

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Veronika Klápšťová

Sekreční systém typu II u gramnegativních bakterií

Type II secretion system in gram negative bacteria

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha 2015

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za poskytnuté rady a pomoc při vypracování této bakalářské práce.

Prohlášení

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

V Praze, 07. 05. 2015

.....

Abstrakt

Tato práce popisuje stavbu a skládání sekrečního systému typu II, jenž se vyskytuje u některých gramnegativních bakterií, jako je například *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* či *Klebsiella oxytoca*, a transportuje jejich exoproteiny přes vnější membránu. Dále představí hypotetický mechanismus jeho činnosti a také několik důležitých substrátů, které jsou tímto systémem transportovány – toxiny, enzymy k získání živin a proteiny účastnící se bakteriálního metabolismu nebo pohybu. Na závěr se věnuje objevu tohoto sekrečního systému v mitochondriích některých protistů a jeho významu pro výzkum evoluce eukaryotních organismů.

Klíčová slova

Sekreční systém typu II, buněčný transport, gramnegativní bakterie, vnější membrána, sekretin, pseudopilus, toxiny, mitochondrie

Abstract

This thesis describes the structure and the assembly of the type II secretion system which is found in some gram negative bacteria such as *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* or *Klebsiella oxytoca* and which transports their exoproteins across the outer membrane. The thesis also presents some important substrates translocated by this system – toxins, enzymes and proteins involved in bacterial metabolism or motility – and hypothetical mechanism of the secretion. Conclusion is focused on the discovery of the secretion system in mitochondria of some protists and its importance for the research of the evolution of eukaryotic organisms.

Key words

Type II secretion system, cell trafficking, gram negative bacteria, outer membrane, secretin, pseudopilus, toxins, mitochondria

Obsah

1	Úvod	1
2	Membrány gramnegativních bakterií a proteinový transport	2
3	Složení a skládání T2SS	4
3.1	Komplex vnější membrány	4
3.2	Pseudopilus	7
3.3	Sekreční ATPáza.....	9
3.4	Komplex cytoplazmatické membrány	9
3.5	Skládání T2SS jako celku.....	12
4	Mechanismus sekrece pomocí T2SS.....	13
4.1	Pístový model sekrece	13
4.2	Šroubový model sekrece	14
5	Substráty transportované pomocí T2SS.....	16
5.1	Toxiny a virulenční faktory	16
5.1.1	Cholera toxin	16
5.1.2	Termolabilní enterotoxin <i>E. coli</i>	17
5.1.3	Exotoxin A.....	17
5.1.4	Chitináza <i>L. pneumophila</i>	17
5.1.5	Pektát-lyázy <i>D. dadantii</i>	18
5.2	Enzymy k zisku živin.....	18
5.2.1	Chitinázy <i>V. cholerae</i>	18
5.2.2	Alkalická fosfatáza <i>Caulobacter crescentus</i>	18
5.2.3	Celulázy <i>Cellvibrio japonicus</i>	19
5.3	Proteiny s jinou funkcí.....	19
5.3.1	Proteiny účastníci se oxidačně-redukčních dějů	19
5.3.2	Protein s vlivem na motilitu <i>L. pneumophila</i>	20
6	T2SS v mitochondriích eukaryot.....	21
7	Závěr	23
8	Seznam často používaných zkratk	24
9	Seznam použité literatury	25

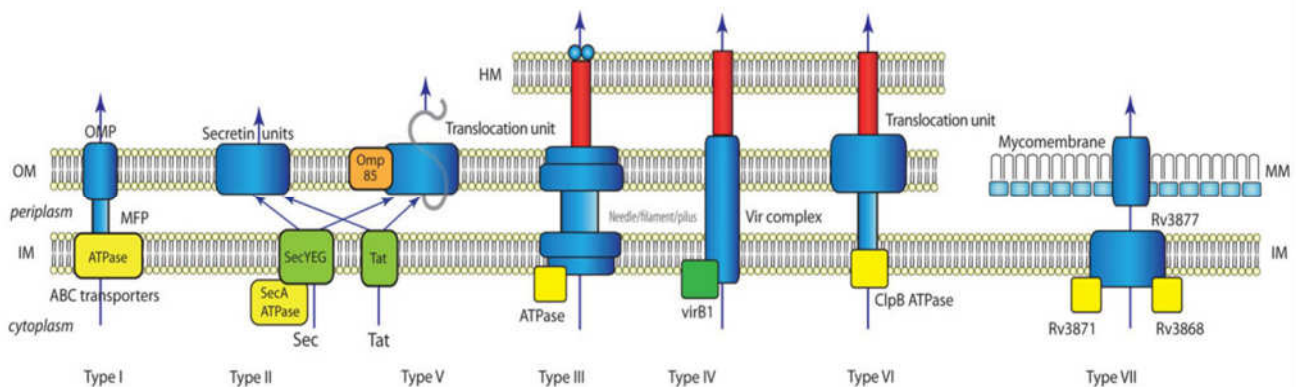
1 Úvod

Jednou z důležitých charakteristik gramnegativních bakterií je přítomnost dvou membrán. Vnější membrána přináší řadu výhod, ale zároveň některé problémy spojené s komunikací mezi buňkou a okolím. Gramnegativní bakterie proto musí obsahovat mnoho genů pro komplexy asistující při transportu nejrůznějších látek oběma směry přes tuto membránu. Příkladem takového asistenčního komplexu je i sekreční systém typu II (T2SS), jenž napomáhá translokaci bakteriálních proteinů do vnějšího prostředí. Tento systém byl doposud objeven u mnoha druhů bakterií, z nichž některé jsou původci závažných onemocnění člověka (*Vibrio cholerae*, určité patogenní kmeny *Escherichia coli* či *Legionella pneumophila*), případně působí citelné škody na zemědělských plodinách (*Dickeya dadantii* nebo *Xanthomonas campestris*). Kromě virulenčních faktorů patogenních bakterií se však pomocí T2SS transportují i enzymy rozkládající polymery za účelem zisku živin a proteiny účastnící se respiračního řetězce nebo napomáhající pohybu buněk. Substráty T2SS také hrají roli v mezidruhových interakcích v mikrobiálních společenstvech. V nedávné době byly některé části T2SS pozorovány v mitochondriích některých protistů ze skupiny Excavata, kteří jsou někdy považováni za jednu z nejpůvodnějších skupin eukaryot. Výzkum T2SS by tedy mohl přinést cenné poznatky o evoluci mitochondrií i eukaryotických organismů.

Cílem této práce je shrnout dosavadní znalosti o tomto sekrečním systému, představit podjednotky, z nichž je složený, a interakce mezi nimi. Také popíše nynější představy o mechanismu sekrece pomocí T2SS a vyjmenuje zajímavé substráty, které jsou jím transportovány. Poslední část práce pak bude věnovaná objevu podjednotek T2SS v eukaryotické mitochondrii.

2 Membrány gramnegativních bakterií a proteinový transport

Gramnegativní bakterie jsou kromě cytoplazmatické membrány obalené ještě další, vnější membránou. Mezi membránami se nachází tzv. periplazmatický prostor. Z hlediska transportu se jedná o značné zvýšení složitosti systému. Počet možností lokalizace proteinů v buňce se tím totiž rozšíří a látky určené pro sekreci z buňky musí místo jedné lipidické dvojvrstvy překonat dvě (Pugsley, d'Enfert, Reys, & Kornacker, 1990). U gramnegativních bakterií se proto vyvinulo několik komplexních sekrečních systémů, doposud jich bylo popsáno šest. Jak je vidět na obrázku 1, některé z nich (sekreční systémy typu I, III, IV a VI) přenášejí substrát jak přes cytoplazmatickou, tak i přes vnější bakteriální membránu, zbylé (sekreční systémy typu II a V) zajišťují sekreci pouze přes membránu vnější. V takovém případě musí být transportované proteiny nejdříve dopraveny do periplazmatického prostoru. K tomu slouží buď obecná sekretorická nebo Tat dráha. Obě se vyskytují nejen u gramnegativních, ale i u grampozitivních bakterií a dále u archeí a eukaryot (Tseng et al., 2009).



Obrázek 1: Přehled bakteriálních sekrečních systémů a zjednodušené znázornění jejich funkce. Sekreční systémy typu I až VI zajišťují transport proteinů u gramnegativních bakterií. Typ VII je vlastní mykobakteriím, které ačkoliv patří mezi bakterie grampozitivní, jsou také obklopené dvěma membránami. Sekreční systémy typu III, IV a VI jsou u některých patogenních bakterií důležité pro interakce s hostitelem – transportují proteiny přímo do hostitelské buňky. OM – vnější membrána, IM – cytoplazmatická membrána, HM – membrána hostitele, OMP – protein vnější membrány. Převzato z Tseng et al., 2009.

Hlavní složkou obecné sekretorické (Sec) dráhy je membránový heterotrimer SecYEG, k němuž je připojena ATPáza SecA poskytující energii pro transport. K Sec translokonu se proteiny dostávají dvěma způsoby – buď pomocí signál rozpoznávající částice (SRP) nebo SecB chaperonu (Tseng et al., 2009).

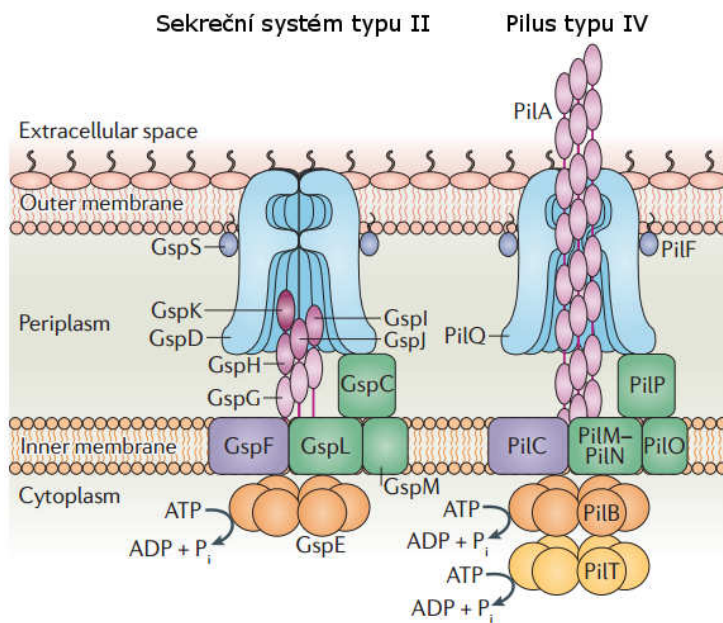
Tat (twin-arginin translokáza) transportuje přes cytoplazmatickou membránu již sbalené proteiny a jako signál pro translokaci vyžaduje v substrátu motiv se dvěma za sebou jdoucími argininy. Skládá se ze tří podjednotek TatA, TatB a TatC (Patel et al., 2014).

Sekreční systém typu II (T2SS) navazuje především na Sec dráhu, ale některé ze substrátů jsou do periplazmy přenášeny pomocí Tat dráhy.

T2SS byl objeven v polovině 80. let 20. století u *Klebsiella pneumoniae*, kdy se zjistilo, že okolí genu pro pullulanázu, enzymu katalyzujícího u těchto bakterií rozklad škrobu, je důležité pro sekreci pullulanázy do vnějšího prostředí (Enfert et al., 1987). Později byl nalezen u mnoha dalších druhů bakterií a zkoumán především kvůli své úloze v patogenezi.

3 Složení a skládání T2SS

U bakterií se T2SS skládá z 12 homologních proteinů a někdy i několika dalších, specifických pouze pro některé skupiny těchto organismů. Názvosloví částí T2SS není sjednocené, ale pro homologní proteiny se někdy používá předpona Gsp následovaná velkým písmenem. Toto názvosloví, které ve své práci budu používat i já, odkazuje na obecnou sekretorickou dráhu („General secretory pathway“), protože T2SS je u gramnegativních bakterií jejím hlavním pokračováním.



Obrázek 2: Srovnání sekrečního systému typu II a systému pro stavbu pilu typu IV. Homologie genů byla prokázána u GspD a PilQ, GspE a PilB, pseudopilinů a PilA a také u GspF a PilC. Podobnost ostatních proteinů je strukturní. Převzato z Korotkov et al., 2012.

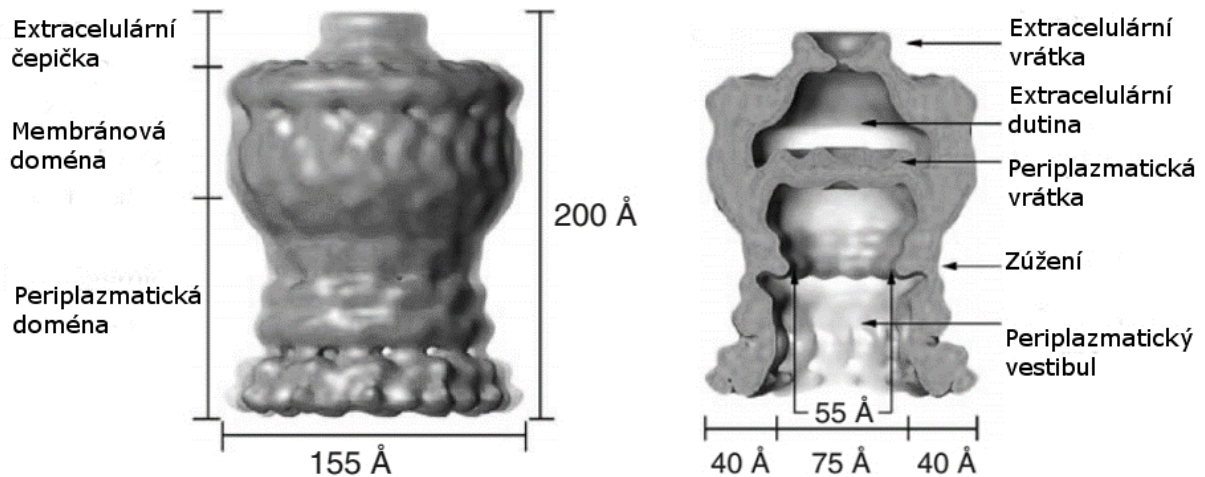
označované jako GspO), sekreční ATPázu (GspE), sekretin (GspD) a transmembránový protein z cytoplazmatické membrány (GspF) (Peabody, 2003) – a další ze složek těchto systémů vykazují podobnost strukturní (viz obrázek 2).

3.1 Komplex vnější membrány

Komplex vnější membrány je tvořen především proteinem GspD, patřícím do rodiny sekretinů. Ty můžeme dále nalézt nejen v systému pro skládání pilu typu IV, ale i v sekrečním systému typu III. Sekretin využívají také některé druhy bakteriofágů k opuštění bakteriální buňky. Všechny sekretiny vytvářejí ve vnější membráně velké kanály složené z 12 – 15 podjednotek (Korotkov et al., 2011). Studie prováděná u *V. cholerae* ukázala, že sekretinový kanál v T2SS obsahuje podjednotek 12. Jak je patrné z obrázku č. 3, tento kanál je rozdělen na tři části (periplazmatickou, membránovou a extracelulární), které jsou vzájemně oddělené vrátky. Na vnitřní straně kanálu je prostorný periplazmatický vestibul,

T2SS se sestává ze tří hlavních částí – komplexu cytoplazmatické membrány, komplexu vnější membrány, a tzv. pseudopilu. Ten dostal jméno kvůli podobnosti svých podjednotek s pilinem – proteinem tvořící bakteriální pilus typu IV. Sekvenční homologii s dalšími částmi T2SS vykazují také některé proteiny zajišťující skládání pilu typu IV. T2SS a systém pro skládání tohoto pilu jsou tedy s velkou pravděpodobností evolučně příbuzné (Hobbs and Mattick, 1993). Prokazatelná homologie byla nalezena u čtyř genů – pro prepilin-peptidázu (v T2SS

jenž je přibližně ve dvou třetinách délky zúžen a poté periplazmatickými vrátky oddělen od extracelulární dutiny. Následují extracelulární vrátka, kterými se protein dostává mimo bakteriální buňku a ve kterých na rozdíl od periplazmatických vrátek zůstává malý otvor i tehdy, když je kanál v uzavřeném stavu.



Obrázek 3: **Struktura sekretinového kanálu.** Model vytvořený na základě analýzy dodekameru GspD z *V. cholerae* pomocí kryoelektronové mikroskopie. Převzato z Reichow, Korotkov, Hol, & Gonen, 2010 a upraveno.

Kromě velké membránové C-koncové domény obsahuje GspD čtyři subdomény N0-N3, které tvoří periplazmatickou část sekretinového kanálu. Zatímco povrch extracelulární dutiny je uvnitř hladký, periplazmatický vestibul se skládá ze tří koncentrických kruhů. Ty odpovídají dodekamerům z prvních tří N-koncových subdomén. Dvanáct subdomén N3 se pak pravděpodobně nachází v místě zúžení (Reichow et al., 2010).

Na N-konci obsahuje GspD signální sekvenci pro Sec dráhu, pomocí níž se dostává přes cytoplazmatickou membránu do periplazmatického prostoru a která je po transportu odštěpena signální peptidázou. (Enferts et al., 1989). Studie na *K. oxytoca* ukázaly, že GspD vyžaduje pro zabudování do vnější membrány malý lipoprotein GspS, označovaný také někdy jako pilotin. Druhou funkcí GspS je zvyšování stability monomerů GspD, které se nacházejí v periplasmě (Shevchik and Condemine, 1998). Sekretin dokáže vytvářet správné multimery bez pomoci pilotinu. Ty se ovšem v takovém případě zabudovávají do cytoplazmatické membrány (Guilvout et al., 2006). U kmenů bakterií mutantních v GspS se také ve větší míře objevují degradační produkty sekretinu. Při zkoumání těchto kratších peptidů se zjistilo, že degradovaná bývá C-koncová doména (Hardie et al., 1996). S C-koncovou částí sekretinu interaguje také samotný pilotin. Tento vazebný úsek GspD bývá nazýván S-doména a vazbou pilotinu nabývá své sekundární struktury nezávisle na zbytku GspD. Jiné typy sekretinů S-doménu nemají. Pokud je k nim uměle připojena, jsou tyto sekretiny v nepřítomnosti

pilotinu méně stabilní než bez této domény. Naopak pomocí GspS jsou stabilizovány a správně zabudovány do vnější membrány (Daefler et al., 1997; Nickerson et al., 2011).

Pilotin je malý lipoprotein s čtyřmi α -helixy, který obsahuje hydrofobní žlábek, jenž je pravděpodobně vazebným místem pro S-doménu sekretinu (Tosi et al., 2011). Do periplazmatického prostoru se dostává pomocí Lol dráhy (Collin et al., 2011), která v bakteriích obecně zajišťuje transport lipoproteinů do vnější membrány. Skládá se z LolCDE, LolA a LolB, přičemž LolCDE je ABC transportér, přenášející lipoproteiny přes cytoplazmatickou membránu. LolA pak váže lipoproteiny v periplazmě a nasměruje je na LolB, což je protein vnější membrány, který zprostředkuje vlastní zabudování lipoproteinu (Zückert, 2014). Poté, co pilotin projde přes LolCDE, naváže se na LolA a GspD. Monomery GspD tedy pravděpodobně putují periplazmou v komplexu s GspS a LolA. Jakmile jsou takto navedeny do vnější membrány, tvoří zde multimerní kanál nejspíše bez asistence dalších proteinů. Pokusy na *Klebsiella oxytoca* ukázaly, že jednu z funkcí pilotinu lze nahradit, pokud se ze sekretinu uměle vytvoří lipoprotein. Po acylaci N-konce GspD mastnou kyselinou se sekretin správně vkládá do vnější membrány i bez přítomnosti GspS. Bakterie s takto upraveným sekretinem přesto nejsou schopné sekretovat pullulanázu, neboť druhou funkci – ochranu sekretinu před degradací – se acylací sekretinu zastoupit nepodařilo (Collin et al., 2011).

V genomech některých druhů (konkrétně u *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *A. hydrophila*, *X. campestris* a enterotoxigenní *E. coli*) chybí geny kódující homology pilotinu a jejich funkce je zde zastoupena jiným mechanismem (Korotkov et al., 2012).

P. aeruginosa má k dispozici dva funkční sekreční systémy typu II. Jeden z nich, označovaný jako *hxc*, slouží k sekreci alkalické fosfatázy – enzymu odštěpujícího fosfát z organických sloučenin. Exprese genů tohoto systému se spouští při limitaci fosfátem (Ball et al., 2002), přičemž nedochází k expresi specifického pilotinu. Homolog sekretinu, HxcQ, je ovšem sám lipoprotein a jeho lipidická kotva na N-konci zajišťuje správné vložení sekretinu do vnější membrány. Po jejím odstranění se sekretin vkládá do membrány cytoplazmatické – stejně jako při odstranění genu pro pilotin z *K. oxytoca* (Viarre et al., 2009).

I genom *E. coli* obsahuje dva T2SS, označované jako T2SS α a T2SS β . Zatímco nepatogennímu kmenu K-12 chybí pro T2SS β podstatná část genů, enterotoxigenní kmeny ho kódují celý a transportují s jeho pomocí svůj termolabilní enterotoxin. Jiné kmeny mají v genomu oba sekreční systémy. Operon T2SS β obsahuje navíc tři geny, které nemají homology mezi T2SS jiných druhů. Jeden z nich, YghG, je lipoproteinem vnější membrány a pravděpodobně zastává funkci pilotinu (Strozen et al., 2012). Také u *V. cholerae* byl objeven s GspS strukturně nepříbuzný pilotin označovaný jako AspS (Dunstan et al., 2013).

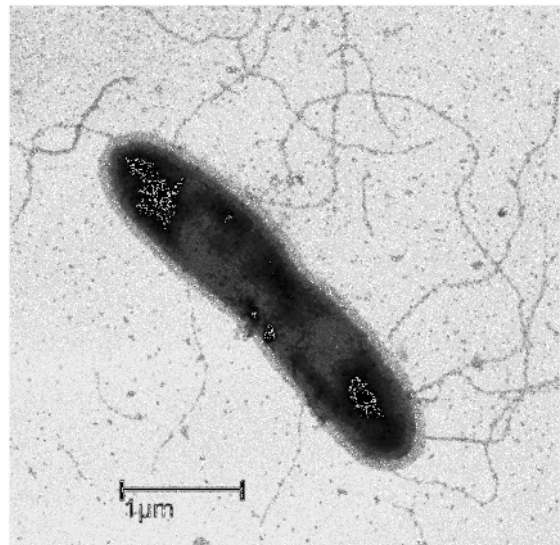
Sekreční systém *A. hydrophila* obsahuje v cytoplazmatické membráně ExeAB, komplex vážící peptidoglykan. Jeho druhou funkcí je napomáhat multimerizaci sekretinu a správně ho nasměrovat do vnější membrány. Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému se zjistilo, že zatímco ExeA se sekretinem nijak neinteraguje, ExeB s ním vytváří silnou vazbu. Pro sekreci je ovšem nezbytná i vazba ExeA k peptidoglykanu (Ast et al., 2002; Li and Howard, 2010; Vanderlinde et al., 2014).

V genomu *D. dadantii* je sice obsažen gen pro GspS, ale zdá se, že na stabilizaci jejího sekretinu se podílí ještě další protein, OutB, jenž je zakotven v cytoplazmatické membráně a se sekretinem pravděpodobně interaguje přímo (Condemine and Shevchik, 2000).

3.2 Pseudopilus

Pseudopilus se skládá z pěti proteinů označovaných jako pseudopiliny – GspG, GspH, GspI, GspJ a GspK. Svůj název dostaly poté, co byla u *P. aeruginosa* prokázána sekvenční homologie hydrofobní části N-koncového α -helixu mezi proteiny PilA, hlavní složkou pilu typu IV, a prvními čtyřmi jmenovanými pseudopiliny (Bally et al., 1992). Poslední pseudopilin, GspK, byl objeven až později. Od ostatních pseudopilinů se totiž poněkud liší. Má vyšší molekulovou hmotnost a postrádá jinak konzervovaný aminokyselinový zbytek v N-koncové sekvenci (Bleves, 1998).

Po objevení homologie s pilinem vyvstala otázka, zda tyto proteiny netvoří vláknité komplexy i v rámci sekrečního systému. Byly prováděny pokusy na *E. coli* transformované vysokokopiovým plazmidem nesoucím geny pro sekreci pullulanázy z *K. oxytoca*, při nichž bylo na povrchu bakterií možno pozorovat pilům podobné struktury, jak ukazuje obrázek č. 4. Během analýzy těchto struktur se zjistilo, že se v nich vyskytuje především GspG, ostatní pseudopiliny se zde nepodařilo prokázat (Sauvonnet et al., 2000). Při dalším výzkumu bylo objeveno, že pilům podobné struktury se na povrchu buněk vytvářejí pouze při vysoké úrovni exprese sekrečních proteinů, ale že hladina sekrece v takovém případě zůstává stejná jako při nižší expresi. Zjistilo se, že za normálních okolností se pseudopilus tvoří mezi cytoplazmatickou a vnější membránou. Navíc se z něj podařilo vyizolovat i GspH a bylo tedy prokázáno, že minimálně jeden další typ pseudopilinu se v sekrečním pseudopilu vyskytuje, byť v nižší koncentraci (Hu et al., 2002).



Obrázek 4: Vláknité struktury na povrchu *E. coli* pozorované po její transformaci vysokokopiovým plazmidem nesoucím GspG. Tyto struktury byly značeny protilátkami proti GspG. Obsah jiných proteinů v nich nebyl prokázán. Převzato z Vignon et al, 2003.

Pro svou stěžejní roli ve stavbě pseudopilinu bývá GspG označován jako hlavní pseudopilin, ostatní čtyři pseudopiliny pak jako vedlejší. V pseudopilu jsou totiž zastoupeny v menším množství (Nunn and Lory, 1993). Jsou ale velmi důležité pro správné sestavení pseudopilu. Komplex čtyř vedlejších pseudopilinů se pravděpodobně nachází na špičce pseudopilu a mimo jiné brání tomu, aby vznikaly vláknité struktury tvořené hlavním pseudopilinem na povrchu buněk. Ty vznikají až při zvýšené expresi genů pro pseudopiliny, která vede ke stechiometrické nevyváženosti podjednotek pseudopilu. (Douzi et al., 2009)

Piliny tvořící pilus typu IV se skládají z N-koncového α -helixu, β -listu ze čtyř antiparalelních vláken a variabilní domény, tzv. $\alpha\beta$ -smyčky. Pseudopiliny mají podobnou strukturu, ale jejich $\alpha\beta$ -smyčky jsou konzervovanější a β -listy některých z nich obsahují jen 3 vlákna. GspG se vyznačuje charakteristickou konzervovanou sekvencí na C-konci $\alpha\beta$ -smyčky, kterou lze tedy pravděpodobně využít k odlišení od ostatních pseudopilinů (Alphonse et al., 2010). Ve struktuře GspG se navíc nachází místo, kde je koordinačně vázán vápenatý kation. Ten je klíčový pro správnou funkci pseudopilu. Za vazbu vápníku jsou zodpovědné dva aspartátové zbytky – pokud byly oba zaměněny za jinou aminokyselinu, nedocházelo vůbec k sekreci pomocí T2SS (Korotkov et al., 2009). GspK má k obvyklé struktuře pseudopilinů navíc další doménu, což je také důvodem jeho vyšší molekulové hmotnosti, a GspH a GspJ mají prodlouženou variabilní smyčku (Korotkov and Hol, 2008).

Piliny z pilů typu IV jsou syntetizovány jako prekurzory, tzv. prepiliny. Ty na N-konci nesou konzervovanou sekvenci šesti hydrofobních aminokyselin, po jejímž odštěpení se z prepilinu stává maturovaný pilin. Za štěpení je zodpovědná sekvencně specifická proteáza PilD (prepilin-peptidáza) (Nunn and Lory, 1991). Při výzkumu funkce prepilin-peptidázy u *P. aeruginosa* bylo zjištěno, že mutantům v *pilD* chybí i schopnost sekrece některých proteinů. Ty se místo toho hromadí v periplazmatickém prostoru (Strom et al., 1991). N-koncové procesování bylo posléze popsáno i u GspG, GspH, GspI, GspJ a GspK. Navíc bylo zjištěno, že nově odhalený N-konec pilinů a pseudopilinů je prepilin-peptidázou metylován (Bally et al., 1992; Bleves, 1998; Nunn and Lory, 1993). Prepilin-peptidáza je enzymem cytoplazmatické membrány (Nunn and Lory, 1991). Prekurzor hlavního pseudopilu (a nejspíš i prekurzory ostatních pseudopilinů) je působením prepilin-peptidázy vystaven po kotranslační inzerci do membrány. K té využívá Sec translokonu a signál rozpoznávající částice (SRP) (Francetic et al., 2007).

Pro skládání pseudopilu byl navržen následující model: V membráně interaguje GspI s GspJ, které poté iniciují vznik hlavní části pseudopilu tvořené GspG. K vedlejším pseudopilinům se přidává GspK. Vzniká tak komplex, jenž se posléze bude nacházet na špičce pseudopilu. GspH se také váže k tomuto komplexu, ale jeho funkce stále není jasná. Elongace pseudopilu probíhá pomocí přidávání GspG podjednotek, pravděpodobně až do té doby, než velká globulární doména GspK kontaktem se

sekretinovým pórem ve vnější membráně zabrání dalšímu prodlužování (Cisneros et al., 2012; Douzi et al., 2009; Korotkov and Hol, 2008).

3.3 Sekreční ATPáza

ATPáza, označovaná v T2SS jako GspE, se skládá ze tří domén – N1, N2 a C-koncové domény – a štěpením ATP poskytuje energii pro sekreci. Blízko konce se nachází místo, kde je čtyřmi cysteiny koordinovaný kation zinku. Jeho odstranění ovšem pouze sníží ATPázovou aktivitu, takže tento kovový ion není pro funkci tohoto enzymu nepostradatelný.

S N1 a C-koncovou doménou interaguje GspL, jeden z proteinů komplexu vnitřní membrány, který má nejspíše za úkol převádět energii k dalším částem sekrečního systému. Během nedávných pokusů se podařilo získat krystalovou strukturu GspE společně s cytoplazmatickou doménou GspL a bylo zjištěno, že GspL váže nejspíše i ATP ze sekreční ATPázy. Protože však GspL postrádá konzervované zbytky důležité pro ATPázovou aktivitu, tato vazba pravděpodobně není pro poskytování energie ostatním proteinům T2SS podstatná (Camberg and Sandkvist, 2004; Lu et al., 2014). Zato sekreční ATPáza je z tohoto hlediska nezbytná. Mutace aminokyselinových zbytků klíčových pro štěpení ATP v GspE vedla k neschopnosti T2SS transportovat proteiny (Patrick et al., 2011).

Zdá se, že GspE pracuje jako oligomer, nejspíše hexamer. Oligomerizace GspE výrazně zesiluje jeho ATPázovou aktivitu. Samotný GspE se však vyskytuje převážně jako monomer (Camberg and Sandkvist, 2004). Ochotu GspE tvořit oligomery s vysokou ATPázovou aktivitou možná zvyšuje právě GspL. Děje se tak pravděpodobně současným navázáním cytoplazmatické domény GspL a kyselých fosfolipidů jako je například kardiolipin nebo fosfatidylglycerol (Camberg et al., 2006). Hexamery GspE se zatím nepodařilo vyizolovat. Jejich krystalová struktura byla zkoumána pomocí Hcp1, o němž je známo, že sám dovede tvořit hexamery. Byl proto připraven fúzní protein GspE s Hcp1. Hcp1 se zformoval do podoby tzv. asistenčního hexameru, který umožnil multimerizaci GspE. Byly pozorovány dva typy hexamerů. Strukturní motiv jednoho z nich připomínal uspořádání ATPázy z homologního systému pro tvorbu pilu typu IV (Lu et al., 2013).

3.4 Komplex cytoplazmatické membrány

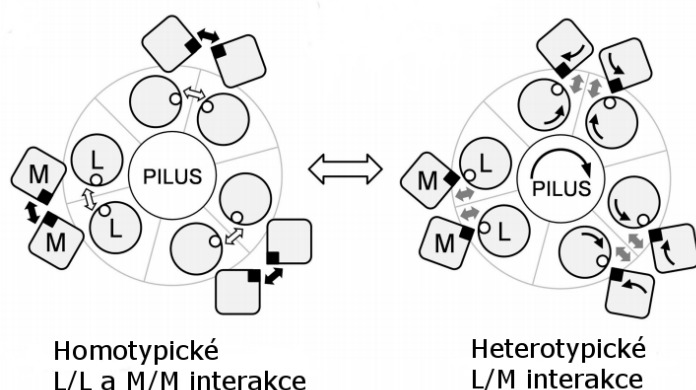
V cytoplazmatické membráně se z proteinů T2SS nacházejí GspL, GspM, GspF a GspC. Spojují sekretin a pseudopilus se sekreční ATPázou GspE.

GspL se skládá ze tří částí – cytoplazmatické domény, transmembránového helixu a periplazmatické domény (Py et al., 1999). Byly prokázány jeho interakce s hlavním pseudopilinem, stejně jako se sekreční ATPázou, jejíž aktivitu potřebuje pseudopilin pro polymeraci. Hlavní funkcí GspL

by tedy mohl být přenos energie z cytoplazmatické ATPázy GspE na podjednotky GspG. Interakce mezi GspL a GspE je nezbytná pro sekreci pomocí T2SS. Zajímavé je, že GspL je schopen vázat GspG až poté, co je prekursor tohoto pseudopilinu štěpen prepilin-peptidázou. To, že pouze tato forma je rozeznávaná GspL, je možná jedním z důvodů, proč nemůže být GspG před procesováním zabudován do pseudopilu (Gray et al., 2011; Sandkvist et al., 1995). Byly prokázány i interakce GspL a dvou vedlejších pseudopilinů GspJ a GspK (Douet et al., 2004).

Vazba GspL na GspE způsobí konformační změnu v obou těchto proteinech. Na této změně v GspL nejspíše závisí přenos energie ze štěpeného ATP až na hlavní pseudopilin, který má být polymerován (Gray et al., 2011; Py et al., 1999). GspL zřejmě zároveň svou vazbou podporuje oligomerizaci GspE a tím zesiluje jeho ATPázovou aktivitu (Camberg et al., 2006). Studium struktury GspL odhalilo, že jeho cytoplazmatická doména vykazuje značnou podobnost s ATPázami aktinového typu, přestože některé domény přítomné u ostatních členů této proteinové rodiny u něj chybí. Také vysoce konzervované ATPázové místo u něj nebylo nalezeno a ani nic jiného nenasvědčuje tomu, že by samotný GspL měl ATPázovou aktivitu (Abendroth et al., 2004).

Další protein, s nímž GspL interaguje, je GspM, který je také součástí komplexu cytoplazmatické membrány (Sandkvist et al., 1999). GspM prochází stejně jako GspL jednou přes membránu, jeho N-koncová cytoplazmatická doména je však mnohem kratší. Oba tyto proteiny jsou si strukturně podobné – jejich periplazmatické domény sdílejí tutéž variaci na tzv. feredoxinový motiv (zaujímají sekundární uspořádání $\alpha\beta\beta\text{-}\alpha\beta\beta$) a obě tvoří homodimery. I přes strukturní podobnost domén je však způsob tvorby dimerů odlišný (Abendroth et al., 2005, 2009). Bylo prokázáno, že tvorba komplexu s GspM je podstatná pro stabilitu GspL – v nepřítomnosti GspM je jeho degradace mnohem rychlejší (Abendroth et al., 2004). Jak GspL, tak i GspM se tedy shlukují v homodimery, ale zároveň interagují se sebou navzájem. Obě tyto vazby se však netvoří najednou a vazebná místa pro homodimerizaci a heterodimerizaci se proto nejspíše překrývají. Kompetice mezi těmito dvěma vazebnými partnery by mohla být důležitá pro mechanismus sekrece pomocí T2SS. Je možné, že při každém kroku polymerace se jeden typ vazby přepne na druhý typ, což vede k rotaci



Obrázek 5: Znárodnění modelu převodu energie ze štěpení ATP na pseudopilus. Podle Lallemand et al., 2013 může změna konformace sekreční ATPázy způsobit změnu vazeb mezi GspM a GspL. Cyklické střídání homotypických a heterotypických interakcí by vedlo k rotaci pseudopilu a uvolnění místa pro přidání dalších podjednotek GspG.

pseudopilu a přípravě na připojení dalšího pseudopilinu. Tento mechanismus je přiblížen na obrázku č. 5 (Lallemant et al., 2013).

GspF, další z proteinů komplexu vnitřní membrány, obsahuje tři transmembránové helixy a dvě větší cytoplazmatické domény. GspF tvoří v membráně komplex s GspE a GspL. GspF se však není schopen navázat na GspE bez přítomnosti GspL, zároveň ale není nutný pro vznik interakce mezi GspE a GspL. Tato skutečnost by mohla prozradit více o způsobu, jímž vzniká komplex cytoplazmatické membrány. Zdá se také, že přítomnost GspE a GspL zvyšuje stabilitu GspF (Arts et al., 2007; Py et al., 2001).

GspC nese jednu transmembránovou doménu, v cytoplasmě se nachází pouze krátký N-konec a jeho periplazmatická část se skládá ze dvou velkých domén – HR-domény a C-koncové PDZ-domény. Ze všech proteinů T2SS je jeho sekvence nejméně konzervovaná – periplazmatické části GspC některých druhů chybí PDZ-doména, která je v nich nahrazená coiled-coil doménou. Transmembránový helix slouží nejspíš nejen jako ukotvení – pokud byl GspC zbaven této části, pozbyl svou funkci (Bleves et al., 1999). Nedávno bylo dokázáno, že GspC pomocí transmembránové domény váže membránové části proteinů GspL a GspM. Opět by se mohlo jednat o důležitý způsob přenosu energie k sekretinovému komplexu (Lallemant et al., 2013).

HR-doména získala svůj název odvozením od slovního spojení „homology region“. Tato část je totiž přítomná u všech GspC. Podobá se dokonce i periplazmatické doméně z PilP, proteinu cytoplazmatické membrány z pilu typu IV, což by opět poukazovalo na jejich společnou evoluční minulost (Gu et al., 2012). PDZ-domény jsou malé, globulární domény, vyskytující se v proteinech různých organismů. Často hrají roli v interakcích mezi proteiny a jsou proto důležité i pro signalizaci v buňce. Také coiled-coil domény se podílejí na vazbě dalších proteinů (Bleves et al., 1999; van Ham and Hendriks, 2003). PDZ-doména v GspC má složení typické pro PDZ-domény bakterií – sestává se z šesti β -listů ohraničených dvěma α -helixy. Její vazebné místo je tvořeno hydrofobním žlábkem a je tak široké, že by mohlo vázat celý α -helix místo části proteinu v natažené konformaci, se kterou PDZ-domény obvykle reagují (Korotkov et al., 2006). V nedávné době bylo zjištěno, že jak PDZ-doména, tak i HR-doména se účastní rozpoznávání substrátu transportovaného pomocí T2SS a přímo s ním interaguje (Pineau et al., 2014). HR-doména navíc reaguje s periplazmatickou doménou GspD (Korotkov et al., 2006). Přítomnost sekretinu také zřetelně zvyšuje stabilitu GspC (Bleves et al., 1999).

Předpokládá se, že proteiny tohoto komplexu se do cytoplazmatické membrány zabudovávají pomocí Sec dráhy. O tom, jak přesně se tento komplex skládá, toho zatím není příliš známo, stejně jako o počtu monomerů jednotlivých proteinů zařazených do komplexu (Korotkov et al., 2012; Lallemant et al., 2013).

3.5 Skládání T2SS jako celku

Pomocí fúze s fluorescenčními proteiny byla zkoumána lokalizace GspD, GspC, GspL a GspM. Zjistilo se, že se tyto proteiny shlukují v buňce na určitých místech buněčné membrány a že toto shlukování není náhodné. Zatímco GspD nevyžadoval žádné další složky T2SS pro tvorbu takovýchto center výskytu, začlenění GspC vyžadovalo přítomnost GspD. GspM se shlukoval dokonce pouze v případě, že byly zároveň s ním exprimovány všechny tři ostatní proteiny (Lybarger et al., 2009). Na základě těchto pokusů byl navržen následující model pro skládání celého sekrečního systému typu II. Nejdříve se ve vnější membráně vytvoří sekretinový kanál, který pak skrze interakce s GspC zajistí sestavení komplexu vnitřní membrány, jehož složky se navzájem stabilizují. GspL poté zprostředkuje od sekreční ATPázy energii potřebnou pro polymeraci pseudopilinů, které jsou nahroučené v cytoplazmatické membráně poté, co byly procesovány prepilin-peptidázou (Gray et al., 2011). Tvorbu pseudopilu však iniciují především vedlejší pseudopiliny Gspl a GspJ a jeho skládání je do jisté míry nezávislé na přítomnosti ostatních složek T2SS. I bez nich se totiž v periplazmě mohou tvořit vláknité polymery pseudopilinů (Cisneros et al., 2012).

4 Mechanismus sekrece pomocí T2SS

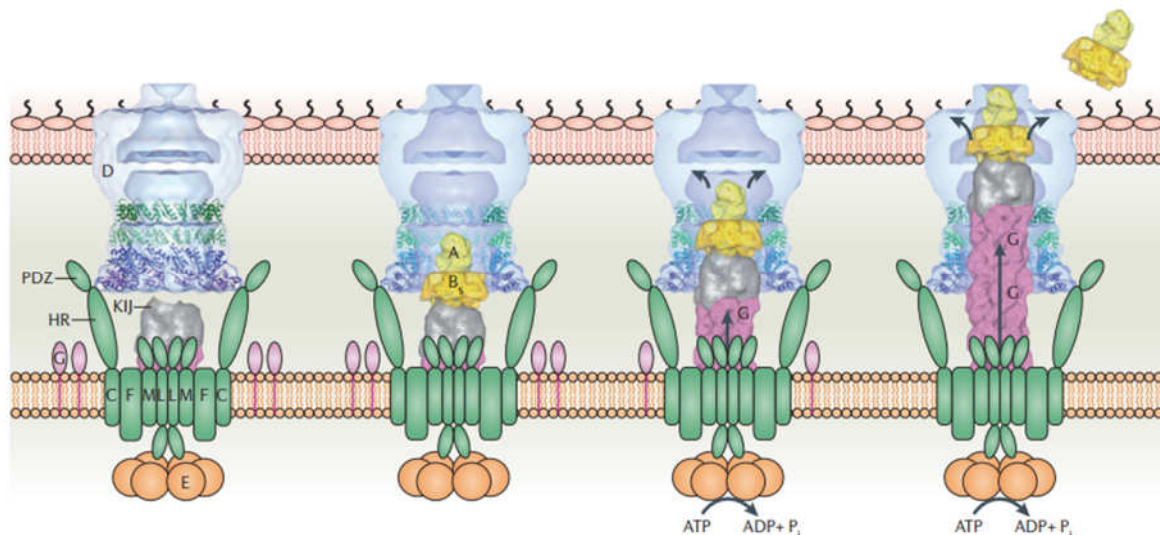
Sekreční systém typu II navazuje na obecnou sekretorickou dráhu a většina substrátů pro transport se do periplazmatického prostoru dostává pomocí Sec translokonu. Některé proteiny, jako je například fosfolipáza C u *P. aeruginosa*, k tomu ovšem využívají Tat dráhu (Voulhoux et al., 2001). Proteiny transportované Sec dráhou zaujmou v periplazmatickém prostoru nativní konformaci a teprve v tomto stavu jsou rozpoznány T2SS. Některé z nich obsahují disulfidické můstky, které je nutné správně vytvořit, jiné před průchodem vnější membránou multimerizují. Pokud se zabrání zaujetí správné konformace, hromadí se substrát v periplazmatickém prostoru (Hardie et al., 1995; Pugsley, 1992). Signálem pro transport pomocí T2SS bude proto spíše nějaký strukturní motiv nežli určitá sekvence (Douzi et al., 2011). Podařilo se identifikovat dlouhé a poměrně nespecifické oblasti, které sekreci ovlivňují, ale spektrum substrátů T2SS je velmi široké a stejně tak se často liší proteinové složení samotného sekrečního systému u různých organismů. Není proto snadné vypátrat motiv společný pro všechny ze substrátů. Přestože univerzální targetovací signál nebyl zatím nalezen, srovnáním struktur substrátů se ukázalo, že tyto proteiny bývají často bohaté na β -listy (Francetic and Pugsley, 2005; Korotkov et al., 2012). V nedávné studii na pektát lyáze Pell u *D. dadantii* ale byla objevena smyčka dlouhá 9 aminokyselin, jež je zjevně odpovědná za interakci s PDZ-doménou GspC a mohla by být tedy motivem přímo spouštějícím sekreci. Pozornost se proto obrátila k dalším substrátům transportovaným pomocí T2SS u této bakterie, aby byla zodpovězena otázka, zda se taková smyčka vyskytuje i u nich. Některé z nich ji skutečně obsahují – a právě u nich bude rozpoznávacím mechanismem jejich vazba PDZ-doménou. Zdá se ovšem, že jedna molekula substrátu může interagovat zároveň se dvěma PDZ-doménami z dvou různých GspC, které při rozpoznávání substrátu nejspíše kooperují. Dalšími částmi T2SS důležitými pro navázání transportovaných proteinů jsou HR-doména GspC a N0 a N1 domény GspD. Poslední ze jmenovaných zřejmě posiluje vazbu mezi PDZ-doménou GspC a substrátem. Jiné exoproteiny *D. dadantii* jsou ovšem transportovány nezávisle na PDZ-doméně a je zajímavé, že efektivita jejich sekrece je nižší. PDZ-doména tedy možná bude důležitým evolučním vylepšením tohoto sekrečního systému (Bouley et al., 2001; Pineau et al., 2014).

V současnosti existují dva hlavní modely mechanismu sekrece pomocí T2SS – v prvním pseudopilus funguje jako píst, který vytlačí substrát ven skrze sekretinový pór, v druhém pak pracuje na principu čerpadla známého jako Archimédův šroub (Nivaskumar and Francetic, 2014).

4.1 Pístový model sekrece

Pístový model sekrece (viz obrázek 6) byl zpočátku preferovanější a byl popsán ve vícero studiích. Transportní proces podle něj začíná navázáním substrátu ke špičce pseudopilu případně k periplazmatické doméně sekretinového kanálu, který je v tu chvíli v uzavřeném stavu. Substrát

interaguje s vedlejšími pseudopiliny GspH, GspI a GspK a také s GspC, čímž se spustí připojování GspG podjednotek. Pseudopilus narůstá a nese na svém vršku transportovaný protein. Kanál je však zatím zavřený. Jeho otevření je zajištěno kontaktem špičky pseudopilu se zúžením v oblasti N3 domény, který vyvolá konformační změnu. Protein se pomocí dalšího prodlužování pseudopilu dostane do vnějšího prostředí. Špička pseudopilu nejspíš nikdy neopustí vnitřek sekretinového póru, neboť periplazmatická vrátka jsou příliš úzká na to, aby jimi dokázala projít velká globulární doména vedlejšího pseudopilinu GspK (Douzi et al., 2011; Reichow et al., 2010). Na jedno složení pseudopilu podle tohoto modelu připadá jen jedna transportovaná molekula substrátu, poté by se měl pseudopilus zatáhnout zpět nebo se rozpadnout. Pilus typu IV obsahuje druhou ATPázu sloužící právě k tomuto účelu. U pseudopilu však podobná molekula nebyla doposud objevena. Je tedy možné, že jeho rozpad po ukončení sekrece není nijak organizovaný (Korotkov et al., 2012; Merz et al., 2000).

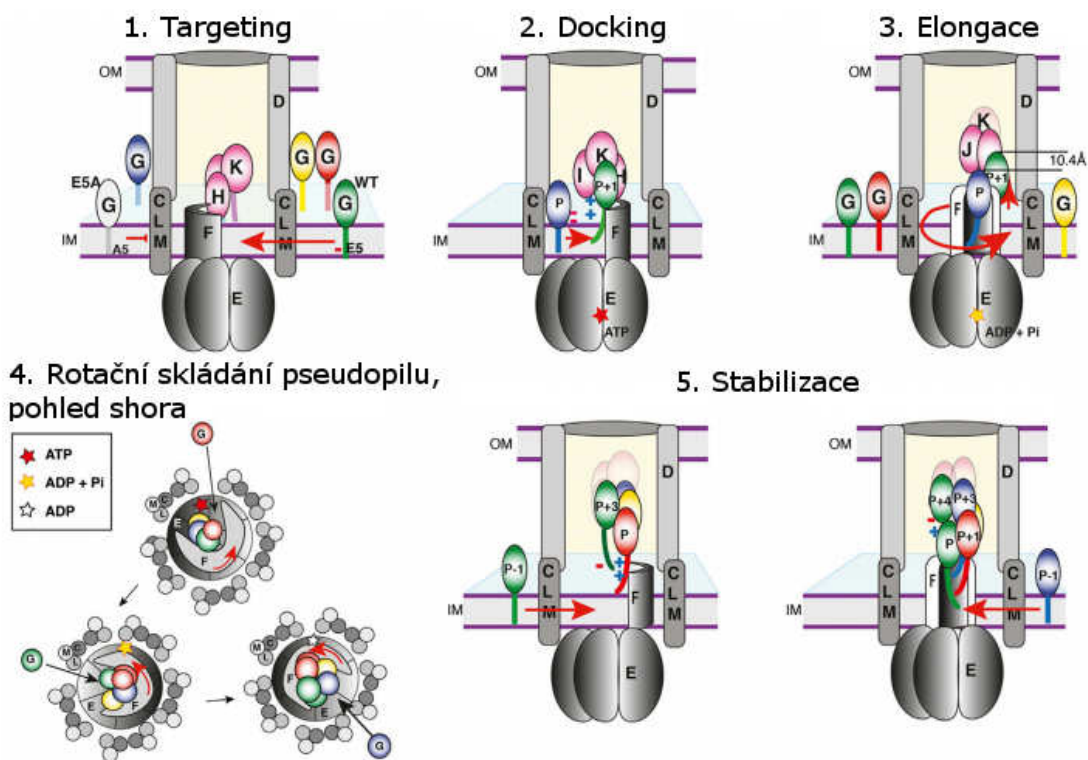


Obrázek 6: **Pístový model sekrece pomocí T2SS.** Do periplazmatického vestibulu sekretinu vstoupí substrát, který interaguje buď s GspC, GspD nebo s komplexem GspI-J-K. Některá z těchto vazeb stimuluje činnost sekreční ATPázy a růst pseudopilu. Substrát (v tomto případě cholera toxin) je nesen na špičce pseudopilu, dokud není uvolněn do extracelulárního prostoru. Převzato z Korotkov et al., 2012.

4.2 Šroubový model sekrece

Druhý z modelů sekrece přisuzuje klíčovou roli vlastnímu skládání pseudopilinů do podoby pravotočivé šroubovice, která se cyklicky otáčí díky energii ze štěpeného ATP. Substrát se může buď navázat na pseudopiliny, nebo se pouze zachytí ve žlábků šroubovice a otáčením je postupně vynesen ven z buňky jako se tomu děje při čerpání tekutiny pomocí Archimédova šroubu. Studium struktury pseudopilu nedávno přineslo nové poznatky a podpořilo spíše tento model. Podle něj vedlejší pseudopiliny pouze zajišťují iniciaci skládání pseudopilu, ale neúčastní se rozpoznávání substrátu. Předpokládá se, že podobně jako ATPáza ze systému pro skládání pilu typu IV i GspE pracuje ve třech

fázích. V první z nich se do vazebného místa naváže ATP, jehož hydrolyza vyvolá konformační změnu ve struktuře GspE. Ta se přes GspF přenese na vlastní pseudopilus, který se otočí. V třetí fázi je pak uvolněno ADP a sekreční ATPáza je připravena započít nový katalytický cyklus (Misić et al., 2010; Nivaskumar et al., 2014; Nunn, 1999). Tento model předpokládá, že jednou složený pseudopilus se účastní sekrece mnoha molekul substrátu. Přesto je nutné jeho délku regulovat, neboť rotace pseudopilu je způsobena neustálým přidáváním dalších podjednotek GspG. Na tom by se mohly podílet vápenaté kationty, které jsou vázány v hlavním pseudopilinu. Jejich odstranění by snižovalo stabilitu GspG tak, jako je tomu při zkracování pilu typu IV – v něm totiž zřejmě právě vápenaté kationty chrání piliny před účinky retrakční ATPázy. S ohledem na homologie těchto dvou systémů by se podobný mechanismus mohl uplatnit i zde, přičemž aktivním enzymem by mohla být nějaká dosud neobjevená proteáza (Nivaskumar and Francetic, 2014; Orans et al., 2010).



Obrázek 7: Šroubový model sekrece pomocí T2SS – skládání pseudopilu.

1. Molekuly GspG jsou nasměrovány ke komplexu GspJ-K a k GspF.
2. Protomer GspG (P) je připojen k předchozímu protomeru (P + 1) pomocí elektrostatických interakcí.
3. Hydrolyza ATP zapříčiní rotaci vznikajícího pseudopilu přes kontakt s GspF a zařadí tak do něj protomer P.
4. Pohled shora na vznikající pseudopilus ukazuje třífázovou práci sekreční ATPázy a těmto fázím odpovídající kroky ve skládání pseudopilu.
5. Po třech cyklech je P + 3 uvolněn z membrány a stabilizován. V následujícím kroku spolu interagují podjednotky P a P + 4, které se navzájem stabilizují.

Podjednotky T2SS jsou označeny příslušným písmenem, OM – vnější membrána, IM – cytoplazmatická membrán. Převzato z Nivaskumar et al., 2014 a upraveno.

5 Substráty transportované pomocí T2SS

Funkční T2SS byl objeven u řady druhů bakterií, včetně důležitých patogenů člověka jako je *V. cholerae*, enterotoxigenní a enterohaemorrhagická *E. coli*, *L. pneumophila*, *Yersinia enterocolitica* či *Pseudomonas aeruginosa*. Mezi bakterie využívající T2SS patří také bakterie napadající rostlinné (*Erwinia carotovora* na čeledi *Solanaceae* nebo *X. campestris* u *Brassicaceae*) nebo živočišné tkáně (*Aeromonas hydrophila* u ryb a obojživelníků) (Korotkov et al., 2012). Přestože sekrece toxinů pomocí T2SS byla hlavním důvodem studia tohoto transportního mechanismu, většina substrátů je určena k zisku živin – jedná se o různé enzymy rozkládající polymery na menší podjednotky transportovatelné do buňky. Dalšími substráty T2SS jsou adheziny a proteiny podstatné pro tvorbu biofilmu nebo cytochromy bakterií redukcující železo. Protože jsou tyto proteiny sekretovány v definitivní konformaci, mohou být již před transportem stabilizovány svými kofaktory. To je výhodou zejména pro bakterie žijící v nepříznivých prostředích – jako jsou například halofilní či hlubokomořské druhy (Nivaskumar and Francetic, 2014).

Protože je T2SS mezi bakteriemi poměrně široce rozšířen a u některých druhů transportuje velké množství proteinů, zaměřuje se tato kapitola pouze na lidské patogenní či ekonomicky významné bakterie případně na příklady, jež ilustrují diverzitu substrátů spjatých s tímto sekrečním systémem.

5.1 Toxiny a virulenční faktory

5.1.1 Cholera toxin

Cholera toxin vylučovaný *V. cholerae* pomocí T2SS (Sandkvist et al., 1997) je hlavním virulenčním faktorem této bakterie, zodpovědným za vodnaté průjmy při onemocnění zvaném cholera. Spolu s termolabilním enterotoxinem *E. coli* nebo pertusis toxinem patří mezi tzv. AB-toxiny. Ty dostaly svůj název podle charakteristické struktury. Obsahují A-podjednotku, která má katalytickou funkci, a B-podjednotku, zajišťující vazbu toxinu na receptor a jeho vstup do hostitelské buňky. Cholera toxin se řadí do podskupiny AB₅, kde na jednu A-podjednotku připadá pentamer složený z B-podjednotek. Je endocytován buňkami střevního epitelu a z endozomů se dostává do Golgiho aparátu a následně do endoplazmatického retikula. Odtud se poté uvolňuje do cytosolu A-doména (Merritt and Hol, 1995; Wernick et al., 2010). Ta způsobuje ADP-ribozylaci proteinu regulujícího funkci adenylát-cyklázy, což vede k prudkému nárůstu produkce cAMP. V reakci na to začnou intoxikované enterocyty vylučovat soli a vodu do lumen střeva. Tím dochází k těžké dehydrataci organismu, která může končit až smrtí (Spangler, 1992).

Studie sekretomu *V. cholerae* odhalila, že T2SS je v této bakterii zodpovědný za transport více proteinů, z nichž některé podporují funkci cholera toxinu. Jedním z nich je například sialidáza, která

šťěpí kyselinu sialovou obsaženou v hlenu chránícím střevní epitel a napomáhá tak odhalení receptoru pro cholera toxin (Sikora et al., 2011).

5.1.2 Termolabilní enterotoxin *E. coli*

Termolabilní toxin (LT) enterotoxigenní *E. coli* je strukturně i funkčně velmi podobný cholera toxinu a patří tedy opět mezi AB₅ toxiny. *E. coli* geny pro tento protein pravděpodobně získala horizontálním genovým přenosem od *V. cholerae*. Vznikl tak nový virulentní kmen, způsobující průjemové onemocnění lidí a hospodářských zvířat, které je příznaky zaměnitelné právě s cholerou (Yamamoto et al., 1987). Po objevení podobnosti mezi těmito dvěma toxiny se potvrdilo to, že i LT se z bakterií dostává pomocí T2SS (Tauschek et al., 2002). K úspěšnému dopravení LT do buňky hostitele je vyžadován přímý kontakt bakterie a enterocyty, nejspíše proto, že se tak zabrání neutralizaci toxinu protilátkami vyskytujícími se v lumen střeva. Bylo zjištěno, že lokalizace T2SS v *E. coli* není náhodná – sekreční aparát se vyskytuje především v blízkosti místa kontaktu s buňkou střevního epitelu. Je tak zajištěna co nejvyšší efektivita přenosu LT do enterocyty (Dorsey et al., 2006).

Kvůli velkému stupni homologie mezi cholera toxinem a termolabilním enterotoxinem se předpokládalo, že sekreční signál u obou těchto substrátů bude stejný a tudíž snadněji identifikovatelný. Přestože se potvrdilo, že sekreční signál je nejspíše strukturního, nikoliv sekvenčního charakteru, oba proteiny zřejmě nesou vlastní sekreční signál. Mutace zastavující sekreci daného toxinu v sekrečním systému z jedné bakterie neovlivňovaly sekreci v systému z bakterie druhé. Tento překvapivý výsledek naznačuje, že koevoluce T2SS a jeho substrátů v každém z organismů bude velmi těsná a že se obecný sekreční signál pravděpodobně nikdy nepodaří objevit (Mudrak and Kuehn, 2010).

5.1.3 Exotoxin A

Exotoxin A je jedním z toxinů *P. aeruginosa*, bakterie způsobující u oslabených jedinců chronické infekce, jako je například těžký zápal plic s vysokou mírou úmrtnosti (Brewer et al., 1996). *P. aeruginosa* využívá k transportu svých proteinů pět sekrečních systémů, většina virulenčních faktorů je pak substrátem sekrečního systému II nebo III (T3SS). Pro vývoj patogeneze je T3SS důležitější než T2SS – zatímco bakterie nesoucí pouze T3SS způsobovaly smrt pokusných zvířat téměř stejně rychle jako bakterie nemutované, u infekce kmeny s nefunkčním T3SS se doba přežití myší prodloužila, úmrtnost však přesto byla vysoká. Exotoxin A a další substráty T2SS tedy pravděpodobně také hrají roli v rozvoji zápalu plic zapříčiněného touto bakterií (Jyot et al., 2011).

5.1.4 Chitináza *L. pneumophila*

L. pneumophila je bakterie parazitující intracelulárně ve vodních a půdních prvocích a příležitostně i v makrofázích lidských plicních sklípků. V takovém případě způsobuje tzv. legionářskou nemoc, projevující se především jako zápal plic (Diederer, 2008). K transportu svých proteinů přes vnější membránu využívá *Legionella* sekrečního systému typu IV, který je nutný pro růst bakterií

v makrofázích a amébách, a typu II, taktéž podstatného pro schopnost napadat améby (Hales and Shuman, 1999; Segal et al., 1999). Nedávno byla v této bakterii potvrzena také existence funkčního sekrečního systému typu I (Fuche et al., 2015).

T2SS se u *L. pneumophila* podílí na sekreci minimálně 20 proteinů. Kromě různých lipáz a peptidáz byla v jejím sekretu identifikována i chitináza ChiA, která je pravděpodobně virulenčním faktorem důležitým pro rozvoj plicní infekce. Přestože chitináza nijak neovlivňuje její schopnost množit se v makrofázích, na myším modelu bylo ukázáno, že má podstatný vliv na přežívání této bakterie v plicích. Chitin, který je tímto enzymem štěpen, se vyskytuje mimo jiné i v buněčných stěnách různých mikroorganismů jako jsou například plísň. Jedním z vysvětlení významu přítomnosti chitinázy u *L. pneumophila* by mohlo být to, že poskytuje výhodu v kompetici s některými dalšími mikroorganismů osidlujícími plíce (DebRoy et al., 2006).

5.1.5 Pektát-lyázy *D. dadantii*

Hlavním virulenčním faktorem *D. dadantii* je vícero typů pektát-lyáz, enzymů štěpících pektin a tedy způsobujících degradaci rostlinné buněčné stěny. Tato bakterie totiž napadá rostlinná pletiva, například bramborové hlízy, v nichž vyvolává měkkou hnilobu, která je důsledkem lytické aktivity těchto enzymů (Reverchon and Nasser, 2013). Pektát-lyázy jsou do těla rostliny transportovány pomocí T2SS a štěpí na různých místech uvnitř pektinového polymeru (Tardy et al., 1997).

5.2 Enzymy k zisku živin

5.2.1 Chitinázy *V. cholerae*

V. cholerae dokáže růst ve dvou odlišných prostředích – v mořské vodě a v lidském trávicím traktu. Ve vodním prostředí má tendenci tvořit biofilm na podkladech obsahujících chitin, jako jsou například schránky zooplanktonu. Na adhezi k chitinu se podílí jeden ze substrátů T2SS, GbpA. Zdá se, že by zároveň mohl být důležitým virulenčním faktorem pro kolonizaci lidského střeva – zprostředkovává totiž nejen adhezi k chitinu, ale i k epiteliálním buňkám (Kirn et al., 2005; Pruzzo et al., 2008).

Kromě tohoto chitin vazebného proteinu jsou pro přežívání *V. cholerae* v mořském biotopu důležité i chitinázy transportované pomocí T2SS. Chitináza ChiA a další chitin štěpící enzymy objevené v sekretu *V. cholerae* slouží k zisku živin ze schránek korýšů a hmyzích vajíček, které jsou těmito bakteriemi osídleny (Connell et al., 1998; Sikora et al., 2011).

5.2.2 Alkalická fosfatáza *Caulobacter crescentus*

C. crescentus je bakterie žijící ve sladkých vodách, kde jsou organismy často ohroženy nízkou hladinou živin. Rod *Caulobacter* je velmi dobře adaptován právě na tuto chudá prostředí (Nierman et al., 2001). Jednou z látek, které ve vodě bývá nedostatek, je fosfát. Kromě anorganického zdroje lze

však získat fosfát i z organických sloučenin. K tomu ovšem musí být bakterie vybavena geny pro fosfatázy a také systémem informujícím o nedostatku fosfátu, aby byly tyto enzymy syntetizovány jen v případě potřeby. Jednou z molekul, kterou *C. crescentus* produkuje jen při hladovění na fosfát, je lipoprotein s fosfatázovou aktivitou ElpS. ElpS je zakotven ve vnější membráně a později uvolňován do okolí, kde vykazuje fosfatázovou aktivitu a zpřístupňuje tak fosfát bakterii. U bakterií mutantních v T2SS se ElpS nehromadil v periplazmatickém prostoru, ale zůstal asociovaný s vnější membránou. Do membrány se tedy dostává mechanismem nezávislým na T2SS, ale bez něj není schopen odpoutat se od bakteriálního povrchu. *C. crescentus* tedy pravděpodobně pomocí T2SS vylučuje do prostředí dosud nespecifikovanou proteázu, která odštěpí ElpS od jeho membránové kotvy (Le Blastier et al., 2010).

5.2.3 Celulázy *Cellvibrio japonicus*

C. japonicus je půdní saprofytní bakterie, která velmi efektivně degraduje buněčné stěny odumřelých rostlin. Pro tento způsob získávání uhlíku a energie má širokou enzymatickou výbavu a dokáže tak štěpit celulózu, pektin, škrob, chitin nebo xylan (DeBoy et al., 2008). Celulázy, které jsou substrátem T2SS, umožňují této bakterii využívat celulózu jako zdroj živin. Bylo prokázáno, že *C. japonicus* účinně rozkládá proso nebo kukuřičnou siláž, tedy suroviny, které se obvykle používají k výrobě biopaliva. Navíc je snadno transformovatelný pomocí genů pro další lytické enzymy. Má tedy potenciál k zařazení do výroby paliv z obnovitelných zdrojů (Gardner and Keating, 2010).

5.3 Proteiny s jinou funkcí

5.3.1 Proteiny účastníci se oxidačně-redukčních dějů

Některé bakterie umí použít jako terminální akceptor elektronů oxidované kovy, jako jsou například železité a manganaté oxidy či hydroxidy. Ty jsou redukovány, zatímco organická hmota je oxidována za uvolnění energie. Kovy v tomto stavu však bývají špatně rozpustné a nelze proto dopravit akceptor elektronů do buňky. Místo toho bakterie přenášejí elektrony na povrchy, v nichž jsou takové látky obsaženy. *Geobacter sulfurreducens* a *Shewanella oneidensis*, k tomu využívají multihemové cytochromy (Shi et al., 2009).

Cytochromy OmcA a MtrC jsou lipoproteiny *S. oneidensis* zakotvené v její vnější membráně. Váží oxidované kovy a přímo na ně přenášejí elektrony. Správné zařazení cytochromů do vnější membrány má zřejmě na starosti T2SS. Cytochromy zbavené lipidické kotvy tato bakterie za normálních podmínek uvolňuje do média, médium s mutantami v podjednotkách T2SS však takových proteinů obsahuje znatelně méně (Shi et al., 2008).

Jiný efekt má mutace v T2SS na *G. sulfurreducens*. I tato bakterie obsahuje ve vnější membráně cytochromy, které slouží k přenosu elektronů z buňky. Delece genu pro pseudopilin však nemá žádný vliv na jejich lokalizaci. Bakterie postrádající tento gen ovšem přesto nedokážou redukovat nerozpustné

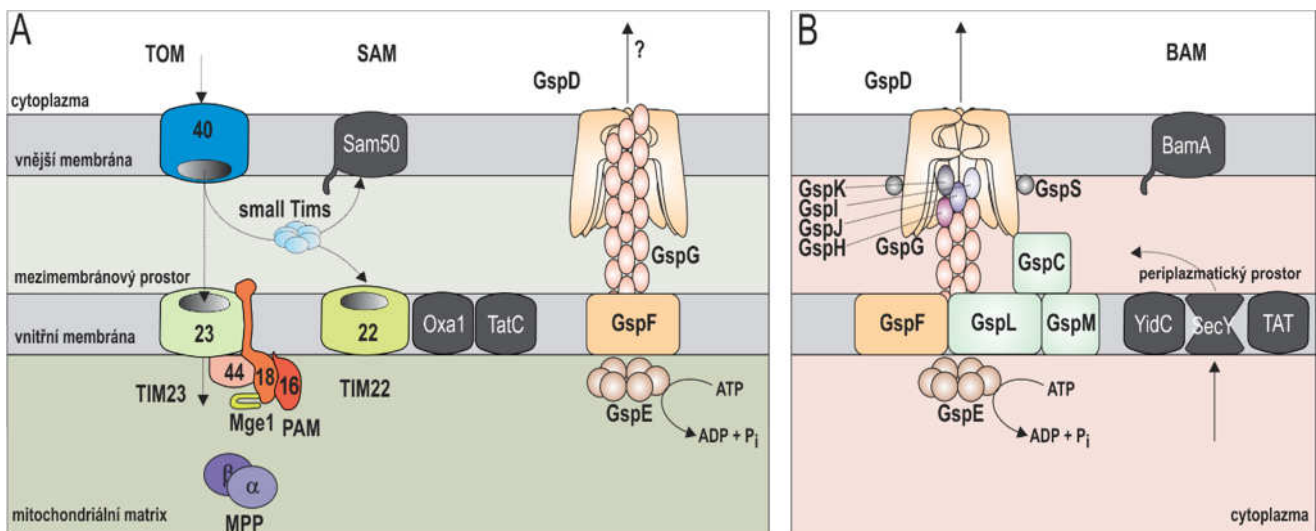
železité a manganaté ionty. Předpokládá se proto existence dalšího proteinu s touto funkcí, který obsahuje v aktivním centru ionty mědi a který je do extracelulárního prostoru transportován pomocí T2SS (Mehta et al., 2006).

5.3.2 Protein s vlivem na motilitu *L. pneumophila*

Substráty T2SS mohou mít kromě účasti v bakteriálním metabolismu, zisku živin a interakcích s jinými organismy i další, méně obvyklé funkce. Důkazem toho je jev sledovaný u *L. pneumophila*. Tato bakterie za specifických podmínek vykazuje pasivní typ pohybu, tedy pohyb nezávislý na bičíku nebo fimbriích, nazvaný povrchová translokace. V těchto podmínkách u nich lze pozorovat produkci biofilmu. Všechny mutanty v některé z částí T2SS byly defektní jak v produkci biofilmu, tak i ve schopnosti pohybovat se tímto způsobem. Pokud ale tyto mutanty byly v kontaktu s biofilmem vytvořeným nemutantními bakteriemi, schopnost povrchové translokace kolonií byla zachována. Pohyb tedy nezávisí na sekrečním systému jako takovém, ale na jeho substrátu. Ten pravděpodobně působí jako surfaktant – látka snižující povrchové napětí – čehož bakterie využívá ke klouzavému pohybu (Stewart et al., 2009). Složení tohoto surfaktantu není doposud známo, ale nejspíše bude aspoň z části lipidické povahy. Jeho role v tvorbě T2SS také nebyla objasněna. Možností je však více. T2SS může u *L. pneumophila* transportovat nějakou regulační molekulu, která bakterii informuje o tom, že je potřeba surfaktant syntetizovat, nebo je jeho substrátem exoenzym nutný k plné aktivaci surfaktantu. Samotné složky surfaktantu T2SS netransportuje, to je pravděpodobně zajištěno TolC, kanálem vnější membrány (Stewart et al., 2011).

6 T2SS v mitochondriích eukaryot

V naší laboratoři bylo nedávno objeveno, že v mitochondriích některých protistů se vyskytuje několik podjednotek T2SS. Bioinformatické studie odhalily v genomech *Naegleria gruberi*, *Andalucia godoyi* a *Malawimonas jakobiformis* geny pro sekretin, sekreční ATPázu, pseudopilin a protein cytoplazmatické membrány GspF. Analýza těchto genů ukázala, že mají u všech zmíněných organismů společný evoluční původ. Eukaryotický sekreční systém je tedy monofyletický. Nabízí se možnost, že se jedná o pozůstatek po bakteriálním endosymbiontovi, z něhož mitochondrie pocházejí (Lang et al., 1999). Pokud by se takový předpoklad potvrdil, mohla by tato skutečnost být cenným zdrojem informací o původu eukaryotické buňky. Jak je vidět na obrázku 8, buňky těchto protistů zároveň obsahují i typicky mitochondriální transportní systémy. Mohlo by se tedy jednat o jakýsi přechodný stav mezi bakterií a mitochondrií.



Obrázek 8: Srovnání sekrečního systému typu II u *Naegleria sp.* (A) a v gramnegativní bakterii (B). V mitochondriích se objevují pouze čtyři z podjednotek T2SS – sekretin, pseudopilin, sekreční ATPáza a GspF. Vyskytují se tu ovšem spolu s transportními systémy obvyklými pouze u mitochondrií, jako je TOM (transportér vnější mitochondriální membrány) a TIM (transportér vnitřní mitochondriální membrány), které zajišťují přenos proteinů do mezimembránového prostoru a dále do mitochondriální matrix. Některé z dalších transportních komplexů (jako je například SAM) mají prokázaný bakteriální původ (Chacinska et al., 2009). Takové komplexy jsou v obrázku vyznačeny černou barvou. Vytvořeno podle Korotkov et al., 2012.

Naegleria a *Andalucia* jsou organismy řazené do skupiny Excavata, ačkoliv spadají v rámci fylogenetického stromu této skupiny do odlišných větví – *Naegleria* do kmene Heterolobosea a *Andalucia* mezi jakobidy, případně sestersky k nim. *Malawimonas* je poněkud problematickým rodem. Některé analýzy ho umísťují mezi Excavata, jiné mimo tuto skupinu (Hampl et al., 2009). To, že mitochondrie těchto organismů obsahují původní bakteriální proteiny, které jinde nebyly objeveny, by mohlo být znakem jejich velkého evolučního stáří a také podporou pro teorie, které kladou kořen fylogenetického stromu eukaryot právě do skupiny Excavata nebo do její blízkosti (Williams, 2014).

Přestože je jeho stavba velmi redukovaná, není vyloučeno, že i tento sekreční systém slouží k transportu proteinů. Žádné substráty doposud nebyly odhaleny, uvažuje se však například o proteinech obsahujících hem, jehož syntéza je dokončována právě v mitochondriích (Ryter and Tyrrell, 2000).

7 Závěr

Sekreční systém typu II zajišťuje u gramnegativních bakterií transport proteinů přes vnější membránu. Substráty T2SS se účastní interakcí patogenních bakterií s hostitelem a hrají roli v získávání živin a bakteriálním metabolismu. Také jsou podstatné pro vztahy ve společenstvu mikroorganismů.

Tato bakalářská práce shrnuje nynější znalosti o T2SS – o podjednotkách, z nichž je složen, a mechanismu jeho fungování. Dále uvádí příklady proteinů, které využívají T2SS k translokaci mimo bakteriální buňku.

T2SS byl podrobně studován hlavně kvůli svému spojení s některými bakteriálními toxiny, jako je například cholera toxin, jenž je hlavním virulenčním faktorem *V. cholerae*. Přesto ještě zbývá mnoho skutečností, které je v tomto výzkumu třeba objasnit. Pozornost je věnována zejména hledání sekrečního signálu a také upřesnění mechanismu, jakým T2SS funguje. Také doposud není znám přesný stechiometrický poměr podjednotek T2SS, hlavně v komplexu cytoplazmatické membrány. Bádání by se také mělo zaměřit na pozůstatky T2SS, které byly objeveny v mitochondriích některých protistů ze skupiny Excavata. Mohly by totiž být zdrojem důležitého poznání o evoluci eukaryotické buňky.

8 Seznam používaných zkratk

Gsp	obecná sekretorická dráha
IM	cytoplazmatická membrána
LT	termolabilní toxin enterotoxigenní <i>E. coli</i>
OM	vnější membrána
SRP	signál rozpoznávající částice
T2SS	sekreční systém typu II
T3SS	sekreční systém typu III
Tat	twin-arginin translokázový systém
TIM	transportní komplex vnitřní mitochondriální membrány
TOM	transportní komplex vnější mitochondriální membrány

9 Seznam použité literatury

- Abendroth, J., Bagdasarian, M., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2004). The structure of the cytoplasmic domain of EpsL, an inner membrane component of the type II secretion system of *Vibrio cholerae*: an unusual member of the actin-like ATPase superfamily. *J. Mol. Biol.* *344*, 619–633.
- Abendroth, J., Murphy, P., Sandkvist, M., Bagdasarian, M., and Hol, W.G.J. (2005). The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* *348*, 845–855.
- Abendroth, J., Kreger, A.C., and Hol, W.G.J. (2009). The dimer formed by the periplasmic domain of EpsL from the Type 2 Secretion System of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Struct. Biol.* *168*, 313–322.
- Alphonse, S., Durand, E., Douzi, B., Waegele, B., Darbon, H., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bernard, C. (2010). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system. *J. Struct. Biol.* *169*, 75–80.
- Arts, J., de Groot, A., Ball, G., Durand, E., El Khattabi, M., Filloux, A., Tommassen, J., and Koster, M. (2007). Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF). *Microbiology* *153*, 1582–1592.
- Ast, V.M., Schoenhofen, I.C., Langen, G.R., Stratilo, C.W., Chamberlain, M.D., and Howard, S.P. (2002). Expression of the ExeAB complex of *Aeromonas hydrophila* is required for the localization and assembly of the ExeD secretion port multimer. *Mol. Microbiol.* *44*, 217–231.
- Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *43*, 475–485.
- Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., and Tommassen, J. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.* *6*, 2745–2745.
- Le Blastier, S., Hamels, A., Cabeen, M., Schille, L., Tilquin, F., Dieu, M., Raes, M., and Matroule, J.-Y. (2010). Phosphate starvation triggers production and secretion of an extracellular lipoprotein in *Caulobacter crescentus*. *PLoS One* *5*, e14198.
- Bleves, S. (1998). The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of a fifth pseudopilin , XcpX (GspK family). *Mol. Microbiol.* *27*, 31–40.
- Bleves, S., Lazdunski, E., Ge, M., and Filloux, A. (1999). Structure-Function Analysis of XcpP , a Component Involved in General Secretory Pathway-Dependent Protein Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *181*, 4012–4019.
- Bouley, J., Condemine, G., and Shevchik, V.E. (2001). The PDZ Domain of OutC and the N-terminal Region of OutD Determine the Secretion Specificity of the Type II Out Pathway of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* *308*, 205 – 219.
- Brewer, C., Wunderink, R., Jones, C., and Leeper, K. (1996). Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* *109*, 1019 – 1029.

- Camberg, J.L., and Sandkvist, M. (2004). Molecular Analysis of the *Vibrio cholerae* Type II Secretion ATPase EpsE. *J. Bacteriol.* *187*, 249–256.
- Camberg, J.L., Johnson, T.L., Patrick, M., Abendroth, J., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2006). Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *EMBO J.* *26*, 19–27.
- Cisneros, D. a, Bond, P.J., Pugsley, A.P., Campos, M., and Francetic, O. (2012). Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J.* *31*, 1041–1053.
- Collin, S., Guilvout, I., Nickerson, N.N., and Pugsley, A.P. (2011). Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin. *Mol. Microbiol.* *80*, 655–665.
- Condemine, G., and Shevchik, V.E. (2000). Overproduction of the secretin OutD suppresses the secretion defect of an *Erwinia chrysanthemi* outB mutant. *Microbiology* *146*, 639–647.
- Connell, T.D., Metzger, D.J., Lynch, J., and Folster, J.P. (1998). Endochitinase Is Transported to the Extracellular Milieu by the eps -Encoded General Secretory Pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *180*, 5591–5600.
- Daefler, S., Guilvout, I., Kim, R., Pugsley, A.P., and Russep, M. (1997). The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone , PuiS , and confers PuiS dependence on pIV " function. *Mol. Microbiol.* *24*, 465–475.
- DeBoy, R.T., Mongodin, E.F., Fouts, D.E., Tailford, L.E., Khouri, H., Emerson, J.B., Mohamoud, Y., Watkins, K., Henrissat, B., Gilbert, H.J., et al. (2008). Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. *J. Bacteriol.* *190*, 5455–5463.
- DebRoy, S., Dao, J., Söderberg, M., Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2006). *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19146–19151.
- Diederer, B.M.W. (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* *56*, 1–12.
- Dorsey, F.C., Fischer, J.F., and Fleckenstein, J.M. (2006). Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* *8*, 1516–1527.
- Douet, V., Loiseau, L., Barras, F., and Py, B. (2004). Systematic analysis, by the yeast two-hybrid, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of *Erwinia chrysanthemi*. *Res. Microbiol.* *155*, 71–75.
- Douzi, B., Durand, E., Bernard, C., Alphonse, S., Cambillau, C., Filloux, A., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2009). The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus. *J. Biol. Chem.* *284*, 34580–34589.
- Douzi, B., Ball, G., Cambillau, C., Tegoni, M., and Voulhoux, R. (2011). Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *J. Biol. Chem.* *286*, 40792–40801.

Dunstan, R. a, Heinz, E., Wijeyewickrema, L.C., Pike, R.N., Purcell, A.W., Evans, T.J., Praszker, J., Robins-Browne, R.M., Strugnell, R. a, Korotkov, K. V, et al. (2013). Assembly of the type II secretion system such as found in *Vibrio cholerae* depends on the novel Pilotin AspS. *PLoS Pathog.* *9*, e1003117.

Enfert, C., Ryterl, A., and Pugsley, A.P. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production , surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J.* *6*, 3531–3538.

Enferts, C., Reyssj, I., Wandersman, C., Pugsleyll, A.P., and Bank, D. (1989). Protein secretion by gram-negative bacteria. Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* *264*, 17462–17468.

Francetic, O., and Pugsley, A.P. (2005). Towards the identification of type II secretion signals in a nonacylated variant of pullulanase from *Klebsiella oxytoca*. *J. Bacteriol.* *187*, 7045–7055.

Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C. a, and Pugsley, A.P. (2007). Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. *J. Bacteriol.* *189*, 1783–1793.

Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2015). Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *J. Bacteriol.* *197*, 563–571.

Gardner, J.G., and Keating, D.H. (2010). Requirement of the type II secretion system for utilization of cellulosic substrates by *Cellvibrio japonicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 5079–5087.

Gray, M.D., Bagdasarian, M., Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2011). In vivo cross-linking of EpsG to EpsL suggests a role for EpsL as an ATPase-pseudopilin coupling protein in the Type II secretion system of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* *79*, 786–798.

Gu, S., Kelly, G., Wang, X., Frenkiel, T., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2012). Solution structure of homology region (HR) domain of type II secretion system. *J. Biol. Chem.* *287*, 9072–9080.

Guilvout, I., Chami, M., Engel, A., Pugsley, A.P., and Bayan, N. (2006). Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin. *EMBO J.* *25*, 5241–5249.

Hales, L., and Shuman, H. (1999). *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun.* *67*, 3662–3666.

Van Ham, M., and Hendriks, W. (2003). PDZ domains - glue and guide. *Mol. Biol. Rep.* *30*, 69–82.

Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3859–3864.

Hardie, K.R., Schulze, A., Parker, M.W., and Buckley, J.T. (1995). *Vibrio* spp. secrete proaerolysin as a folded dimer without the need for disulphide bond formation. *Mol. Microbiol.* *17*, 1035–1044.

Hardie, K.R., Loryl, S., and Pugsley, A.P. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* *15*, 978–988.

Hobbs, M., and Mattick, J.S. (1993). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* *10*, 233–243.

Hu, N., Leu, W., Lee, M., Chen, A., Chen, S., Song, Y., and Chen, L. (2002). XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem. J.* *365*, 205–211.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.

Jyot, J., Balloy, V., Jouvion, G., Verma, A., Touqui, L., Huerre, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2011). Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *J. Infect. Dis.* *203*, 1369–1377.

Kirn, T.J., Jude, B. a, and Taylor, R.K. (2005). A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature* *438*, 863–866.

Korotkov, K. V, and Hol, W.G.J. (2008). Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 462–468.

Korotkov, K. V, Krumm, B., Bagdasarian, M., and Hol, W.G.J. (2006). Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* *363*, 311–321.

Korotkov, K. V, Gray, M.D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2009). Calcium is essential for the major pseudopilin in the type 2 secretion system. *J. Biol. Chem.* *284*, 25466–25470.

Korotkov, K. V, Gonen, T., and Hol, W.G.J. (2011). Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 433–443.

Korotkov, K. V, Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 336–351.

Lallemant, M., Login, F.H., Guschinskaya, N., Pineau, C., Effantin, G., Robert, X., and Shevchik, V.E. (2013). Dynamic interplay between the periplasmic and transmembrane domains of GspL and GspM in the type II secretion system. *PLoS One* *8*, e79562.

Lang, B.F., Gray, M.W., and Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *33*, 351–397.

Li, G., and Howard, S.P. (2010). ExeA binds to peptidoglycan and forms a multimer for assembly of the type II secretion apparatus in *Aeromonas hydrophila*. *Mol. Microbiol.* *76*, 772–781.

Lu, C., Turley, S., Marionni, S.T., Park, Y.-J., Lee, K.K., Patrick, M., Shah, R., Sandkvist, M., Bush, M.F., and Hol, W.G.J. (2013). Hexamers of the Type II Secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with Increased ATPase Activity. *Structure* *21*, 1707–1717.

- Lu, C., Korotkov, K. V, and Hol, W.G.J. (2014). Crystal structure of the full-length ATPase GspE from the *Vibrio vulnificus* type II secretion system in complex with the cytoplasmic domain of GspL. *J. Struct. Biol.* *187*, 223–235.
- Lybarger, S.R., Johnson, T.L., Gray, M.D., Sikora, a. E., and Sandkvist, M. (2009). Docking and Assembly of the Type II Secretion Complex of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *191*, 3149–3161.
- Mehta, T., Childers, S.E., Glaven, R., Lovley, D.R., and Mester, T. (2006). A putative multicopper protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology* *152*, 2257–2264.
- Merritt, E.A., and Hol, W.G. (1995). AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *5*, 165–171.
- Merz, A., So, M., and Sheetz, M. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* *407*, 98–102.
- Misic, A.M., Satyshur, K.A., and Forest, K.T. (2010). *P. aeruginosa* PilT Structures with and without Nucleotide Reveal a Dynamic Type IV Pilus Retraction Motor. *J. Mol. Biol.* *400*, 1011–1021.
- Mudrak, B., and Kuehn, M.J. (2010). Specificity of the type II secretion systems of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* for heat-labile enterotoxin and cholera toxin. *J. Bacteriol.* *192*, 1902–1911.
- Nickerson, N.N., Tosi, T., Dessen, A., Baron, B., Raynal, B., England, P., and Pugsley, A.P. (2011). Outer membrane targeting of secretin PulD protein relies on disordered domain recognition by a dedicated chaperone. *J. Biol. Chem.* *286*, 38833–38843.
- Nierman, W.C., Feldblyum, T. V, Laub, M.T., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Alley, M.R., Ohta, N., Maddock, J.R., et al. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4136–4141.
- Nivaskumar, M., and Francetic, O. (2014). Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1568–1577.
- Nivaskumar, M., Bouvier, G., Campos, M., Nadeau, N., Yu, X., Egelman, E.H., Nilges, M., and Francetic, O. (2014). Article Distinct Docking and Stabilization Steps of the Pseudopilus Conformational Transition Path Suggest Rotational Assembly of Type IV Pilus-like Fibers. *Struct. Des.* *22*, 685–696.
- Nunn, D. (1999). Bacterial Type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends Cell Biol.* *9*, 402–408.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991). Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3281–3285.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1993). Cleavage , Methylation , and Localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Export Proteins XcpT , -U . -V . and -w. *J. Bacteriol.* *175*, 4375–4382.
- Orans, J., Johnson, M.D.L., Coggan, K.A., Sperlazza, J.R., Heiniger, R.W., Wolfgang, M.C., and Redinbo, M.R. (2010). Crystal structure analysis reveals *Pseudomonas* PilY1 as an essential calcium-dependent regulator of bacterial surface motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1065–1070.

- Patel, R., Smith, S.M., and Robinson, C. (2014). Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1620–1628.
- Patrick, M., Korotkov, K. V, Hol, W.G.J., and Sandkvist, M. (2011). Oligomerization of EpsE coordinates residues from multiple subunits to facilitate ATPase activity. *J. Biol. Chem.* *286*, 10378–10386.
- Peabody, C.R. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* *149*, 3051–3072.
- Pineau, C., Guschinskaya, N., Robert, X., Gouet, P., Ballut, L., and Shevchik, V.E. (2014). Substrate recognition by the bacterial type II secretion system: more than a simple interaction. *Mol. Microbiol.* *94*, 126–140.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L., and Colwell, R.R. (2008). Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* *10*, 1400–1410.
- Pugsley, A.P. (1992). Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 12058–12062.
- Pugsley, A.P., d’Enfert, C., Reyss, I., and Kornacker, M.G. (1990). Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.* *24*, 67–90.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (1999). Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J. Mol. Biol.* *289*, 659–670.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001). An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep.* *2*, 244–248.
- Reichow, S.L., Korotkov, K. V., Hol, W.G.J., and Gonen, T. (2010). Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1226–1232.
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* *5*, 622–636.
- Ryter, S.W., and Tyrrell, R.M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* *28*, 289–309.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P., and Dirita, V.J. (1995). Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.* *14*, 1664–1673.
- Sandkvist, M., Michel, L.O., Hough, L.P., Morales, V.M., Bagdasarian, M., Koomey, M., Rita, V.J.D.I., Bagdasarian, M., Overbye, L.J., Sandkvist, M., et al. (1997). General Secretion Pathway (eps) Genes Required for Toxin Secretion and Outer Membrane Biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *179*, 6994–7003.
- Sandkvist, M., Hough, L.P., Bagdasarian, M.M., Cross, A.R., and Way, C.B. (1999). Direct Interaction of the EpsL and EpsM Proteins of the General Secretion Apparatus in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *181*, 3129–3135.

- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A.P., and Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *19*, 2221–2228.
- Segal, G., Russo, J.J., and Shuman, H.A. (1999). Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* *34*, 799–809.
- Seo, J., Brencic, A., and Darwin, A.J. (2009). Analysis of secretin-induced stress in *Pseudomonas aeruginosa* suggests prevention rather than response and identifies a novel protein involved in secretin function. *J. Bacteriol.* *191*, 898–908.
- Shevchik, V.E., and Condemine, G. (1998). Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* Outs protein, an element of a type II secretion system. *Microbiology* *144*, 3219–28.
- Shi, L., Deng, S., Marshall, M.J., Wang, Z., Kennedy, D.W., Dohnalkova, A.C., Mottaz, H.M., Hill, E. a, Gorby, Y. a, Beliaev, A.S., et al. (2008). Direct involvement of type II secretion system in extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC and OmcA. *J. Bacteriol.* *190*, 5512–5516.
- Shi, L., Richardson, D.J., Wang, Z., Kerisit, S.N., Rosso, K.M., Zachara, J.M., and Fredrickson, J.K. (2009). The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer. *Environ. Microbiol. Rep.* *1*, 220–227.
- Sikora, A.E., Zielke, R. a, Lawrence, D. a, Andrews, P.C., and Sandkvist, M. (2011). Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. *J. Biol. Chem.* *286*, 16555–16566.
- Spangler, B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* *56*, 622–647.
- Stewart, C.R., Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2009). Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol.* *191*, 1537–1546.
- Stewart, C.R., Burnside, D.M., and Cianciotto, N.P. (2011). The surfactant of *Legionella pneumophila* is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species. *J. Bacteriol.* *193*, 5971–5984.
- Strom, M.S., Nunn, D., and Lory, S. (1991). Multiple Roles of the Pilus Biogenesis Protein PilD. Involvement of PilD in Excretion of Enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *173*, 1175–1180.
- Strozen, T.G., Li, G., and Howard, S.P. (2012). YghG (GspS β) is a novel pilot protein required for localization of the GspS β type II secretion system secretin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* *80*, 2608–2622.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J. Bacteriol.* *179*, 2503–2511.

Tauschek, M., Gorrell, R.J., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M. (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7066–7071.

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

Tseng, T.-T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* *9 Suppl 1*, S2.

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

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

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

Wernick, N.L.B., Chinnapen, D.J.-F., Cho, J.A., and Lencer, W.I. (2010). Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins (Basel)*. *2*, 310–325.

Williams, T.A. (2014). Evolution: rooting the eukaryotic tree of life. *Curr. Biol.* *24*, R151–2.

Yamamoto, T., Gojobori, T., and Yokota, T. (1987). Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *J. Bacteriol.* *169*, 1352–1357.

Zückert, W.R. (2014). Secretion of bacterial lipoproteins: through the cytoplasmic membrane, the periplasm and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1509–1516.