzenia biogenezy LPS lub niezrównoważoną syntezę LPS, (ii) dodanie NH_4VO_3 , (iii)

startu transkrypcji zlokalizowanych powyżej promotora transkrybowanego przez $E\sigma^E$. Promotory te są aktywowane w odpowiedzi na unikalne sygnały. Spośród nich P2, P3 i P4 definiują główne promotory, rozpoznawane odpowiednio przez podjednostki sigma RpoN, RpoD i RpoS (Rys. 18). Identyfikacja promotora P4 regulowanego przez RpoS jest spójna z indukcją transkrypcji genu *rpoE* po wejściu do stacjonarnej fazy wzrostu, prawie 60% redukcją w szczepie $\Delta rpoS$ oraz zwiększeniem aktywności promotora P4 przez czynniki stabilizujące RpoS. Co ciekawe, promotory P2 i P3 wykorzystują to samo TSS zlokalizowane w pozycji -327. Wyniki te zostały potwierdzone przez doświadczenia transkrypcji *in vitro* oraz zmiany migracji w natywnym żelu poliakrylamidowym. Doświadczenia te wykazały, że promotor P2 rozpoznawany przez RpoN jest pozytywnie regulowany przez system dwuskładnikowy QseE/F oraz przez aktywator NtrC, podczas gdy promotor P3, regulowany przez RpoD, jest pozytywnie kontrolowany przez system Rcs w odpowiedzi na zaburzenia w biosyntezie rdzenia LPS, nadprodukcję niektórych lipoprotein oraz przez globalny regulator CRP. Szczepy syntetyzujące Kdo₂-LA wykazywały 7-krotny wzrost aktywności promotora *rpoEP3*, który był zniesiony w szczepie $\Delta(waaC\ resB)$. Nadprodukcja nowego 73-nt sRNA *rirA*, generowanego przez przetworzenie 5' UTR *waaQ* mRNA, indukuje aktywność promotora *rpoEP3* przy równoczesnym zmniejszeniu ilości LPS i zaburzeń w inkorporacji O-antygeny. W obecności polimerazy RNA *RirA* wiąże *RfaH*, będący regulatorem LPS, który zapobiega przedwczesnej transkrypcyjnej terminacji operonów *waaQ* i *rfb*. Zwiększona ilość *RirA* może wiązać duże ilości *RfaH*, powodując zaburzenia w biogenezie LPS oraz aktywację transkrypcji genu *rpoE*. Podsumowując, w powyższej pracy została w pełni zbadana transkrypcja genu *rpoE*, wykazując po raz pierwszy obecność dodatkowych trzech aktywnych promotorów (P2, P3 i P4), które odpowiadają na różne sygnały. Promotory te są rozpoznawane przez odmienne czynniki sigma takie jak RpoS, RpoD i RpoN, co integruje odpowiedź na różnorodne sygnały stresowe. Spośród powyższych promotorów promotor *rpoEP3* reaguje na zaburzenia w biogenezie LPS poprzez aktywację systemu Rcs. Po raz pierwszy zademonstrowano także rolę czynnika sigma RpoN i systemu dwuskładnikowego Qse w regulacji transkrypcji genu *rpoE*. Jeszcze bardziej interesujące jest to, że został zidentyfikowany nowy, niekodujący sRNA (*RirA*). Pokazano, że *RirA* wiąże się do czynnika transkrypcyjnego *RfaH*, ujawniając tym samym dodatkowy, nowy punkt kontrolny w regulacji LPS oraz w transkrypcji genu *rpoE*.

VII. Regulowana kontrola składania i różnorodności LPS przez niekodujące sRNA

Wprowadzenie

Z pracy opisanej w powyższych rozdziałach, obejmujących pięć głównych publikacji (od 2009 do 2016 roku), jedno z nowych odkryć obejmowały: (i) identyfikację dwóch nowych sRNA (*SlrA* i *RirA*), (ii) wykazanie, że RpoE-regulowane niekodujące sRNA, zwłaszcza *RybB*, regulują heterogeniczność LPS poprzez kontrolowanie ekspresji *waaR*, (iii) niektóre z zaburzeń biogenezy LPS, które powodują indukcję *rpoE*, przewyciężają wyciszenie ekspresji genu *eptB*, odpowiedzialnego za inkorporację P-EtN na drugim Kdo, prowadząc w ten sposób do syntezy różnorodnych glikoform w warunkach stresu w peryplazmie i błonie zewnętrznej. Tym samym część z powyższych wyników została podsumowana w pracy przeglądowej zatytułowanej „Regulowana kontrola składania i różnorodności LPS przez niekodujące sRNA”.

Szeroko zakrojone badania, przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu, wykazały ponad wszelką wątpliwość, że oprócz znanej funkcji względem transkrypcyjnych regulatorów wiążących DNA, niekodujące regulatorowe RNA odgrywają decydującą rolę w wielu kluczowych aspektach fizjologii bakterii. Ponieważ większość z omawianych RNA jest małego rozmiaru i przeważnie są to niekodujące RNA, są one powszechnie określane jako małe, niekodujące RNA (sRNA). sRNA biorą udział w regulacji ważnych procesów, obejmujących wchłanianie składników odżywczych, transport specyficznych substratów, utrzymanie przepływów metabolicznych, homeostazę żelaza, metabolizm węgla, odpowiedzi stresowe, tworzenie biofilmu, kontakt komórka bakteryjna-gospodarz, homeostatyczna kontrola kluczowych komponentów składników peryplazmy i błony zewnętrznej. W celu zapewnienia wysokiej czułości, wiele sRNA ulega transkrypcji w odpowiedzi na specyficzne sygnały. Transkrypcja takich sRNA jest często regulowana przez wyspecjalizowane czynniki sigma lub przez systemy dwuskładnikowe. Z kolei gdy sygnał zanika, działanie sRNA może dostarczać mechanizm sprzężenia zwrotnego dla regulacji, obniżającej działanie czynników sigma i systemów dwuskładnikowych. W wielu przypadkach regulacja przez sRNA, obniżająca działanie powyższych

o funkcji ekstracytoplazmatycznej) jest konieczny do życia u *E. coli*. Na podstawie moich badań opisanych powyżej, zostało pokazane, że *E. coli* odpowiada na zaburzenia w składzie błony zewnętrznej oraz reguluje kompozycję i składanie jej kluczowych elementów, obejmujących LPS i OMPs. Przeprowadzone szczegółowe badania wykazały, że składanie LPS wymaga koniecznego do życia białka LapB, które kontroluje ilość LpxC i łączy translokację LPS z jego syntezą. RpoE, wspólnie z systemami dwuskładnikowymi, również reguluje kompozycję LPS. Ponadto kompozycji LPS jest kontrolowana poprzez RpoE-regulowane sRNA: RybB i SlrA. Wymienione sRNA dodatkowo działają, przez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, na RpoE. Wykazano, że transkrypcja genu *rpoE* ulega indukcji pod wpływem wielu stresów, obejmujących zaburzenia w biogenezie LPS. Pojawiło się także kilka nieznanych dotąd aspektów, takich jak regulacja LPS przez nowy sRNA RirA poprzez oddziaływanie z anty-terminatorem/regulatorem translacji RfaH oraz funkcja QseF jako aktywatora dla regulowanego przez RpoN promotora P2. Nie są znane molekularne szczegóły dotyczące tego, jak RirA sRNA reguluje aktywność RfaH, stąd będą one przedmiotem dalszych badań. Trwające badania wykazały rolę katalizatora fałdowania FkpB w uzyskiwaniu prawidłowej konformacji koniecznego do życia ABC transportera LPS LptB oraz kompleksu RpoE/RseA, a tym samym w regulacji LPS i RpoE. Analiza strukturalna LPS pokazała również, że w warunkach indukujących RpoE LPS posiada unikalny polimer, którego kompozycja i miejsce przyłączenia mogą być różne od M-antygeny. Skład polimeru i miejsce jego inkorporacji będą przedmiotem dalszych badań. Główne kierunki przyszłych badań są przedstawione poniżej.

Mechanizm działania RirA sRNA oraz jego oddziaływanie z RfaH - Podczas badania regulacji transkrypcji genu *rpoE* został zidentyfikowany nowy sRNA *rirA*, którego nadekspresja specyficznie indukowała promotor *rpoEP3*, odpowiadający na zaburzenia w biogenezie LPS (Klein *et al.*, 2016). Mapowanie końców 5' i 3' ujawniło, że powyższy sRNA ma wspólny koniec 5' z *waaQ* mRNA oraz posiada miejsce *ops* (GGCGGTAG) i tzw. miejsce JUMPstart, które służą jako miejsca rozpoznawania dla czynnika transkrypcyjnego RfaH. Długi operon *waaQ* koduje geny, których produkty są wymagane w biosyntezie rdzenia LPS. Wiadomym jest również, że RfaH rozpoznaje miejsce pauzowania *ops*, uniemożliwiając terminację transkrypcji przez czynnik Rho i jednocześnie zwiększając translację, ponieważ tego typu operony często pozbawione są sekwencji konsensusowej wiążącej rybosom RBS. Ponadto w naszych badaniach zostało pokazane, że RirA wiąże rdzeń polimerazy RNA, co wymaga obecności miejsca *ops* w RirA, a nadmiar RirA obniża ilość LPS i zapobiega inkorporacji O-antygeny. Sugeruje to, że białko RfaH albo straciło specyficzność w rozpoznawaniu docelowych operonów albo ulega sekwestracji przez RirA. Wolne RfaH występuje w nieaktywnej, zamkniętej konformacji z C-końcem zakleszczonym w spiralnej strukturze spinki do włosów. Jednakże po napotkaniu miejsca pauzy *ops*, RfaH ulega transformacji, prowadzącej do oddzielenia domen N- i C-terminalnych oraz przekształcenia konformacji domeny C-końcowej z mającej strukturę α do posiadającej formę β -beczułki (struktura NusG-podobna). Tak więc zostanie zbadany mechanizm pośredniczonej przez RirA regulacji RfaH poprzez wykorzystanie transkrypcji *in vitro* i użycie matryc, które posiadają miejsce pauzowania *ops* oraz dobrze scharakteryzowane sygnały terminacji. Modyfikacja aktywności RfaH przez RirA zostanie zanalizowana poprzez wykorzystanie kompleksów zatrzymanej transkrypcyjnej elongacji (TECs), do których dodane zostaną: RfaH i RirA. Zmiany strukturalne w RfaH, powstałe na skutek inkubacji z RirA, będą analizowane spektroskopią FT-IR oraz poprzez pomiar przesunięć chemicznych. Będą także przeprowadzone doświadczenia, mające na celu poznanie, w jaki sposób *rirA* mRNA jest generowane *in vivo*. W tym celu zostaną użyte szczepy, które posiadają specyficzne mutacje, wpływające na dojrzewanie RNA, takie jak mutanty *rne* i *rnc*.

FkpB-zależne fałdowanie i aktywność koniecznego do życia ABC transportera LptB oraz wpływ na aktywność RpoE - Podczas charakteryzowania niepolarnych mutacji, które indukują transkrypcję genu *rpoE*, przeprowadzone przez mnie badania pokazały, że mutanty $\Delta fkpB$ posiadają 2-3-krotnie zwiększoną aktywność promotora *rpoEP3*. FkpB koduje izomerazę *cis/trans* peptydylo-prolilową, a członkowie jej rodziny charakteryzują się zachowawczością ewolucyjną. Co jest interesujące, zaobserwowałam, że w doświadczeniach typu „pull-down” białko FkpB współoczyusza się z LptB oraz z kompleksem RpoE/RseA. LptB jest konieczne do translokacji LPS. W związku z tym kilka wariantów FkpB, z mutacjami w miejscu wiązania substratu lub w miejscu aktywnym, zostało skonstruowanych na plazmidach, jak również wprowadzonych do chromosomu ze znacznikiem FLAG w C-końcu. Przez wykorzystanie wiązania FkpB do mikromacierzy peptydowych zostanie sprawdzone, czy wyżej

wymienione białka są rzeczywiście substratami FkpB, a oddziaływania będą zbadane ilościowo za pomocą ITC. Jeżeli LptB jest *bona fide* substratem FkpB, to zostanie zanalizowany status fałdowania LptB oraz wpływ na translokację LPS. Ponadto różne mutanty FkpB, które utraciły zdolność rozpoznawania substratów, będą testowane pod względem ich aktywności PPIazowej oraz zanalizowane pod kątem zmian strukturalnych.

Post-transkrypcyjna regulacja *rpoE* mRNA - Podczas mapowania miejsc startu transkrypcji przy użyciu 5' RACE, *rpoE* mRNA, zwłaszcza w 5' UTR, ulega processingowi w kilku miejscach. Tak więc zostanie zbadany proces dojrzewania *rpoE* mRNA ze szczepu typu dzikiego, z izogenicznych mutantów *rne*, *rnc*, *rppH* oraz z innych mutantów. Następnie zostanie przeprowadzona analiza metodą 5' RACE w obecności lub przy braku egzonukleazy terminatorowej (TEX) i przy użyciu kwaśnej pirofosfatazy z tytoniu (TAP) w celu odpowiedzenia na pytanie czy występuje jakikolwiek wpływ na relatywne wykorzystanie różnych promotorów w powyższych mutantach. Dojrzewanie RNA stanowi kluczowy, regulatorowy etap w kontroli ekspresji genów i tym samym jest niezmiernie ważne. Jest również bardzo prawdopodobne, że degradacja/translacja *rpoE* mRNA jest regulowana przez funkcjonujące poprzez parowanie zasady sRNA, takie jak SlrA, a zagadnienie to jest obecnie przedmiotem moich intensywnych badań.

Podczas badania regulacji i funkcji SlrA sRNA oraz wielokopijnej supresji mutantów $\Delta lapB$, okazało się, że nadekspresja *slrA* tłumi toksyczną indukcję RpoE. Stwierdzono to poprzez zaobserwowanie redukcji transkrypcji genu *degP*, którego transkrypcja jest pozytywnie regulowana przez RpoE (Klein *et al.*, 2014). Tak więc bardzo prawdopodobne jest to, że nadekspresja *slrA* sRNA hamuje syntezę RpoE, zapewniając kontrolę ujemnego sprzężenia zwrotnego, ponieważ synteza *slrA* sRNA jest transkrypcyjnie regulowana przez RpoE. Nasze wcześniejsze badania, zgodnie z kontrolą ujemnego sprzężenia zwrotnego, wykazały, że w warunkach maksymalnej indukcji transkrypcji genu *rpoE* w mutantach $\Delta waaA$, kiedy LPS składa się tylko z pochodnych lipidu IV_A, ilość RpoE nie wzrasta znacząco, a stężenie RseA-wolne RpoE jest wyższe (Noor *et al.*, 2009). Tym samym wspomniany brak wzrostu RpoE można również wyjaśnić przez translacyjną represję wywieraną przez SlrA sRNA poprzez parowanie zasad. Analiza skonstruowanych fuzji translacyjnych do 5' UTR *rpoE* mRNA sugeruje, że SlrA może tworzyć pary zasad z *rpoE* mRNA. Zagadnienie to jest obecnie badane poprzez analizę mutacyjną.

Nowe strukturalne zmiany w LPS w warunkach indukujących RpoE - Podczas analizy LPS uzyskanych z kilku mutantów, które charakteryzują się hiperindukcją RpoE, jak mutanty $\Delta rseA$, został zidentyfikowany nowy polimer przyłączony do rdzenia LPS. Analiza chemiczna wykazała, że w polimerze tym brak jest fukozy, która jest obecna w M-antygenie, a masa nowego polimeru jest inna niż masa M-antygeny. Co jest interesujące, polimer ten również zaobserwowano w LPS z mutantów *hfq*. Istotnym jest to, że omawiany polimer jest obecny w glikoformach LPS skróconych o końcowy disacharyd, posiadających trzy reszty Kdo. W ten sposób miejsce przyłączenia nowego polimeru musi być inne niż miejsce dołączenia M-antygeny czy O-antygeny, ponieważ LPS z mutantów $\Delta rseA$ pozbawiony jest HepIV. W związku z tym struktura i miejsce przyłączenia nowego polimeru zostaną uzyskane z wykorzystaniem NMR i analizy kompozycji chemicznej.

Literatura

1. Dartigalongue, C., Missiakas, D. and Raina, S. (2001) Characterization of the *Escherichia coli* σ^E regulon. *J. Biol. Chem.* 276: 20866-20875.
2. Fresno, S., Jiménez, N., Canals, R., Merino, S., Corsaro, M. M., Lanzetta, R., Parrilli, M., Pieretti, G., Regué, M. and Tomás, J. M. (2007) A second galacturonic acid transferase is required for core lipopolysaccharide biosynthesis and complete capsule association with the cell surface in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189: 1128-1137.
3. Frirdich, E., Lindner, B., Holst, O. and Whitfield, C. (2003) Overexpression of the *waaZ* gene leads to modification of the structure of the inner core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharide, truncation of the outer core, and reduction of the amount of O polysaccharide on the cell surface. *J. Bacteriol.* 185: 1659-1671.
4. Gronow, S., Xia, G. and Brade, H. (2010) Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the

- inner core region of different lipopolysaccharides. *Eur. J. Cell Biol.* 89: 3-10.
5. Jansson, P.E., Lindberg, A.A., Lindberg, B. and Wollin, R. (1981) Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from Enterobacteraceae. *Eur. J. Biochem.* 115: 571-577.
 6. **Klein, G.**, Dartigalongue, C. and Raina, S. (2003) Phosphorylation-mediated regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 48: 269-285.
 7. **Klein, G.**, Lindner, B., Brabetz, W., Brade, H. and Raina, S. (2009) *Escherichia coli* K-12 suppressor-free mutants lacking early glycosyltransferases and late acyltransferases: minimal lipopolysaccharide structure and induction of envelope stress response. *J. Biol. Chem.* 284: 15369-15389.
 8. **Klein, G.**, Lindner, B., Brade, H. and Raina, S. (2011) Molecular basis of lipopolysaccharide heterogeneity in *Escherichia coli*: envelope stress-responsive regulators control the incorporation of glycoforms with a third 3-deoxy- α -D-manno-oct-2-ulosonic acid and rhamnose. *J. Biol. Chem.* 286: 42787-42807.
 9. **Klein, G.**, Müller-Loennies, S., Lindner, B., Kobylak, N., Brade, H. and Raina, S. (2013) Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*: incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. *J. Biol. Chem.* 288: 8111-8127.
 10. **Klein, G.**, Kobylak, N., Lindner, B., Stupak, A. and Raina, S. (2014) Assembly of lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the essential LapB heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 289: 14829-14853.
 11. **Klein, G.** and Raina, S. (2015) Regulated control of the assembly and diversity of LPS by noncoding sRNAs. *Biomed. Res. Int.* 2015: 153561.
 12. **Klein, G.**, Stupak, A., Biernacka, D., Wojtkiewicz, P., Lindner, B. and Raina, S. (2016) Multiple transcriptional factors regulate transcription of the *rpoE* gene in *Escherichia coli* under different growth conditions and when the lipopolysaccharide biosynthesis is defective. *J. Biol. Chem.* 291: 22999-23019.
 13. **Klein, G.** and Raina, S. (2017) Small regulatory bacterial RNAs regulating the envelope stress response. *Biochem. Soc. Trans.* (in press, April issue 2017).
 14. Missiakas, D., Betton, J.M. and Raina, S. (1996) New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* 21: 871-884.
 15. Moon, K. and Gottesman, S. (2009) A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* 74: 1314-1330.
 16. Murata, M., Fujimoto, H., Nishimura, K., Charoensuk, K., Nagamitsu, H., Raina, S., Kosaka, T., Oshima, T., Ogasawara, N. and Yamada, M. (2011) Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. *PLoS One* 6: e20063
 17. Müller-Loennies, S., Linder, B. and Brade, H. (2003) Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278: 34090-34101.
 18. Nikaido, H. (1996) Outer membrane in *Escherichia coli* and *Salmonella*: *Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, R. Curtiss, J.L. Ingraham *et al.*, Eds., American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA.
 19. Noor, R., Murata, M., Nagamitsu, H., **Klein, G.**, Raina, S. and Yamada, M. (2009) Dissection of σ^E -dependent cell lysis in *Escherichia coli*: roles of RpoE regulators RseA, RseB and periplasmic folding catalyst PpiD. *Genes Cells* 14: 885-899.
 20. Raetz, C.R. and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 635-700.
 21. Raina, S. and Georgopoulos, C. (1991) The *htrM* gene, whose product is essential for *Escherichia coli* viability only at elevated temperatures, is identical to the *rfaD* gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 3811-3819.
 22. Reynolds, C.M., Kalb, S.R., Cotter, R.J. and Raetz, C.R. (2005) A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the *eptB* gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an *eptB* deletion

mutant. *J. Biol. Chem.* 280: 21202-21211.

23. Santos, J.M., Freire, P., Mesquita, F.S., Mika, F., Hengge, R. and Arraiano, C.M. (2006) Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via σ^S proteolysis. *Mol. Microbiol.* 60, 177-188.
24. Tam, C. and Missiakas, D. (2005) Changes in lipopolysaccharide structure induce the σ^E -dependent response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55: 1403-1412.
25. Tran, A.X., Lester, M.E., Stead, C.M., Raetz, C.R., Maskell, D.J., McGrath, S.C., Cotter, R.J. and Trent, M.S. (2005) Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J. Biol. Chem.* 280: 28186-28194.
26. Zhou, Z., Lin, S., Cotter, R.J. and Raetz, C.R. (1999) Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH_4VO_3 in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, phosphoethanolamine, and palmitate. *J. Biol. Chem.* 274: 18503-18514.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Charakterystyka odpowiedzi na szok termiczny u bakterii morskiej *Vibrio harveyi*

1. Klein, G., Walczak, R., Krasnowska, E., Blaszcak, A. and Lipinska, B. (1995) Characterization of heat-shock response of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 16: 801-811.
2. Kuchanny, D., Klein, G., Krzewska, J., Czyz, A. and Lipinska, B. (1998) Cloning of the *groE* operon of the marine bacterium *Vibrio harveyi* using a lambda vector. *Acta Biochimica Polonica*, 45: 261-270.
3. Klein, G., Zmijewski, M., Krzewska, J., Czeczotka, B. and Lipinska, B. (1998) Cloning and characterization of the *dnaK* heat shock operon of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Molecular and General Genetics*, 259: 179-189.
4. Klein, G., Laskowska, E., Taylor, A. and Lipinska, B. (2001) IbpA/B small heat-shock protein of marine bacterium *Vibrio harveyi* binds to proteins aggregated in a cell during heat shock. *Marine Biotechnology*, 3: 346-354.

Organizmy nie zawsze żyją w optymalnych dla siebie warunkach. Mogą na nie działać czynniki szkodliwe lub stresowe, z których wiele wywołuje denaturację białek. Najczęściej badanym i najbardziej klasycznym czynnikiem jest podwyższenie temperatury ponad wartość fizjologiczną. Organizm broni się przed skutkami działania czynników szkodliwych przez odpowiedź szoku termicznego. Odpowiedź ta jest silnie zachowawcza ewolucyjnie u wszystkich organizmów żywych. Sygnałem do inicjacji odpowiedzi jest pojawienie się w komórkach nieprawidłowo zwiniętych białek. Odpowiedź szoku termicznego polega na zwiększonej syntezie grupy białek zwanych białkami szoku termicznego Hsp. Wiele białek szoku termicznego jest reprezentowanych przez molekularne chaperony i proteazy. W trakcie badania odpowiedzi na szok termiczny u bakterii morskiej *Vibrio harveyi* zostało stwierdzone, że temperatura 39°C była najwyższą temperaturą, w której komórki *V. harveyi* były zdolne do prawidłowego wzrostu. Przeniesienie bakterii *V. harveyi* z temperatury 30°C do temperatury 39°C powodowało wzmożoną syntezę co najmniej dziesięciu białek, o migracji elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym z SDS-em odpowiadającej przewidywanej masie cząsteczkowej wynoszącej około: 90, 70, 58, 41, 31, 27, 22, 15, 14,5 i 14 kDa. Białka indukowane termicznie o masach cząsteczkowych: 70, 58, 41 i 14,5 kDa zostały zidentyfikowane odpowiednio jako homologi białek szoku termicznego bakterii *E. coli* DnaK, GroEL, DnaJ i GroES. Białko GroES_{*V.harveyi*} posiada niższą masę cząsteczkową (14,5 kDa) niż białko GroES_{*E.coli*}, migrujące w żelu poliakrylamidowym z SDS-em jako białko o masie cząsteczkowej 15 kDa (Klein *et al.*, 1995).

Badania te również wykazały, że białko o masie cząsteczkowej około 43 kDa, immunologicznie reagujące z przeciwciałami przeciwko podjednostce sigma 32_{*E.coli*} (σ^{32}) polimerazy RNA, było indukowane przez szok termiczny i współczyszczało się z polimerazą RNA bakterii *V. harveyi*. Preparat zawierający czynnik sigma 32_{*V.harveyi*}, po dodaniu rdzenia polimerazy RNA bakterii *E. coli*, umożliwiał

specyficzną transkrypcję z promotorów szoku termicznego bakterii *E. coli* w warunkach *in vitro* (Klein *et al.*, 1995).

W ramach kontynuacji badań nad odpowiedzią szoku termicznego u *V. harveyi* zostały również zbadane wysoce zachowawcze ewolucyjnie białka GroEL i GroES. GroEL i GroES należą do molekularnych chaperonów (chaperoniny). Są one konieczne do prawidłowego składania wielu białek. W celu sklonowania genów *groEL* i *groES* została skonstruowana biblioteka genomowa *V. harveyi* w wektorze λ EMBL1. Ponadto sklonowane geny *groES* i *groEL* były badane pod względem zdolności komplementacji temperaturowrażliwości mutantów *groE* bakterii *E. coli* (Kuchanny *et al.*, 1998).

Następnie zostały sklonowane i zsekwencjonowane geny szoku termicznego *dnaK* i *dnaJ* bakterii *V. harveyi*. DnaK i DnaJ należą do molekularnych chaperonów i są głównymi białkami szoku termicznego. DnaK_{*V.harveyi*} ma 81,2% homologii z białkiem DnaK bakterii *E. coli*, DnaJ_{*V.harveyi*} ma 74,7% homologii z białkiem DnaJ bakterii *E. coli*. W doświadczeniach z wykorzystaniem hybrydyzacji typu „Northern”, RNA z komórek *V. harveyi* oraz sondy, obejmującej geny *dnaK*_{*V.harveyi*} i *dnaJ*_{*V.harveyi*}, został zaobserwowany pojedynczy, indukowany termicznie transkrypt, co sugerowało, że geny *dnaK*_{*V.harveyi*} i *dnaJ*_{*V.harveyi*} tworzą wspólny operon (Klein *et al.*, 1998).

Posługując się metodą „wydłużania startera”, przed genem *dnaK*_{*V.harveyi*} zostało zidentyfikowanych pięć indukowanych termicznie miejsc startu transkrypcji. Dwa z nich, oznaczone jako T1 i T4, są poprzedzone przez sekwencje, które posiadają wysoki stopień homologii z sekwencją najwyższego podobieństwa promotorów rozpoznawanych przez podjednostkę σ^{32} bakterii *E. coli*. Umiejscowienie tych promotorów w stosunku do miejsca startu translacji u bakterii *V. harveyi* jest bardzo podobne do tego, jakie występuje w genie *dnaK* bakterii *E. coli*. Nie zostały zaobserwowane żadne niezależne miejsca startu transkrypcji dla genu *dnaJ*_{*V.harveyi*}. Wyniki te potwierdziły, że geny *dnaK*_{*V.harveyi*} i *dnaJ*_{*V.harveyi*} tworzą jeden operon. Operon *dnaKJ*_{*V.harveyi*} ulegał transkrypcji w sposób zależny od podjednostki σ^{32} , a rozmiar transkryptu, kinetyka transkrypcji i miejsca inicjacji transkrypcji były podobne do tych, które są znane z komórek *E. coli*. Wskazuje to, że występuje wysoka zachowawczość ewolucyjna elementów transkrypcyjnej regulacji szoku termicznego u bakterii *V. harveyi* i bakterii *E. coli*, organizmów należących do podgrupy proteobakterii γ -purpurowych (Klein *et al.*, 1998).

Również została zbadana zdolność sklonowanych genów *dnaK*_{*V.harveyi*} i *dnaJ*_{*V.harveyi*} do supresji mutacji w genach *dnaK* i *dnaJ* bakterii *E. coli*. Stwierdzono, że białko DnaJ_{*V.harveyi*} znosiło fenotyp temperaturowrażliwości mutantów *E. coli dnaJ* i pozwalało na wzrost faga λ w komórkach tych mutantów. Białko DnaK_{*V.harveyi*} nie umożliwiała wzrostu mutantom *E. coli dnaK* w temperaturze niepermissywnej (42°C), lecz zezwalało na wzrost faga λ w komórkach mutantów z delecją genu *dnaK*. Białko DnaK_{*V.harveyi*}, w przeciwieństwie do białka DnaJ_{*V.harveyi*}, nie modulowało odpowiedzi na szok termiczny u bakterii *E. coli*. Uzyskane wyniki sugerują, że białko chaperonowe DnaK jest bardziej specyficzne gatunkowo niż białko chaperonowe DnaJ (Klein *et al.*, 1998).

Wiele gatunków bakteryjnych posiada homologi białek IbpA i IbpB. IbpA i IbpB są 16 kDa białkami należącymi do rodziny małych białek szoku termicznego (sHsp). sHsp są molekularnymi chaperonami, które wiążą się do ciał inkluzyjnych i zapobiegają agregacji nienatywnych białek podczas szoku termicznego. Wykazano, że bakteria morska *V. harveyi* posiada pojedyncze białko sHsp, które jest bardzo silnie indukowane przez szok termiczny i reaguje z przeciwciałami przeciwko białkom IbpA/B z *E. coli*. 26 aminokwasów N-końca badanego białka z *V. harveyi* wykazuje wysoką homologię do białek IbpA i IbpB z *E. coli*: odpowiednio 73% i 54% identyczności. Frakcja S, przygotowana z komórek *V. harveyi* poddanych szokowi termicznemu, posiadała zagregowane wewnątrzkomórkowo białka w następstwie szoku cieplnego. We frakcji S występowała również duża ilość białka IbpA/B. Wyniki te wskazują, że IbpA/B_{*V.harveyi*} wiąże się z białkami, które agregują w komórkach *V. harveyi* podczas szoku termicznego (Klein *et al.*, 2001).

b) osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Badanie regulacyjnych mechanizmów i funkcji odpowiedzi na szok termiczny oraz odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny

Klein, G., Dartigalongue, C. and Raina, S. (2003) Phosphorylation-mediated regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 48: 269-285.

Po zidentyfikowaniu RseA jako czynnika anty-sigma względem RpoE zaproponowano, że główna aktywność RpoE jest ustalana przez jego sekwestrację do błony wewnętrznej przez RseA. Dalsze badania wykazały, że w warunkach stresu RseA ulega degradacji, a RpoE jest uwalnianie i może tworzyć kompleks z polimerazą RNA. Jednak model ten nie wyjaśnia braku zwiększenia ilości RpoE nawet w warunkach indukujących RpoE. Nie było wiadomo, czy zmiany w powinowactwie pomiędzy RpoE i RseA odgrywają rolę w regulacji aktywności RpoE i RseA. Tak więc, aby w pełni zrozumieć mechanizm regulacji RpoE, poszukiwano *trans*-działających mutacji w genach innych niż gen *rpoE*, które znacząco zmniejszały aktywność regulonu *rpoE*. Zmapowano takie mutacje i sklonowano odpowiednie geny. Doprowadziło to do identyfikacji genu *etp*, kodującego fosfatę tyrozynową. Mutanty *etp* miały znacznie zredukowaną aktywność σ^E . Sklonowany gen *etp* poddano ekspresji, a jego produkt oczyszczono. Następnie pokazano, że gen *etp* jest ko-transkrybowany z genem kodującym potencjalną kinazę oznaczoną Etk. Białka Etk i Etp zostały oczyszczone i pokazano, iż rzeczywiście posiadają one *in vitro* odpowiednio aktywność kinazy tyrozynowej i fosfatazy tyrozynowej. Aby odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób Etp i Etk mogą modulować aktywność RpoE/RseA, zostały zmutowane różne reszty Tyr w domenie N-terminalnej RseA oraz w RpoE. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że Etk może odwracalnie fosforylować RseA w pozycji aminokwasowej Tyr-36 zlokalizowanej w cytoplazmatycznej, N-terminalnej domenie RseA. Analiza mutacyjna RseA Tyr-36Ala ujawniła, że zmutowane białko, w przeciwieństwie do białka RseA typu dzikiego, nie ulega fosforylacji.

Dalsza charakterystyka genu *etp* i jego funkcji wykazała, że mutanty *etp* mają obniżoną aktywność promotorów szoku cieplnego, które są kontrolowane przez podjednostkę sigma szoku termicznego RpoH. Kolejną szczegółową analizą wykazała, że w mutantach *etp* ma miejsce akumulacja σ^{32} w formie ufosforylowanej. Badaniach fosforylacji *in vitro*, z użyciem oczyszczonego czynnika sigma RpoH oraz Etk, pokazały Etk-zależną fosforylację RpoH. Mutacyjne zastąpienie poszczególnych reszt Tyr w RpoH przez Ala, a następnie oczyszczenie takich zmutowanych białek RpoH ustaliło, że Etk fosforyluje RpoH w reszcie Tyr-260, znajdującej się w wysoce zachowawczym ewolucyjnie regionie 4.2. W ten sposób wykazano, że tylko jedna z siedmiu reszt tyrozynowych jest fosforylowana (Klein *et al.*, 2003). Stosując doświadczenia *in vitro* typu „run-off” pokazano, że fosforylacja RpoH hamuje jego aktywność w rozpoznawaniu promotorów szoku termicznego. Wyniki te były pierwszym raportem o fosforylacji jakichkolwiek podjednostek sigma, opierającym się na raczej rzadkim wykorzystywaniu fosforylacji tyrozynowej u prokariotów. Fosforylacja w regionie 4.2 ponadto ujawniła, że rejon ten, oprócz funkcji rozpoznawania sekwencji -35 promotorów, jest kluczowym celem dla regulacji poprzez unikalny mechanizm, który powoduje pośredniczoną przez fosforylację atenuację aktywności RpoH. Co więcej, w celu regulacji odpowiedzi szoku termicznego fosforylacja ta ma charakter odwracalny dzięki aktywności fosfatazy tyrozynowej oznaczonej jako Etp. Zgodnie z wynikami *in vitro* wykazano, że brak *in vivo* fosfatazy (aktywności Etp) prowadzi do hiperfosforylacji RpoH i spadku o 50% podstawowego poziomu aktywności $E\sigma^{32}$ -transkrybowanych promotorów szoku termicznego, takich jak promotor *groE* czy *rpoD*Phs. Poparciem powyższych wyników jest fakt, że defosforylowany RpoH w zrekonstruowanym kompleksie $E\sigma^{32}$ odzyskał zdolność do transkrypcji σ^{32} -zależnych promotorów. A zatem fosforylacja RpoH w Tyr-260 zmienia wiązanie do rdzenia polimerazy RNA bądź rozpoznanie promotora i stąd redukuje transkrypcję promotorów szoku termicznego. Na podstawie powyższych wyników został zaproponowany model, według którego w warunkach fizjologicznych część cząsteczek białka RpoH jest ufosforylowana, a forma ta jest nieaktywna. Ponieważ fosforylacja jest procesem odwracalnym opartym na aktywności fosfatazy Etp, umożliwia to komórce utrzymywanie puli nieaktywnych cząsteczek RpoH, które mogą łatwo ulegać defosforylacji w momencie stresu, na przykład w podwyższonej temperaturze. Model taki zakłada zmianę aktywności bądź ilości fosfatazy i kinazy wraz ze wzrostem temperatury lub na skutek innych warunków stresowych.

Noor, R., Murata, M., Nagamitsu, H., Klein, G., Raina, S. and Yamada, M. (2009) Dissection of σ^E -dependent cell lysis in *Escherichia coli*: roles of RpoE regulators RseA, RseB and periplasmic folding catalyst PpiD. *Genes to Cells* 14: 885-899.

Aby zrozumieć mechanizm σ^E -zależnej lizy komórkowej, zbadaliśmy wpływ delecji regulatorów *rpoE*, kodowanych przez *rseA*, *rseB* i *rseC*, na transkrypcję σ^E , na poziomy wolnego σ^E w porównaniu z ilością σ^E związaną z błoną oraz na czynnik/czynniki ograniczające w biogenezie OMP, które mogą mieć wpływ na lizę komórkową. RT-PCR wykazała, że pojedyncze, niepolarne delecje $\Delta rseA$ i $\Delta rseB$ w różnym

stopniu zwiększały ekspresję *rpoE*, z wyraźną indukcją w mutancie $\Delta rseA$. Znaczącym jest to, że stosunek formy wolnej RpoE *versus* związanej z błoną był większy w szczepie $\Delta rseA$, jednakże bez zwiększenia całkowitej ilości RpoE, co wskazuje na dodatkową złożoność regulacji RpoE. W szczepie $\Delta rseA$ zaobserwowano znaczącą lizę komórkową, której towarzyszyły silnie zredukowane poziomy peryplazmatycznego czynnika fałdującego białka błony zewnętrznej PpiD. Fenotyp lizy komórkowej szczepu $\Delta rseA$ ulegał supresji albo przez gen *rseA* albo *ppiD* dostarczony z plazmidu, ale nie przez ani gen *rseB* ani *rseC*. Jednakże liza komórkowa szczepu dzikiego prawie całkowicie ulegała represji nie tylko przez klon *rseA*, ale również przez klon *rseB*, co sugeruje, że RseB może być czynnikiem ograniczającym *in vivo*. W ten sposób w mutantach *rseA* zwiększenie ilości wolnej σ^E w stosunku do tej związanej z błoną, z jednoczesną redukcją poziomu ilości PpiD i potencjalną rolą sRNA, może wpływać na σ^E -zależny proces lizy.

Ang, D., Keppel, F., **Klein, G.**, Richardson, A. and Georgopoulos, C. (2000) Genetic analysis of bacteriophage-encoded cochaperonins. *Annual Review of Genetics*, 34: 439-456.

Wczesne badania genetyczne zidentyfikowały geny *groES* i *groEL* u *E. coli*, gdyż mutacje w nich blokowały wzrost bakteriofagów λ i T4. Kolejne analizy genetyczne i biochemiczne wykazały, że GroEL i GroES tworzą maszynę chaperoninową absolutnie niezbędną do wzrostu *E. coli*, ponieważ jest ona potrzebna do prawidłowego fałdowania wielu jej białek. Mimo bardzo małej identyczności w sekwencji względem GroES, kodowane przez bakteriofaga T4 białko Gp31 oraz kodowane przez bakteriofaga RB49 białko CocO są *bona fide* ko-chaperoninami GroEL, które nawet są w stanie zastąpić GroES we wzroście *E. coli*. Główne rozróżnienie funkcjonalne polega na tym, że tylko Gp31 i CocO mogą asystować GroEL w prawidłowym fałdowaniu Gp23, które jest najważniejszym, bakteriofagowym białkiem kapsydowym. Zakonserwowane cechy strukturalne pomiędzy CocO i Gp31, które nie występują w GroES, podkreślają ich potencjalne znaczenie w specyficznej funkcji ko-chaperoninowej.

Klein, G. and Georgopoulos, C. (2001) Identification of important amino acid residues that modulate binding of *Escherichia coli* GroEL to its various cochaperones. *Genetics* 158: 507-517.

Doświadczenia genetyczne wykazały, że maszyna chaperonowa GroEL/GroES z *E. coli* jest absolutnie niezbędna, nie tylko do wzrostu bakterii, ale także dla propagacji wielu bakteriofagów, w tym λ . Wirulentne bakteriofagi T4 i RB49 są niezależne od funkcji GroES gospodarza, ponieważ kodują swoje własne białka ko-chaperonowe, odpowiednio Gp31 i CocO. Mutanty bakteryjne *E. coli groEL44* nie tworzą kolonii powyżej temperatury 42°C ani nie są zdolne do propagacji bakteriofagów λ , T4 czy RB49. Odkryliśmy, że powstanie zdecydowanej większości (40/46) spontanicznych, odpornych na temperaturę 43°C kolonii mutantu *groEL44* było spowodowane obecnością wewnątrzgenowej mutacji supresorowej. Supresory te zdefiniowały 21 różnych substytucji aminokwasowych w GroEL, wpływających na jedną z 13 różnych reszt aminokwasowych. Wszystkie te reszty aminokwasowe są zlokalizowane w tzw. zawiasie lub w jego pobliżu. Zawias ten reguluje duże ruchy *en bloc* apikalnej domeny GroEL. Każdy z wyizolowanych supresorów, w obecności allelu *groEL44*, umożliwiał w różnym stopniu wzrost bakteriofagów λ , T4 i RB49. Ponieważ wiadomo, że zmutowane białko GroEL nie oddziałuje efektywnie z Gp31, mutacje supresorowe powinny zwiększać wiązanie ko-chaperonu. Analogiczne badania supresorowe zostały przeprowadzone z temperaturowrażliwym allelem *groEL673*.

Shewmaker, F., Kerner, M.J., Hayer-Hartl, M., **Klein, G.**, Georgopoulos, C. and Landry, S. J. (2004) A mobil loop order-disorder transition modulates the speed of chaperonin cycling. *Protein Science* 13: 2139-2148.

Maszynie molekularnej, w czasie tworzenia i rozbijania wielkich intermolekularnych powierzchni, porządkują i zaburzają strukturę polipeptydów. Jednakże biologiczne znaczenie takich porządkowań oraz wiązań zostało ustalone tylko dla kilku systemów makromolekularnych. Porządkowanie i wiązanie mobilnych pętli ko-chaperoniny GroES towarzyszy ATP-zależnej zmianie konformacyjnej chaperoniny GroEL, która promuje fałdowanie białka-klienta. Po hydrolizie ATP, stan nieuporządkowania mobilnych pętli towarzyszy dysocjacji ko-chaperoniny, inwersji zmian konformacyjnych GroEL oraz uwolnieniu białka-klienta. Mutanty GroEL o „wysokim powinowactwie” zostały zidentyfikowane dzięki ich kompatybilności z mutantami ko-chaperoninowymi o „niskim powinowactwie” oraz niekompatybilności

z mutantami ko-chaperoninowymi o „wysokim powinowactwie”. Analiza kinetyk wiązania z zastosowaniem wewnętrznej fluorescencji wariantów ko-chaperonin zawierających tryptofan wykazała, że nadmierne powinowactwo powoduje pozostanie w konformacji, która tworzy się w obecności ATP. Destabilizacja struktury β -spinki do włosów utworzonej przez mobilne pętle przywraca normalną szybkość dysocjacji. W ten sposób energia swobodna uporządkowywania i zaburzenia mobilnej pętli działa jak bezwładność koła zamachowego silnika, modulując szybkość zmian konformacyjnych chaperoniny.

Brade, L., Heine, H., Raina, S., Klein, G., Di Padova, F., Brade, H. and Müller-Loennies, S. (2012) Immunization with an anti-idiotypic against the broadly lipopolysaccharide-reactive antibody WN1 222-5 induces *Escherichia coli* R3-core-type specific antibodies in rabbits. *Innate Immunity* 18: 279-293.

Mysie przeciwciała monoklonalne (mAb) WN1 222-5 rozpoznają węglowodanowy epitop w regionie rdzenia wewnętrznego LPS, który występuje u wszystkich szczepów *E. coli* oraz *Salmonella enterica*, i są zdolne do neutralizacji *in vitro* i *in vivo* endotoksycznych aktywności powyższych szczepów. Immunizacja myszy z mAb WN1 222-5 doprowadziła do otrzymania kilku antyidiotypicznych mAbs, z których jedne (mAb S81-19) konkurencyjnie hamowały wiązanie mAb WN1 222-5 do LPS z *E. coli* i *Salmonella*. Po immunizacji królików z mAb S81-19, odpowiedzi serologiczne względem LPS zostały scharakteryzowane w przedziałach czasowych przez ponad dwa lata. Podczas gdy serologiczna odpowiedź przeciwko przeciwciałom antyidiotypowym rozwinęła się zgodnie z oczekiwaniami, odpowiedź anti-antyidiotypowa względem LPS rozwijała się powoli a przeciwciała, które pojawiły się po 200 dniach, wiązały się do LPS *E. coli* o rdzeniu typu R3 i neutralizowały zdolności indukcji TNF- α w ludzkich peryferyjnych jednojądrzastych komórkach przez wymieniony LPS. Zostało opisane tworzenie nowych antyidiotypicznych przeciwciał, które po immunizacji królików mogą indukować przeciwciała reagujące z rdzeniem LPS. Również zostało zaprezentowane, że zasadniczo możliwe jest uzyskanie przeciwciał neutralizujących LPS poprzez antyidiotypową immunizację przeciwko mAb WN1 222-5. Mimikowany epitop prawdopodobnie posiada wspólne determinanty z epitopem WN1 222-5, jednak istnieją różnice w odniesieniu zarówno do powinowactwa, jak i specyficzności, ponieważ nie zaobserwowano wiązania do mniejszych oligosacharydów rdzenia wewnętrznego LPS.

Klein, G. and Raina, S. (2017) Small regulatory bacterial RNAs regulating the envelope stress response. *Biochemical Society Transactions* 45: 417-425 (invited review).

Większość bakterii koduje duży repertuar mechanizmów regulatorowych opartych na RNA. Ostatnie odkrycia ujawniły, że ekspresja wielu genów jest kontrolowana przez bogactwo parujących zasady niekodujących sRNA, regulatorowe białka wiążące RNA oraz enzymy degradujące RNA. Niektóre z tych regulatorowych procesów odpowiadają na warunki stresowe i są wymagane w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Jest to osiągnięte poprzez bezpośrednią post-translacyjną represję kilku mRNA, obejmującą blokowanie dostępu do rybosomów lub kierowanie mRNA do degradacji, gdy synteza kodowanych przez nie białek jest niepożądana albo przez zwiększenie translacji niektórych kluczowych, regulowanych przez stres czynników transkrypcyjnych. Niekodujące RNA, które regulują ekspresję genów poprzez wiązanie do białek regulatorowych/czynników transkrypcyjnych, często działają negatywnie przez sekwestrację, zapobiegającą rozpoznaniu elementu docelowego. Ponadto ekspresja wielu sRNA jest pozytywnie regulowana przez odpowiadające na stres czynniki sigma oraz systemy dwuskładnikowe, a z kolei niektóre z tych regulatorowych RNA mogą działać za pośrednictwem sprzężenia zwrotnego.

13.05.2017 Gracjana Klein-Raina