

## بیان کپسول در باکتری اشرشیاکلی نیازمند پروتئین KfiB است: یک مطالعه مبتنی بر آنالیز ساختار و عملکرد

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیان کپسول یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی باکتریهای مهاجم بوده، در انسان دارای اهمیت است. اشرشیاکلی با داشتن شرایط ویژه به عنوان یک سیستم مدل مناسب برای مطالعه مکانیسمهای تولید و ارسال کپسول پلی ساکارییدی به سطوح غشایی قابل استفاده می باشد. تولید کپسول پلی ساکارییدی در اشرشیاکلی به چهار نوع پروتئین  $KfiA$ ،  $KfiB$ ،  $KfiC$ ،  $KfiD$  نیازمند می باشد که در ایجاد ساختارهای تکراری  $\beta(1,4)$  -  $GLCA$  -  $GlcNAc-\alpha(1-$  سازنده کپسول، ایفای نقش می کنند. تا کنون نقش سه نوع از چهار پروتئین فوق مشخص شده است اما هنوز نقش  $KfiB$  ناشناخته مانده است.

**روش بررسی:** به منظور یافتن نقش پروتئین  $KfiB$ ، در این مطالعه چندین ساختار متفاوت بیان کننده بخشهای مختلف این پروتئین ( $pMA2-6$ ) و یک ساختار کامل از آن ( $pMA1$ ) که همگی در انتهای آمین خود قطعه ی  $6His-tag$  داشتند ساخته شد. حضور این قطعه به تخلیص پروتئینهای تولید شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی  $Ni^{2+}$ -NTA کمک می کند.

**یافته ها:** هیچ کدام از پلاسمید های ساخته شده به استثنای  $pMA1$  قادر به جبران نقش  $KfiB$  در پلاسمید جهش یافته  $pPC6::23$  نبوده و نتوانستند توانایی تولید کپسول را مجدداً به باکتری بازگردانند. از طرفی این توانایی با  $pMA1$  نشان دهنده این بود که حضور قطعه  $His-tag$  متصل به این پروتئین مزاحمتی در عملکرد آن نداشته ضمن این که حتماً به قطعه کامل پروتئین  $KfiB$  برای تکمیل ( $Complementation$ ) کمپلکس نیاز می باشد.

**نتیجه گیری:** مطالعات مرتبط با یافتن محل تجمع (اتصال) این پروتئین نشان داد که پروتئین  $KfiB$  به غشاء سیتوپلاسمی متصل می شود.

**واژه های کلیدی:** اشرشیاکلی، کپسول پلی ساکارییدی،  $KfiB$ ،  $K5$

### معراج پورحسین

استادیار بیولوژی ملکولی، دانشکده پزشکی  
دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

### ایان اس روبرتس

استاد بیولوژی ملکولی، دانشگاه منچستر

### نویسنده مسئول: معراج پورحسین

نلقن: ۰۳۱۱۷۹۲۲۴۳۷

### پست الکترونیک:

pourhossein@med.mui.ac.ir

آدرس: اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی

اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و

ملکولی

وصول مقاله: ۸۷/۱/۲۰

اصلاح نهایی: ۸۷/۳/۱۲

پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۷

## مقدمه

بیان یک کیسول پلی ساکاریدی از خصوصیات مرسوم بیشتر باکتریها می باشد. این ساختار با احاطه سطوح سلولی در تعاملات مختلف بین باکتری و محیط خارجی مشارکت می کند. برای کیسول پلی ساکاریدی چندین عمل مهم ذکر شده است که مهمترین آنها عبارتند از:

ایفای یک نقش کلیدی در مقابله با سیستم دفاعی میزبان در طول مدت عفونت، همچنین تاثیر بر تشکیل اجتماعات باکتریایی و مقاومت در برابر عوامل مخرب محیطی (۱،۲).

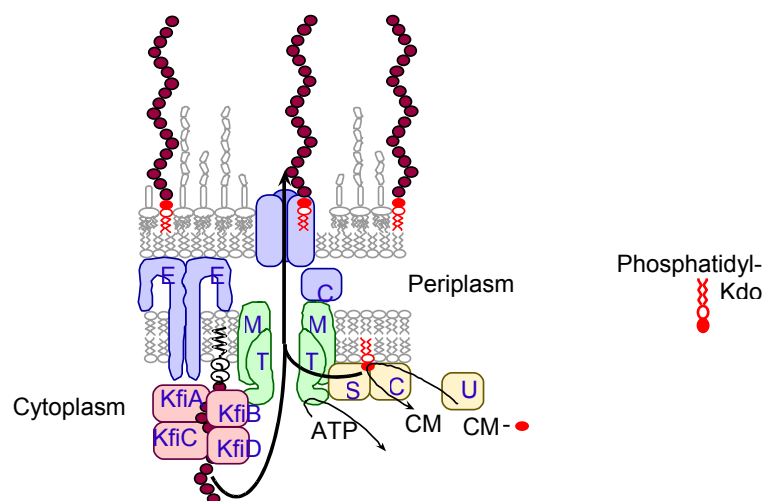
بیان کیسولهای پلی ساکاریدی در تعدادی از باکتریها مورد مطالعه قرار گرفته است، از بین آنها در مورد اشرشیا کلی بهترین اطلاعات به دست آمده است (۳). اشرشیا کلی می تواند بیش از ۸۰ نوع کیسول پلی ساکاریدی (یا آنتی ژنهای K) متفاوت تولید نماید. این کیسول ها در اشرشیا کلی بر اساس خصوصیات ژنتیکی و بیوشیمیایی در چهار گروه (۱-۴) تقسیم بندی شده اند (۳). به دلیل محدودیت فضا در این بخش بر آنتی ژنهای گروههای ۲، ۱ متمرکز خواهیم شد.

آنتی ژنهای گروه ۱ که در اشرشیا کلیهای جدا شده از عفونتهای روده ای بیان می شوند، با خوشه ژنی (gene cluster) cps که در نزدیکی اپرون his قرار گرفته است، کد گذاری (encoded) می شوند. این آنتی ژنها به پلی ساکاریدهای کیسولی بیان شده با جنسهای کلبسیلا و اروینیا شباهت دارند (۴).

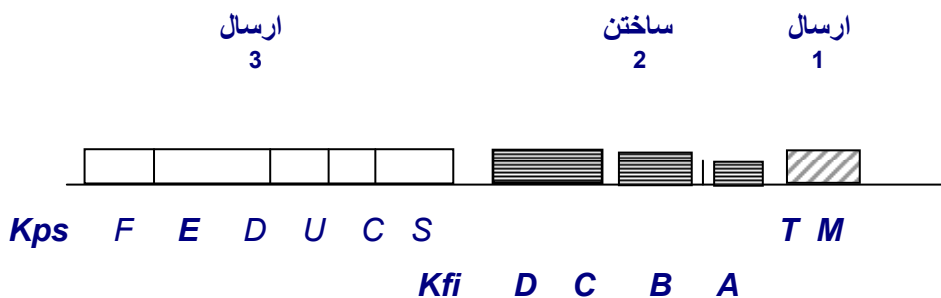
آنتی ژنهای گروه ۲ در اشرشیا کلیهای جدا شده از تعدادی از عفونتهای مختلف انسان و حیوانات بیان می شوند (۲). این آنتی ژنها توسط، لوکوس kps در نزدیکی serA کد گذاری شده، از لحاظ ساختمانی شباهت به کیسولهای پلی ساکاریدی بیان شده با جنسهای نایسریا و هموفیلوس دارند (۲،۳). بر خلاف کیسولهای گروه ۱ کیسولهای پلی ساکاریدی گروه ۲ در طرف سیتوپلاسمی غشاء داخلی بواسطه واکنشهای ممتد (Processive) گلیکوزیل ترانسفرازها ساخته می شوند. (۳، ۴، ۵، ۶)

در آزمایشگاه روبرتس در دانشگاه منچستر ساختار اولیگومری کمپلکس سازنده و ارسال کننده موجود در غشاء داخلی با استفاده از آنتی ژنهای K5 بعنوان یک سیستم مدل (شکل ۱)، ترسیم گردید. (۳) مطالعات بعدی در همان آزمایشگاه نشان داد که این کمپلکس در قطبهای سلولی قرار داشته و در همان محلهاست که پلی ساکاریدها به سطوح سلولی تخلیه می شوند. (۷)

همانگونه که در شکل ۱، ۲ مشاهده می شود، بیوستتزی پلی ساکاریدهای کیسولی K5 با یک ساختار کمپلکس چند پروتئینی صورت می گیرد که در تولید و ارسال پلی ساکاریدها نقش ایفا می کنند. پروتئینهای KfiA، KfiB، KfiC، KfiD در بیوستتزی پلی ساکارید نقش حیاتی ایفا می کنند. پلی ساکارید کیسولی تولید شده با سویه K5 اشرشیا کلی شباهت زیادی به هپارین سولفات دارد. (۸)



شکل ۱: شکل شماتیک کمپلکس سازنده-ارسال کننده کیسول



شکل ۲: شکل شماتیک کمپلکس خوشه ژنی اشرشیاکلی سازنده و ارسال کننده کپسول

DNA پلاسمیدی توسط کیت QIA Prep کمپانی Qiagen استخراج گردید. مراحل تکثیر با PCR با استفاده از پرایمرهای ذکر شده و آنزیم Pfu پلیمراز (Stratagene) صورت گرفت. تجزیه و تحلیل اندازه قطعات DNA پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز با استفاده از مارکر یک کیلو بیزی (Gibco BRL) صورت گرفت. برای توالی یابی از کیت (Perkin Elmer) ABI PRISM Ready استفاده شد.

به منظور کلون کردن قطعه مورد نظر برای بیان پروتئین، از پلاسمید pPC6 به عنوان الگو برای تولید DNA کامل KfiB (KfiB<sub>aa1-563</sub>), دو قطعه KfiB که فاقد بخش انتهایی آمینی بودند (KfiB<sub>aa452-563</sub> and KfiB<sub>2</sub> and aa<sub>147-563</sub>; و دو قطعه KfiB که فاقد بخش انتهایی کربوکسیلی بودند (KfiB<sub>aa1-453</sub>; KfiB<sub>3</sub> and aa<sub>1-153</sub>; KfiB<sub>5</sub>) استفاده شد (جدول ۲). پس از برش محصولات PCR و کتورهاها با آنزیمهای BamHI-SmaI/KpnI و استخراج آنها به روش فنل - کلروفورم عمل اتصال محصولات آنها در حضور آنزیم لیگاز T4 در ۱۶°C انجام گرفت. سلولهای پذیرای XL1Blue با استفاده از روش Mandel, Higa (11) تهیه شد و پلاسمید حاوی محصول PCR با استفاده از روش شوک حرارتی یا الکتروپوریشن به داخل آنها وارد شد. از کلنیهای موفق برای مطالعات بعدی استفاده شد. بدین ترتیب که پس از استخراج DNA پلاسمید از چند کلنی رشد نموده در سطح پلیت و برش آنها با آنزیمهای محدود کننده، یکی از آنها با داشتن اندازه مورد انتظار (۱,۷kb) انتخاب و پس از توالی یابی و اطمینان

مطالعات بر روی پروتئینهای KfiA و KfiC در آزمایشگاه روبرتس در دانشگاه منچستر نشان داد که این دو پروتئین به ترتیب یک  $\alpha$ -UDP-N-acetyl-D گلوکز آمین گلیکوزیل ترانسفراز ( $\alpha$ -GlcNAc-T) و یک UDP-Glucuronic acid  $\beta$ -گلوکوزیل ترانسفراز ( $\beta$ -GlcA-T) هستند (۵،۶). KfiD بعنوان UDP-Glucuronic acid دهیدروژناز عمل می کند. (۹) تا کنون نقش پروتئین KfiB نامشخص بوده، ممکن است در مراحل آغازین بیوسنتز پلی ساکارید نقش ایفا بکند. مطالعات پیشگویی کننده ساختمان این پروتئین نشان داد که KfiB می تواند با داشتن نواحی ماریپج - ماریپج (در تسهیل آغاز تولید کپسول با ایفای یک نقش ساختاری ظاهر شود (۶).

بیان یک پروتئین از طریق کاربرد تکنولوژی اتصالی ژن (gene fusion technology) باعث تسهیل تخلیص آن پروتئین می شود. یکی از این روشها استفاده از شش هیستیدین متوالی (6XHis) می باشد که قبلاً با موفقیت فوق العاده ای برای دیگر انواع پروتئین های KpS مورد استفاده قرار گرفته بود. (۱۰) این مطالعه با هدف تعیین نقش پروتئینی KfiB با استفاده از این روش می باشد.

### روش بررسی

تمام مواد شیمیایی و دیگر مواد مورد نیاز از کمپانیهای سیگما - آلدریج، مرک و اوکسوئید تهیه گردیدند، به استثنای مواردی که نام کمپانی مربوط به آن ذکر گردیده است. باکتریها در محیط کشت LB (Luria-Bertani) داده شدند. پرایمرهای مورد استفاده و پلاسمید های ساخته شده در این مطالعه در جدول ۲ آورده شده اند.

KfiB کامل و همچنین حامل دیگر قطعات ناکامل KfiB، در زمانهای خاصی با افزودن محلول (isopropyl-1-thio- IPTG  $\beta$ -D-galactopyranoside) پس از گذشت ۳-۵ ساعت سلولهای باکتریایی ته نشین شده پس از مخلوط شدن با بافر الکتروفورز برای آنالیز توسط SDS-PAGE و وسترن بلات آماده شدند.

از اینکه ژن KfiB به صورت صحیح ساخته شده و در انتهای خود دارای His-tag می باشد، تحت عنوان pMA1 نامگذاری گردید. برای تأیید بیان پروتئین KfiB متصل به His-tag، آنالیزهای وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه His-tag اجرا شد. بیان پروتئین در سویه های حامل ژن تولید کننده

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر	توالی (5' → 3')	خصوصیت	اندازه مورد انتظار
KF1F	CGG GAT CCC GAT GAT GAA TAA ATT AGT GC	Binds forward strand of <i>kfiB</i> starting from the beginning of <i>kfiB</i>	1.7kb
KF1R	ACA GCC CTT GAT TTT AGC TCT CC	Binds reverse strand of <i>kfiB</i> starting from the end of <i>kfiB</i>	
KF2F	CGG GAT CCC GGC ATA TAA TAA AAG ATT GC	Binds forward strand of <i>kfiB</i> starting from coding seq for amino acid 147	1.2kb
KF2R	ACA GCC CTT GAT TTT AGC TCT CC	Binds reverse strand of <i>kfiB</i> starting from the end of <i>kfiB</i>	
KF3F	CGG GAT CCC GAT GAT GAA TAA ATT AGT GC	Binds forward strand of <i>kfiB</i> starting from the beginning of <i>kfiB</i>	0.45kb
KF3R	GGG GTA CCC CGC AAT CTT TTA TTA TAT GC	Binds reverse strand of <i>kfiB</i> starting from coding seq for amino acid 147	
KF5F	CGG GAT CCC GAT GAT GAA TAA ATT AGT GC	Binds forward strand of <i>kfiB</i> starting from the beginning of <i>kfiB</i>	1.36kb
KF5R	GGG GTA CCC CAT ATA GCA CAG GTG G	Binds reverse strand of <i>kfiB</i> starting from coding seq for amino acid 453	
KF6F	CGG GAT CCA TGG AGC AGC TGA GCA G	Binds forward strand of <i>kfiB</i> starting from coding seq for amino acid 452	0.33kb
KF6R	ACA GCC CTT GAT TTT AGC TCT CC	Binds reverse strand of <i>kfiB</i> starting from the end of <i>kfiB</i>	

جدول ۲: پلاسمیدهای ساخته شده در این مطالعه

Seq = توالی

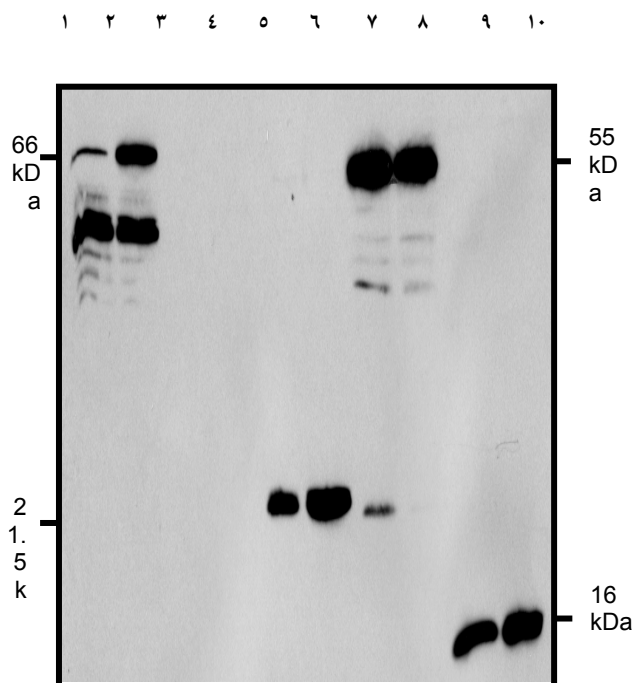
پلاسمید	خصوصیات
pMA1	Amp <sup>r</sup> , 6xHis tag fusion of full-length <i>kfiB</i> (encodes aa <sub>1-563</sub> ) in pQE32 vector at <i>Bam</i> HI– <i>Sma</i> I sites
pMA2	Amp <sup>r</sup> , 6xHis tag fusion of truncated <i>kfiB</i> lacking N-terminal domain (encodes aa <sub>147-563</sub> ) in pQE32 vector at <i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I sites
pMA3	Amp <sup>r</sup> , 6xHis tag fusion of truncated <i>kfiB</i> lacking C-terminal domain ( encodes aa <sub>1-153</sub> ) in pQE32 vector at <i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I sites
pMA5	Amp <sup>r</sup> , 6xHis tag fusion of truncated <i>kfiB</i> lacking C-terminal domain ( encodes aa <sub>1-453</sub> ) in pQE32 vector at <i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I sites
pMA6	Amp <sup>r</sup> , 6xHis tag fusion of truncated <i>kfiB</i> lacking N-terminal domain (encodes aa <sub>452-563</sub> ) in pQE32 vector at <i>Bam</i> HI – <i>Kpn</i> I sites

Amp<sup>r</sup> = مقاوم به آمپی سیلین

aa = آمینو اسید

پروتئینی KfiB با وزن ملکولی صحیح مورد انتظار یعنی ۲۱.۵ (pMA3)، ۵۵ (pMA5) و ۱۶ کیلو دالتون (pMA6) بود. اما هیچ پروتئینی در سویه حاوی pMA2 در غیاب سایر پروتئینهای کپسول مشاهده نشد.

بیان پروتئین کامل یا قطعات ناکامل پروتئینها با pMA1, pMA3, pMA5, pMA6 بدون حضور IPTG نیز قابل رویت بوده، حضور دیگر پروتئینهای کپسول باعث افزایش پایداری پروتئین کامل KfiB می شد، هر چند که این تأثیر تا حدی در قطعات دیگر نیز مشاهده می شد، این حضور تأثیری در تولید پروتئین با pMA2 نداشت (شکل ۲)



شکل ۲: تجزیه و تحلیل پروتئین کامل و قطعات ناکامل 6His-KfiB در شرایط القا نشده  
 ستون ۱، XL1-Blue[pMA1]  
 ستون ۲، XL1-Blue[pMA1][pPC6::23]  
 ستون ۳، XL1-Blue[pMA2]  
 ستون ۴، XL1-Blue[pMA2][pPC6::23]  
 ستون ۵، XL1-Blue[pMA3]  
 ستون ۶، XL1-Blue[pMA3][pPC6::23]  
 ستون ۷، XL1-Blue[pMA5]  
 ستون ۸، XL1-Blue[pMA5][pPC6::23]  
 ستون ۹، XL1-Blue[pMA6]  
 ستون ۱۰، XL1-Blue[pMA6][pPC6::23]

یکی از ژلهای الکتروفورز پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو به منظور مشاهده باندهای پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. از ژل دوم جهت انتقال پروتئین ها به یک غشای Millipore PVDF (Towbin et.al) استفاده شد (۱۲).

برای تهیه اجزاء سلولی از متد Bronner و همکارانش (۱۳) استفاده شد. برای اندازه گیری میزان آلودگی جزء غشائی با اجزاء سیتوپلاسمی از روش تعدیل سازی شده Maagd&Lugtenberg (۱۴) استفاده شد. در این روش میزان ملات دهیدروژناز (MDH) که یک آنزیم سیتوپلاسمی است اندازه گیری می شود. همچنین برای سنجش میزان آلودگی جزء سیتوپلاسمی با غشاء با استفاده از روش Hayashi و همکارانش (۱۵) میزان فعالیت NADH فری سیانید دهیدروژناز (NFD) متصل به غشاء مورد استفاده قرار گرفت. در هر دوروش میزان فعالیت تام کمتر یا مساوی ۳٪ آلودگی قابل اغماض به جزء دیگررا نشان می دهد.

### نتایج

نتایج حاصله نشان دهنده وجود یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۶۶KDa (باند مورد انتظار برای KfiB) و باندهای کوچکتر بود. به نظر می رسد که باندهای کوچکتر از شکسته شدن KfiB ایجاد شده باشند. در SDS-PAGE رنگ آمیزی شده توسط کوماسی بلو، پروتئین مورد نظر قابل مشاهده نبود. بنابراین با در نظر گرفتن میزان پایین تولید این پروتئین همراه با حساسیت بالای پروتئین کامل تولید شده نسبت به تخریب پروتئولیتیکی، تصمیم به ادامه مطالعه از طریق ایجاد چندین ساختار بیانی دیگر که قطعات متفاوت از KfiB که فاقد بخشهایی از یکی از دو انتهای کربوکسیلی یا آمینی و متصل به His-tag را تولید می نمودند ضروری به نظر می رسید. چنین قطعاتی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و pMA1 به عنوان الگو با PCR ساخته شده و پس از اتصال به pQE32 و انتقال به XL1Blue و تایید به روش پرش آنزیمی و توالی یابی، تحت عناوین pMA2,3,5,6 نامگذاری شدند. آنتی بادی به کار رفته برای شناسائی His-tag مویید تولید تکه های پروتئینی KfiB با وزن ملکولی صحیح مورد انتظار یعنی

**آنالیزهای تکمیل نمودن (complementation) جهشها**

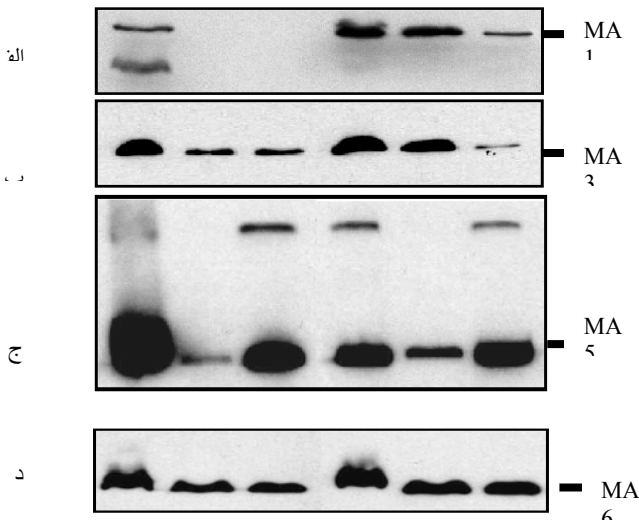
به منظور تعیین عملکرد تکمیل سازی پروتئین KfiB، تمام ساختارهای متفاوت از KfiB به داخل باکتری کپسول K5 به باکتریوفاژ K5 حساس بوده، pPC6::23 بعنوان یک جهش یافته برای تولید KfiB توانایی تولید کپسول K5 را ندارد از این روی از این دو برای کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. همه پلاسמידهای مختلف KfiB به استثنای pMA1 در تکمیل سازی موتاسیون pPC6::23 و بازگرداندن توانایی تولید کپسول ناتوان بودند. تجزیه و تحلیل اجزاء غشایی و سیتوپلاسمی توسط

**وسترن بلات**

به دنبال تفکیک اجزاء غشایی از سیتوپلاسمی تستهای NFD و MDH تأیید نمودند که میزان آلودگی این دو جزء با همدیگر قابل اغماض است.

نتایج وسترن بلات نشان داد که در فقدان سایر پروتئینهای کمپلکس بیوستتزی K5، قطعه کامل پروتئین KfiB نه قادر به تجمع و اتصال به غشاء بوده و نه در سیتوپلاسم دیده می شود. اما در حضور دیگر پروتئینهای بیوستتزی قسمت اعظم این پروتئین به غشاء متصل می شود (شکل ۳ الف). در فقدان سایر پروتئینهای K5، پروتئین ۲۱/۵ کیلو دالتونی تولید شده با pMA3 هم در جزء سیتوپلاسمی و هم در جزء غشایی مشاهده می شود و حضور دیگر پروتئینهای کمپلکس ممکن است منجر به تجمع بیشتر این قطعه در جزء غشایی بشود. (شکل ۳ ب). در فقدان سایر پروتئینهای K5، پروتئین ۵۵ کیلو دالتونی تولید شده با pMA5 علی رغم مشاهده در جزء غشایی، بیشتر در جزء سیتوپلاسمی مشاهده می شود و در حضور پروتئینهای دیگر یک باند پروتئینی در حدود ۱۱۰ کیلو دالتون که می تواند یک دایمر KfiB باشد در محصول تام سلولهای تخریب شده و جزء سیتوپلاسمی مشاهده می شود (شکل ۳ ج). در هر دو حالت حضور یا فقدان سایر پروتئینها، پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی تولید شده با pMA6 در مقادیر قابل مقایسه ای در هر دو غشایی و سیتوپلاسمی تجمع می یابند (شکل ۳ د). همچنین ژلهای رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو مقادیر قابل شناسایی از تجمع پروتئینها را در جزء غشایی قطعات ناکامل KfiB نشان ندادند.

در حضور سایر پروتئینهای K5			در فقدان سایر پروتئینهای K5		
1	2	3	1	2	3



شکل ۳: تجزیه و تحلیل محل تجمع پروتئین کامل و قطعات ناکامل 6His-KfiB در حالت فقدان یا حضور سایر پروتئینهای کمپلکس بیوستتزی K5 (۳ و ۲۱) بترتیب مربوط به محصول تام سلولهای تخریب شده، جزء غشایی و جزء سیتوپلاسمی می باشند).

**بحث**

این مطالعه نشان داد که تظاهر یافتن فنوتیپ pPC6::23 به دلیل تخریب در ژن KfiB بوده و پروتئین کامل KfiB متصل به هیستیدین که توسط pMA1 بیان می شود، فعالیتی مشابه با پروتئین KfiB وحشی دارد. پروتئین KfiB متصل به هیستیدین بیان نسبتاً کمی دارد که به همین دلیل برای اهداف تخلیص نامناسب می باشد. دلایل متعددی برای بیان کم در پروتئینهای نو ترکیب در اشرشیا کلی مطرح می باشد. عموم پروتئینهایی که سمی بودن آنها مطرح می باشد پروتئینهای غشایی اند که با DNA یا سیستمهای انتقال الکترون تداخل (interaction) پیدا می کنند. KfiB یک پروتئین غشایی است که میزان بیان این پروتئین به صورت کامل کم بود. هنگامی که این پروتئین در مقادیر بالاتر از حد معمول در داخل سلول بیان می شود ممکن است به دلیل اتصال یا حضور این پروتئین در سیستمهای حیاتی غشایی یا تداخل در متابولیسم سلولی منجر به کاهش بیان پروتئینهای فوق بشود. در مطالعات بعدی در مواردی که تولید مقادیر بالایی از پروتئین کامل KfiB متصل به هیستیدین مورد نیاز باشد باید بیان پایین آن در چنین شرایطی مد نظر قرار بگیرد. برای کاهش سمیتی که با میزان تولید بالای این پروتئین ایجاد می شود می توان با استفاده از

با pMA6 به دلیل میزان تولید و پایداری مناسب نامزد خوبی برای تخلیص و استفاده در تولید آنتی بادی اختصاصی برای KfiB می باشد هیچ یک از پلاسمیدها به استثنای pMA1 قادر به تکمیل و جبران تاثیرات جهش و بازگرداندن امکان تولید کپسول به باکتری دارای جهش (null mutant) در KfiB (-K5) نبود. تکمیل موفقیت آمیز با pMA1 علاوه بر این که نشان دهنده نیاز به قطعه کامل پروتئین KfiB برای تولید کپسول می باشد، حکایت از عدم مزاحمت قطعه 6His-tag برای این منظور دارد. محافظت اعطا شده به پروتئین KfiB به دنبال تجمع آن با دیگر پروتئینهای مرتبط به کپسول نشان دهنده یک تعامل (interaction) تنگاتنگ KfiB با یک یا بیشتر از یکی از پروتئینهای مرتبط با تولید کپسول می باشد.

یک توالی علامت دهنده (signal sequence) که باعث هدایت پروتئینها به فضای پری پلاسمی می شود به میزان قابل توجهی این اثرات سمی را تقلیل داد. همچنین در یک روش ساده تر با کاهش حرارت رشد تا ۲۵<sup>o</sup>C موفقیتهایی در این زمینه به دست آمده است (۱۶). ما در این مطالعه برای فائق آمدن بر این مشکل و اهداف دیگر، قطعات مختلفی از پروتئین را که بخشهایی از یکی از دو انتهای آنها حذف شده بود ایجاد نمودیم. بیان پروتئینهای فاقد بخشی از پایانه آمینی (N-terminus)، فقط در حضور دیگر پروتئینهای مربوط به کپسول امکان پذیر بود. این موضوع می تواند انعکاسی از افزایش حساسیت نسبت به آنزیمهای پروتئولیز کننده در شرایط فقدان دیگر پروتئینهای کپسول و نشان دهنده اهمیت انتهای آمینی KfiB باشد. پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی تولید شده

## References

- 1). Roberts IS. *The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria*. Annu. Rev. Microbiol., 1996;50: 285-315.
- 2). Roberts IS. *Bacterial polysaccharides in sickness and in health*. Microbiol. 1995;141: 2023-2031.
- 3). Whitfield C, Roberts IS. *Structure, assembly and regulation of expression of capsules in Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 1999;31:1307-1319.
- 4). Whitfield C. *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli*. Annu. Rev. Biochem. 2006;75:39-68.
- 5). Griffiths G, Cook NJ, Gottfridson E, Lind T, Lidholt K, Roberts IS. *Characterization of the glycosyltransferase enzyme from the Escherichia coli K5 capsule gene cluster and identification and characterization of the glucuronyl active site*. J. Biol. Chem. 1998; 273:11752-11757.
- 6). Hodson N, Griffiths G, Cook N, Pourhoussein M, Gottfridson E, Lind T, Lidholt K, Roberts IS. *Identification that KfiA, a protein essential for the biosynthesis of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide, is an alpha -UDP-GlcNAc glycosyltransferase. The formation of a membrane-associated K5 biosynthetic complex requires KfiA, KfiB, and KfiC*. J. Biol. Chem. 2000; 275:27311-27315
- 7). McNulty C, Thompson J, Barrett B, Lord L, Andersen C, Roberts IS. *The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in Escherichia coli: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell*. Mol. Microbiol. 2006; 59:907-922.
- 8). Chen M, Bridges A and Liu J. *Determination of the substrate specificities of N-acetyl-d-glucosaminyltransferase*. Biochemistry 2006;10; 45(40):12358-65.
- 9). Sieberth V, Rigg GP, Roberts IS, Jann K. *Expression and characterization of UDPGlc dehydrogenase (KfiD), which is encoded in the type-specific region 2 of the Escherichia coli K5 capsular genes*. J. Bacteriol. 1995;177:4562-4565.
- 10). Rigg GP, Barrett B, Roberts IS. *The localization of KpsC, S and T, and KfiA, C and D proteins involved in the biosynthesis of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide: evidence for a membrane-bound complex*. Microbiology. 1998; 144 (Pt 10):2905-2914.
- 11). Mandel M, Higa A. *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. J. Mol. Biol., 1970;14;53(1):159-62.
- 12). Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose filters: procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979;76: 4350-4354.
- 13). Bronner D, Sieberth V, Pazzani C, Smith A, Boulnois G, Roberts I, Jann B, Jann, K. *Synthesis of the K5 (group II) capsular polysaccharide in transport-deficient recombinant Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 1993.;1;113(3):279-84.
- 14). De Maagd RA, Lugtenberg B. *Fractionation of Rhizobium leguminosarum cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, and cytoplasmic components*. J. Bacteriol. 1986; 167(3):1083-5.
- 15). Hayashi M, Miyoshi T, Takashina S, Unemoto T. *Purification of NADH-ferricyanide dehydrogenase and NADH-quinone reductase from Escherichia coli membranes and their roles in the respiratory chain*. Biochim. Biophys. Acta., 1989;26;977(1):62-9.
- 16). Waeber U, Buhr A, Schunk T, Erni B. *The glucose transporter of Escherichia coli. Purification and characterization by Ni<sup>+</sup> chelate affinity chromatography of the IIBCglc subunit*. FEBS Lett. 1993; 7;324(1):109-12.