



Małgorzata Nowaczyk-Cieszewska

**Rola domen I i III białka DnaA w tworzeniu
kompleksu inicjującego replikację chromosomu
Helicobacter pylori
(rozprawa doktorska)**

**The role of domains I and III of the DnaA protein in the assembly
of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex**

Promotor: dr hab. Anna Pawlik

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Wrocław 2018

SPIS TREŚCI

Streszczenie	4
Abstract	5
1. Wstęp	6
1.1 Inicjacja replikacji chromosomu we wszystkich domenach życia	6
1.2 Inicjacja replikacji chromosomu bakteryjnego	11
1.2.1 Bakteryjny region inicjacji replikacji na przykładzie <i>E. coli</i>	11
1.2.2 Inicjacja replikacji chromosomu bakteryjnego na przykładzie <i>E. coli</i>	14
1.3 Bakteryjne białko inicjatorowe DnaA	16
1.3.1 Budowa białka DnaA	18
1.4 <i>Helicobacter pylori</i>	27
1.4.1 Chromosomalny region inicjacji replikacji <i>Helicobacter pylori</i>	28
1.4.2 Inicjacja replikacji chromosomu <i>Helicobacter pylori</i>	30
2. Cel Pracy	32
3. Materiały i metody	33
3.1 Odczynniki i enzymy	33
3.2 Oligonukleotydy	33
3.3 Plazmidy	35
3.4 Techniki pracy z mikroorganizmami	37
3.4.1 Podłoża mikrobiologiczne	37
3.4.2 Szczepy bakteryjne	38
3.4.3 Hodowle bakteryjne	38
3.4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	38
3.4.3.1.1 Transformacja <i>E. coli</i>	39
3.4.3.2 <i>Helicobacter pylori</i>	39
3.4.3.2.1 Transformacja <i>H. pylori</i>	40
3.5 Techniki pracy z DNA	42
3.5.1 Izolacja plazmidów na małą skalę (tzw. miniprep)	42
3.5.2 Izolacja plazmidów na średnią skalę (tzw. midiprep)	42
3.5.3 Izolacja genomowego DNA	42
3.5.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	42
3.5.5 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	43
3.5.6 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych	43

3.5.7	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	43
3.5.8	Defosforylacja końców DNA	44
3.5.9	Ligacja	44
3.6	Techniki pracy z białkami	44
3.6.1	Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym – SDS-PAGE	44
3.6.2	Rekombinowane białka HpDnaA	46
3.6.2.1	Konstrukcja wektorów:	46
3.6.2.2	Izolacja białek	48
3.6.3	Immunoblotting (Western blotting)	50
3.7	Techniki analizy oddziaływań białka DnaA z DNA	51
3.7.1	Test rozplatania helisy DNA (unwinding)	51
3.7.2	Opóźniona migracja kompleksów białko-DNA w żelu poliakrylamidowym	52
3.7.3	Mikroskopia elektronowa	53
3.7.3.1	Protokół przygotowania próbek do obrazowania:	53
3.7.4	Powierzchniowy rezonans plazmonowy	55
3.7.4.1	Immobilizacja fragmentów DNA	55
3.7.4.2	Badanie oddziaływań białko - DNA	56
3.7.4.3	Analiza wyników	56
3.8	Analiza utrwalonych kompleksów białkowych	57
4.	Wyniki	58
4.1	Konstrukcja wektorów	58
4.1.1	Konstrukcja wektorów kodujących warianty rekombinowanego białka DnaA wykorzystywane w analizach <i>in vitro</i>	58
4.1.1.1	Konstrukty wektorów do syntezy wariantów rekombinowanego białka DnaA o różnym składzie domen	58
4.1.1.2	Konstrukty wektorów do syntezy rekombinowanych wariantów białka DnaA zmutowanych w obrębie domeny III	60
4.1.2	Konstrukty wektorów do syntezy rekombinowanych wariantów białka DnaA zmutowanymi w obrębie domeny III stosowanych do analiz <i>in vivo</i> .	61
4.2	Izolacja rekombinowanych wariantów białka DnaA <i>H. pylori</i>	64
4.3	Rola domen I-II białka DnaA w oligomeryzacji DnaA oraz oddziaływania DnaA z DNA	66
4.3.1	Analiza zdolności białka DnaA do oligomeryzacji	66
4.3.2	Analiza plazmonowego rezonansu powierzchniowego (SPR) wpływu domen I-II oraz III na oddziaływania DnaA-DNA	68

4.3.3	Analiza EMSA wpływu składu domenowego białka DnaA na oddziaływania DnaA z DNA	74
4.3.4	Analiza mikroskopii elektronowej wpływu domen I-II oraz domeny III na tworzenie kompleksów DnaA - DNA	76
4.3.5	Analiza wpływu domen I-II i III na zdolność białka DnaA do rozplatania helisy DNA	79
4.3.6	Wpływ oddziaływań białek DnaA – HobA na interakcje DnaA-DNA	81
4.3.6.1	Analiza wpływu oddziaływania białek HobA-DnaA na tworzenie kompleksów DnaA-DNA	81
4.3.6.2	Analiza wpływu oddziaływania HobA-DnaA na zdolność białka DnaA do rozplatania helisy DNA	82
4.4.1	Analiza SPR wpływu ATP i ADP na oddziaływania DnaA-DNA	83
4.4.2	Analiza SPR oddziaływania HpDnaAR334Astrep i HpDnaAR285Astrep z DNA	84
4.4.3	Analiza mikroskopii elektronowej wpływu mutacji w obrębie motywu AAA+ na tworzenie kompleksów nukleoproteinowych	86
4.4.4	Analiza wpływu ATP na rozplatanie DNA przez białko DnaA	88
4.5	Analiza wpływu syntezy wariantów białek DnaA zmutowanych w obrębie motywu AAA+ <i>Helicobacter pylori</i>	90
4.5.1	Przygotowanie szczepów <i>H. pylori</i> syntezujących zmutowane warianty białka DnaA	90
4.5.2	Wzrost bakterii <i>Helicobacter pylori</i> w zależności od mutacji w obrębie motywu AAA+	101
5.	Dyskusja wyników	103
5.1	Oczyszczanie rekombinowanych białek DnaA	103
5.2	Charakterystyka domeny I białka DnaA <i>H. pylori</i>	105
5.2.1	Oddziaływania HobA-DnaA	108
5.3	Charakterystyka domeny III DnaA <i>H. pylori</i>	108
5.3.1	Wpływ oddziaływania białka DnaA z nukleotydami ATP/ADP na jego aktywność	109
5.3.2	Wpływ mutacji w obrębie motywu AAA+ na aktywność białka DnaA	111
6.	Wnioski	114
7.	Bibliografia	115
8.	Załączniki	129

Rola domen I i III białka DnaA w tworzeniu kompleksu inicjującego replikację chromosomu *Helicobacter pylori*

STRESZCZENIE

Helicobacter pylori to mikroaerofilna, Gram-ujemna bakteria bytująca w przewodzie pokarmowym człowieka będąca czynnikiem etiologicznym m. in. wrzodów oraz nowotworów żołądka. Dotychczas badania nad procesem inicjacji replikacji chromosomu tej bakterii skupiały się na regionie *oriC* (*origin of chromosomal replication*) – pierwszym dwuczłonowym regionie inicjacji replikacji chromosomu bakterii Gram-ujemnych. Niewiele wciąż wiadomo o drugim czynniku zaangażowanym w inicjację replikacji – inicjatorowym białku DnaA *H. pylori*. Najwięcej informacji dotyczy domeny IV DnaA odpowiedzialnej za rozpoznawanie i wiązanie specyficznych sekwencji DNA zlokalizowanych w regionie *oriC*, tzw. DnaA-boksów. Informacje na temat pozostałych domen są fragmentaryczne i opierają się głównie na porównaniu sekwencji aminokwasowej do najlepiej scharakteryzowanego białka inicjatorowego – DnaA *E. coli*. Wysoka homologia białek DnaA *E. coli* i *H. pylori* sugeruje, że białko *H. pylori* wykazuje podobną charakterystykę strukturalno – funkcjonalną do białka *E. coli*.

Celem badań było eksperymentalne scharakteryzowanie roli domen I i III białka DnaA *H. pylori* w tworzeniu kompleksu inicjującego replikację chromosomu *H. pylori*. Pierwszy etap badań skupiał się na przygotowaniu serii rekombinowanych wariantów białka DnaA o zmiennym składzie domenowym oraz z mutacjami w obrębie domeny III. Następnie z zastosowaniem testów rozplatania DNA *in vitro*, sieciowaniu białek oraz technik SPR (*Plasmon Surface Resonance*), EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), mikroskopii elektronowej, zbadano w jaki sposób oddziaływania międzycząsteczkowe białka oraz oddziaływania DnaA z DNA zależą od składu domenowego białka DnaA. Pozwoliło to scharakteryzować oddziaływania zachodzące z udziałem domen I i III. Udowodniono zaangażowanie domeny I w tworzenie oligomeru DnaA, zdolność do homooligomeryzacji oraz jej istotną rolę w oddziaływaniach międzybiałkowych dalekiego zasięgu. Wykazano, że domena III odpowiada za zdolność białka DnaA do otwierania helisy DNA w regionie DUE (*DNA unwinding element*).

Kolejną część badań poświęcono określeniu *in vitro* wpływu mutacji w obrębie motywu AAA+ na oddziaływania między cząsteczkami DnaA oraz DnaA – DNA. Ponadto zbadano jaki wpływ na wzrost *H. pylori* ma synteza w komórce dodatkowych, zmutowanych w obrębie domeny III wariantów białka DnaA. Badania wykazały istotność zmutowanych reszt aminokwasowych dla oddziaływań międzycząsteczkowych, a obecność dodatkowych, zmutowanych kopii białka DnaA zaburzała wzrost bakterii *H. pylori*.

Wyniki przedstawionych badań pozwoliły na scharakteryzowanie roli domen I i III białka DnaA w tworzeniu kompleksu inicjującego replikację chromosomu *H. pylori* oraz poszerzyły dotychczasową wiedzę dotyczącą białka inicjatorowego DnaA.

The role of domains I and III of the DnaA protein in the assembly of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a microaerophilic, Gram-negative bacterium inhabiting the human digestive tract, being the important risk factor for the development of peptic ulcer and gastric cancer. So far, studies on the initiation of the chromosome replication of this bacterium focused on the *oriC* region (*origin of chromosomal replication*) - identified as the first bipartite origin in Gram-negative bacteria. There are still limited biochemical data for *H. pylori* DnaA - a second important factor of the initiation of chromosome replication. The best characterized domain of *H. pylori* DnaA, domain IV, is responsible for recognition and binding to specific DNA sequences, DnaA-boxes, localized in *oriC*. Data about other domains of the protein are mostly based on comparative *in silico* analyses with *E. coli* DnaA. High homology between *E. coli* and *H. pylori* proteins suggests similar characteristic of *H. pylori* DnaA.

The main goal of this work was to characterize the roles of domains I and III in the formation of *H. pylori* initiation complex. The first step of studies focused on purification of recombinant DnaA proteins composed of different domains and variants carrying mutations in domain III. The interactions between protein molecules and protein binding to DNA were studied using *in vitro* DNA unwinding test, protein crosslinking assay, SPR (*Plasmon Surface Resonance*), EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) and electron microscopy techniques. Results allowed to designate how domain composition influences DnaA interactions. It also allowed to characterize interactions mediated by domains I and III. It was proved that domain I of *H. pylori* DnaA self-interacts and mediates long-distance interactions between suboligomers formed at origin subregions. It was also shown that domain III is responsible for DNA unwinding at DUE (*DNA unwinding element*).

Last part of research was dedicated to *in vitro* studies on the influence of DnaA *H. pylori* mutation in AAA+ motif on protein-protein and protein-DNA interactions. Moreover it was analyzed whether additional copy of mutated DnaA proteins affects *H. pylori* growth. Results suggest high importance of mutated residues in examined interactions and on bacteria growth - additional DnaA mutated copies inhibited bacterial growth.

Presented results allowed to characterize the role of domains I and III of the *H. pylori* DnaA protein in the assembly of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex and expanded our knowledge about the initiator protein DnaA.

1. WSTĘP

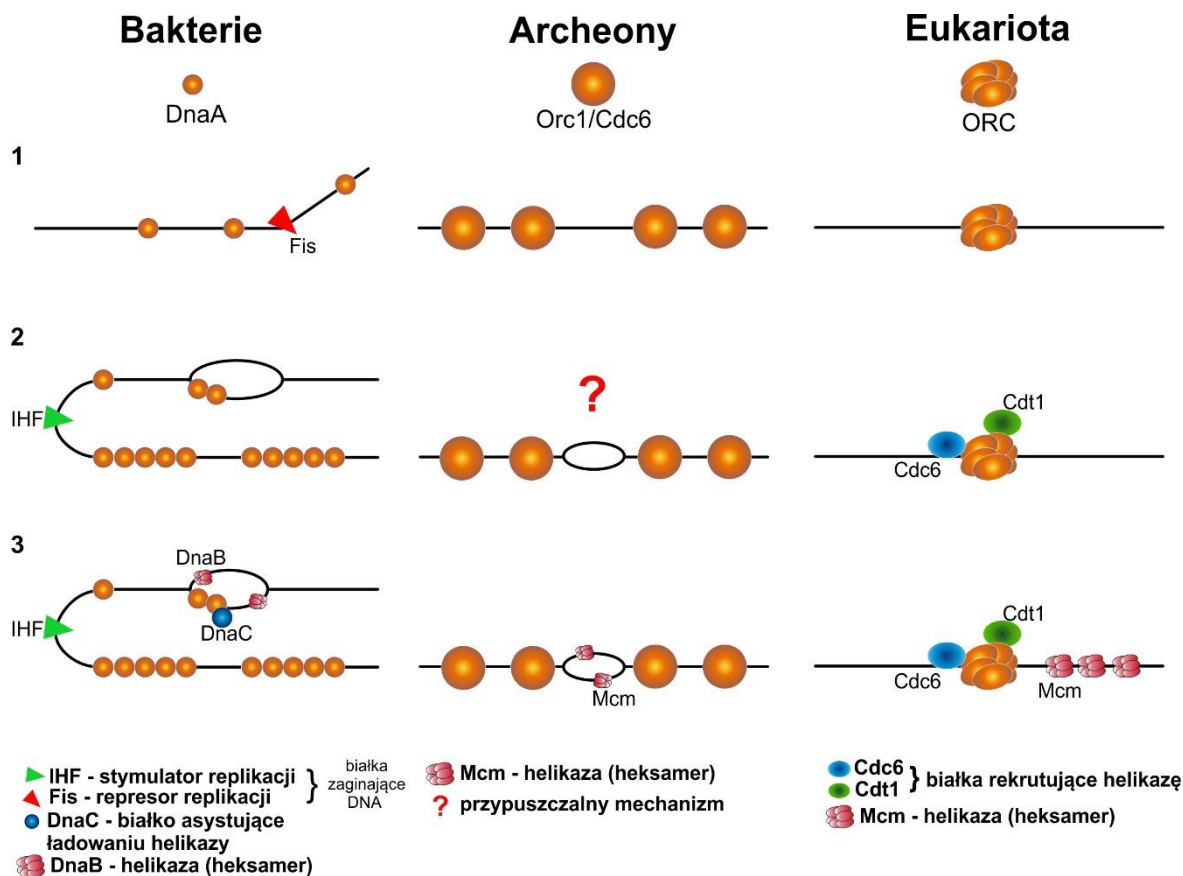
1.1 Inicjacja replikacji chromosomu we wszystkich domenach życia

Chromosom to jedna z najważniejszych struktur w komórce, zarówno prokariotycznej jak i eukariotycznej. W nim, w genach zakodowana jest m. in. informacja o białkach budujących cały organizm. Dlatego powielenie chromosomu/chromosomów jest kluczowym etapem w cyklu komórkowym, który podlega ścisłej kontroli i synchronizacji z innymi etapami rozwoju, jak wzrost i podział komórkowy (Katayama et al. 2010; Leonard and Méchali 2013).

Pierwszym i najważniejszym etapem powielania chromosomu jest inicjacja jego replikacji. Ten etap podlega ścisłej kontroli, a jego główne zadanie to rozdzielenie dwóch nici DNA i przygotowanie miejsca dla utworzenia kompleksu białkowego powielającego chromosom (Deegan and Diffley 2016). W 1963 roku przedstawiono hipotezę, według której w procesie inicjacji replikacji biorą udział dwa elementy współdziałające ze sobą (Jacob, Brenner and Cuzin 1963):

- Replikator – specyficzne miejsce na chromosomie, w którym rozpoczyna się powielenie DNA
- Inicjator – cząsteczka kodowana przez replikon, która oddziałując z replikatorem rozpoczyna replikację

Inicjacja replikacji zachodzi w ściśle określonym miejscu na chromosomie/chromosomach, nazywanym *ori* (ang. *origin*), charakteryzującym się określoną sekwencją i/lub strukturą rozpoznawaną przez białko/białka inicjatorowe lub białka replikacyjne. Mimo uniwersalności ogólnego schematu przebiegu inicjacji replikacji we wszystkich domenach życia (bakterie, archeony i eukariota), procesy różnią się w poszczególnych elementach (rysunek nr 1).



Rysunek 1 Porównanie schematu inicjacji replikacji u bakterii, archeonów i eukariota. Rysunek na podstawie (Ausiannikava and Allers 2017; Leonard and Méchali 2013). Przedstawiono 3 początkowe etapy inicjacji replikacji:

1 - rozpoznanie miejsca *ori* przez białka inicjatorowe (u eukariota kompleks ORC (ang. *origin recognition complex*), u archeonów i bakterii pojedyncze białka (odpowiednio Orc1/Cdc6 oraz DnaA),

2 - utworzenie kompleksu nukleoproteinowego inicjującego replikację, otwarcie helisy u bakterii i prawdopodobnie u archeonów,

3 - rekrutacja helikazy DNA.

Znaczącą różnicą pomiędzy replikacją chromosomów w trzech domenach życia jest liczba miejsc *ori* obecnych na chromosomie. Na chromosomie bakteryjnym jest tylko jedno miejsce *ori*. Uważa się, że archeony posiadają cechy charakterystyczne zarówno dla bakterii oraz eukariontów. Archeony posiadają zróżnicowaną liczbę miejsc *ori*, od jednego, podobnie jak bakterie (np. *Pyrococcus abyssi*), do kilku np. trzech, jak u *Sulfolobus solfataricus* i *Sulfolobus acidocaldarius*, co bliższe jest eukariontom (Barry and Bell 2006; Gao and Zhang 2007). W domenie eukariota na chromosomach licznie występują miejsca, w których rozpoczyna się proces replikacji. U drożdży (niższych eukariontów) zdefiniowano około 400 funkcjonalnych *ori* (Nieduszynski, Knox, and Donaldson 2006), a u człowieka szacuje się że jest ich 30-50 tysięcy (Méchali 2010).

Różnice w przebiegu procesu inicjacji replikacji pojawiają się nie tylko w liczbie miejsc *ori*, ale również na poziomie białkowego kompleksu inicjacyjnego. We wszystkich domenach życia

białka inicjatorowe rozpoznające miejsce *ori* mają wspólne cechy budowy: posiadają domenę o aktywności ATPazowej połączoną z domeną zawierającą motyw wiążący DNA (Costa, Hood, and Berger 2013). Mimo podobnej budowy, mechanizm działania czynników inicjatorowych, może różnić się w znaczący sposób w zależności od przynależności gatunku do danej grupy taksonomicznej.

Regiony *ori*

Na chromosomach bakteryjnych oraz niższych eukariontów (drożdże) w obrębie miejsca *ori* znajdują się sekwencje DNA rozpoznawane przez białka inicjatorowe. U bakterii są to nonamerowe, niepalindromowe sekwencje DNA powtarzające się kilkakrotnie w regionie *ori* nazywane boksami DnaA. Są one rozpoznawane i wiązane przez inicjatorowe białko DnaA. Ich rozpoznanie i związanie jest pierwszym etapem powielenia materiału genetycznego (Messer 2002). Oprócz boksów DnaA w bakteryjnym regionie *ori* znajduje się region niestabilny helikalnie, zazwyczaj bogaty w pary AT, tzw. DUE (ang. *DNA unwinding element*). W tym miejscu dochodzi do początkowego rozdzielenia nici DNA i powstania oczka replikacyjnego.

W przypadku drożdży miejsce inicjacji replikacji określa się mianem ARS (ang. *autonomous replication sequence*). Region ARS składa się z trzech domen: A, B i C. W obrębie domeny A zdefiniowano jedenastonukleotydowe sekwencje ACS (ang. *ARS consensus sequence*), w niektórych przypadkach wydłużone do 17 nukleotydów (tzw. EACS, *extended ACS*). Sekwencje ACS pełnią tę samą funkcję, co boksy DnaA. W obrębie domeny B, znajdującej się poniżej domeny A (w kierunku 3'), wiąże się kompleks inicjatorowy ORC (ang. *origin recognition complex*) oraz prawdopodobnie wiąże się helikaza MCM2-7. Jest to region, w którym z łatwością dochodzi do rozplecenia DNA (Dhar, Sehgal, and Kaul 2012). W domenie C znajdują się miejsca oddziaływań czynników transkrypcyjnych. Domeny A i B są niezbędne do utworzenia kompleksu ORC, natomiast w domenie C formowane jest oczko replikacyjne. Otwieranie helisy w domenie B wskazuje na podobieństwo tej domeny do regionu DUE u bakterii (Leonard and Méchali 2013). U wyższych eukariontów miejsce inicjacji replikacji nie jest tak jednoznacznie zdefiniowane jak u niektórych drożdży (np. *Saccharomyces cerevisiae*). Wiązanie ORC do *ori* zależy nie tylko od sekwencji DNA. Najczęściej kompleks wielopodjednostkowy wiąże się w miejscach bogatych w reszty guaniny (G), które nazywane są ORGE (ang. *origin G-rich repeated elements*). Zaobserwowano również częste występowanie *ori* w sąsiedztwie innych regionów bogatych w GC, np. wysp CpG oraz kwadrupleksów G (swoistych motywów zawierających tetraedry reszt guaniny). Miejsce wiązania ORC zależy również od topologii i wyższych struktur chromatyny,

między innymi od centrosomów, centromerów czy heterochromatyny (Cayrou et al. 2012). Przypuszcza się, że zlokalizowanie *ori* w sąsiedztwie częstszego występowania reszt GC może mieć również znaczenie dla regulacji inicjacji replikacji. Obserwacje u drożdży i wyższych eukariontów (*Drosophila*, mysz czy człowiek) wskazują, że nie tylko sekwencja jest istotna dla inicjacji replikacji, lecz również topologia i otoczenie *ori* – rodzaj, rozmieszczenie i ułożenie nukleosomów i histonów (Leonard and Méchali 2013).

W domenie archeonów region inicjacji replikacji chromosomu w swej budowie posiada cechy zarówno regionu *ori* bakteryjnego jak i eukariotycznego. Podobnie jak u eukariontów, u większości zbadanych przedstawicieli archeonów występuje więcej niż jedno miejsce, w którym rozpoczyna się replikacja chromosomu. Przykładowe liczby miejsc *ori*: 2 miejsca na głównym chromosomie *Haloflexax volcanii* (Norais et al. 2007), 3 miejsca u *Sulfolobus solfataricus* i *Sulfolobus acidocaldarius* (Lundgren et al. 2004), 1 miejsce u *Pyrococcus abyssi* (Matsunaga et al. 2003), 2 miejsca u *Aeropyrum pernix* (Robinson and Bell 2007). U niektórych archeonów stwierdzono występowanie w regionach *ori* kilkakrotnie powtórzonych sekwencji rozpoznawanych przez czynniki inicjatorowe, pełniące podobne funkcje jak boksy DnaA u bakterii. U *Pyrococcus sp.*, *Sulfolobus sp.* i *Aeropyrum sp.* zlokalizowano sekwencje 22-35 nt ORB (ang. *origin recognition box*) (Robinson and Bell 2007; Matsunaga et al. 2009). U *Pyrococcus sp.* i *Sulfolobus sp.* znaleziono ponadto kilkakrotnie (od 7 do 15 razy) powtórzone krótsze sekwencje ORB, nazywane miniORB (Matsunaga et al. 2009; Dueber et al. 2007; Robinson and Bell 2007). Natomiast u *Methanothermobacter sp.* w regionie *ori* występują jedynie miniORB (Capaldi and Berger 2004). Kolejnym podobieństwem pomiędzy regionami inicjacji replikacji bakterii i archeonów jest obecność sekwencji bogatej w AT (miejsce DUE) (Robinson et al. 2004; Matsunaga et al. 2009; Costa, Hood, and Berger 2013). U archeonów inicjacja replikacji chromosomu zależy nie tylko od związania sekwencji ORB. Na rozpoczęcie tego procesu ma również wpływ otoczenie regionu *ori* – topologia i związane do DNA białka inicjatorowe, podobnie jak u eukariontów (Robinson and Bell 2007). Trzy domeny życia można uporządkować względem gradacji zależności wiązania inicjator – DNA: bakterie (sekwencja DNA istotniejsza niż jego struktura), archeony (sekwencja i struktura DNA równie istotne) oraz eukariota (struktura DNA istotniejsza niż jego sekwencja) (Dueber et al. 2011).

Czynniki inicjatorowe

Jak już wspomniano, bakteryjnym czynnikiem inicjatorowym jest białko DnaA. Charakteryzuje się ono zdolnością do rozpoznawania i wiązania boksów DnaA. DnaA wiąże dwuniciowy DNA za pomocą motywu helisa-zwrot-helisa (HTH, ang. *helix-turn-helix*) zlokalizowanego na C-końcu białka. Obok domeny wiążącej DNA w białku DnaA znajduje się również domena o aktywności ATPazowej. Z racji swojej budowy zaliczana jest do rodziny AAA+ (ang. *ATPases Associated with diverse cellular Activities*) – ATPaz związanych z różnymi czynnościami komórkowymi. Po związaniu boksów DnaA przez DnaA wprowadzane są w DNA napięcia torsyjne i w regionie DUE następuje rozplecenie helisy DNA. Do powstałego oczka z pomocą białka ładującego helikazę rekrutowana jest helikaza DnaB w formie homoheksameru (m. in. *E. coli*, *B. subtilis*) lub dodekameru (*H. pylori*) (Bazin et al. 2015; Kawakami and Katayama 2010; Messer 2002; Velten et al. 2003). U *E. coli* białkiem ładującym helikazę jest DnaC, u *B. subtilis* za rekrutację helikazy odpowiedzialne są białka DnaB w kompleksie z DnaD (białka adaptorowe) i DnaI ładujące helikazę DnaC (Matthews and Simmons 2018; Velten et al. 2003). U wielu innych bakterii brak odpowiedników białek DnaC *E. coli* oraz DnaI *B. subtilis*. Najczęściej w zamian organizmy te posiadają gen *dciA* (ang. *dna[CI] antecedent*), którego produkt ekspresji prawdopodobnie pełni tę samą funkcję co wspomniane białka ładujące helikazę (Brézellec et al. 2016a).

W przypadku eukariontów za inicjację replikacji chromosomu odpowiada kilka białek tworzących kompleks rozpoznający region *ori*, tzw. ORC. ORC tworzy się jeszcze przed związaniem z DNA, a w jego skład wchodzi sześć podjednostek (Orc1-Orc6) tworzących kompleks wiążący się do określonych sekwencji DNA u niższych eukariota (np. *Saccharomyces cerevisiae*). U wyższych eukariota sposób w jaki rozpoznawane jest miejsce *ori* wciąż nie jest jednoznacznie określony i nie wyklucza się, że rozpoznanie różnych regionów inicjacji replikacji przebiega w odmienny sposób (Méchali 2010). Podobnie jak białko DnaA, ORC również należy do rodziny AAA+ i do swej aktywności wymaga związania ATP; 6-sta podjednostka kompleksu ORC, Orc6, nie należy do rodziny białek AAA+ (Duncker, Chesnokov, and McConkey 2009). Do kompleksu ORC, w sposób zależny od ATP, wiąże się białko regulujące podział komórkowy Cdc6 (ang. *Cell division control protein 6 homolog*). Powstały wielopodjednostkowy kompleks rekrutuje czynnik licencjonowania chromatyny i replikacji DNA, białko Cdt1 (ang. *chromatin licencing and DNA replication factor 1*). Cdt1 odpowiedzialne jest za rekrutację do *ori* helikazy MCM, która jest heteroheksamerem MCM2-7. Struktura złożona z ORC i MCM oraz białek Cdc6 i Cdt1 tworzy tzw. kompleks prereplikacyjny (pre-RC). Jego utworzenie w miejscu *ori* jest

„zezwoleciem” (ang. *licencing*) na rozpoczęcie replikacji (Bell and Dutta 2002; Kawakami and Katayama 2010; Pawlik and Grzanka 2010).

Czynniki inicjatorowe archeonów, podobnie jak miejsce rozpoczęcia inicjacji replikacji, wykazuje cechy wspólne zarówno z bakteriami jak i eukariotami. Strukturalnie białko inicjatorowe archeonów współdzieli cechy obu białek eukariotycznych Orc1 i Cdc6, dlatego określa się je jako Orc1/Cdc6 (Arora, Goswami, and Saha 2014). Białko Orc1/Cdc6 samodzielnie rozpoznaje sekwencje ORB i miniORB, co podobne jest w mechanizmie działania do bakteryjnego DnaA. Dodatkowo sposób rozpoznawania sekwencji przez Orc1/Cdc6 jest podobny do bakteryjnego DnaA – oba białka wykorzystują do tego C-kończącą domenę. W przypadku archeonów posiada ona motyw WDH: helisa-zwrot-helisa z dodatkowymi „skrzydłami” w postaci beta-kartek oddziałujących z DNA, lecz w innym miejscu niż helisa (ang. *winged-helix domain*) (Gajiwala and Burley 2000; Dueber et al. 2007). Białko inicjatorowe rekrutuje helikazę MCM, która w przeciwieństwie do helikazy eukariotycznej, zazwyczaj jest homoheksamerem w czym przypomina bakteryjne helikazy DnaB. Orc1/Cdc6, tak jak czynniki inicjatorowe pozostałych dwóch domen życia, należy do rodziny białek AAA+.

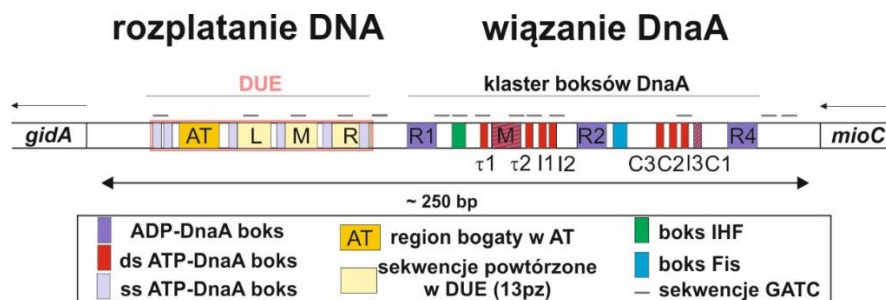
Porównanie ze sobą mechanizmów inicjacji replikacji chromosomów przedstawicieli wszystkich domen życia pokazuje, że jest to proces uniwersalny w swym ogólnym założeniu, a jednocześnie bardzo zróżnicowany w szczegółach budowy białek inicjujących replikację DNA oraz budowy regionów *ori* jak i przebiegu samego procesu.

1.2 Inicjacja replikacji chromosomu bakteryjnego

Proces replikacji chromosomu najlepiej poznano u modelowego organizmu *Escherichia coli* i na jego przykładzie zostanie omówiony w niniejszym rozdziale.

1.2.1 Bakteryjny region inicjacji replikacji na przykładzie *E. coli*

U bakterii region inicjacji replikacji zazwyczaj leży w pobliżu genu *dnaA*. Jednymi z wyjątków są regiony: *oriC E. coli*, oddalony od *dnaA* o ok. 40 kbp i leżący między genami *mioC* i *gidA*, oraz *oriC Caulobacter crescentus* i *Riccketsia prowazekii* leżące między genami *hemE* i *RP001*, oddalone o ok. 5000 bp od *dnaA* (Brassinga and Marczyński 2001; Brassinga et al. 2002).



Rysunek 2 Schemat regionu inicjacji replikacji chromosomu *E. coli* na podstawie (Donczew et al. 2014; Grimwade et al. 2018). Nazwa boksu M jest często zamiennie stosowana z nazwą R5. Boks R3, wcześniej uważany za boks 9-ciomerowy typu R, został podzielony na sekwencje innego typu (C3-C1).

Jak już wspomniano w rozdziale nr 1.1, w bakteryjnym regionie *ori* (w dalszej części nazywany *oriC*) wyróżniamy dwa elementy strukturalne: region z kilkukrotnie powtórzoną sekwencją DNA rozpoznawaną przez białko inicjatorowe (klaster boksów DnaA) oraz region niestabilny helikalnie, w którym następuje rozplecenie podwójnej helisy DNA (DUE) (rysunek nr 2). Ponadto w regionie *oriC* mogą znajdować się sekwencje wiązane przez inne białka związane z inicjacją replikacji (np. białka regulujące aktywność *oriC*) (Wolański et al. 2014).

Boksy DnaA

Boksy DnaA to charakterystyczne, najczęściej 9-cio nukleotydomowe, niepalindromowe sekwencje DNA rozpoznawane przez białko DnaA. Wyznaczono konsensową sekwencję tych boksów: 5'-TT^A/_TTNCACA-3', w której najbardziej zmienny jest 5 nukleotyd (oznaczony jako N). Boks o sekwencji 5'-TTATNCACA-3' (Schaper and Messer 1995) nazywany jest perfekcyjnym/idealnym, ponieważ charakteryzuje się największym powinowactwem do DnaA. Boksy pomiędzy sobą mogą różnić się sekwencją, co wpływa również na powinowactwo do białka DnaA. W regionie *oriC* *E. coli* znajdują się 4 boksy oznaczanych jako R1-R5 charakteryzujących się zróżnicowanym powinowactwem DnaA, ale sekwencją najbardziej zbliżoną do boksu konsensowego: w kolejności od najsilniej wiązanego do najslabiej są to R1=R4>R2>R5 (Ozaki and Katayama 2009). Oprócz boksów R w regionie *oriC* znajdują się sekwencje I1-I3 i C1-C3 różniące się 3-4 nukleotydami od konsensusu oraz sekwencje τ1- τ2 o jeszcze mniejszym podobieństwie do boksu idealnego, ale dzielące z I2-I3 6-cio nukleotydomowy rdzeń (5' - TGATCC - 3'). Boksy R2, R5, I1-I3, C1-C3 oraz τ1- τ2 charakteryzują się niższym powinowactwem do DnaA niż R1 i R4. Liczba boksów DnaA jest zmienna pomiędzy gatunkami, waha się w zakresie od 5 (*P. aeruginosa*, *V. cholerae*) do nawet 19 (*S. coelicolor*) (Donczew et al. 2012; Katayama, Kasho, and Kawakami 2017; Wolański et al. 2014)

Region DUE

Region bogaty w pary AT zazwyczaj znajduje się po jednej stronie boksów DnaA, nie pomiędzy nimi. W tym rejonie mogą występować wielokrotnie powtórzone sekwencje ze zwiększoną zawartością nukleotydów adenylowych i tymidylowych, np. tak jak ma to miejsce u *E. coli*; 13-merowe sekwencje 5'-GATCTNTTNTTTT-3' powtórzone trzy razy, nazywane L,M,R (Katayama et al. 2017) U innych bakterii (np. *Thermus thermophilus*) zamiast powtarzających się sekwencji zidentyfikowano dłuższy fragment DNA (40 pz) o podwyższonej zawartości par AT niż średnia wartość chromosomu (Schaper et al. 2000). Długość regionu DUE waha się pomiędzy 20 a 60 pz, w zależności od gatunku. Ta długość musi być wystarczająca, aby po otwarciu oczka możliwa była rekrutacja do niego helikazy DnaB. Pomiędzy zgrupowaniem boksów DnaA a DUE znajduje się istotny dla tworzenia oligomeru DnaA na ssDNA fragment *oriC*. Jest to sekwencja złożona z kilkakrotnie powtórzonych 3-nukleotydowych fragmentów DnaA-trio, o sekwencji konsensowej 3'-G/AAT-5'. Liczba powtórzeń DnaA-trio różni się pomiędzy gatunkami bakterii: u *B. subtilis* jest ok 5 powtórzeń DnaA-trio, u *E. coli* są ok 2 powtórzenia, a u *H. pylori* ok 8. Obecność DnaA-trio wpływa na wiązanie DnaA z jednoniciowym DNA umożliwiając lub wspomagając rozplatanie helisy DNA w regionie DUE (Richardson, Harran, and Murray 2016).

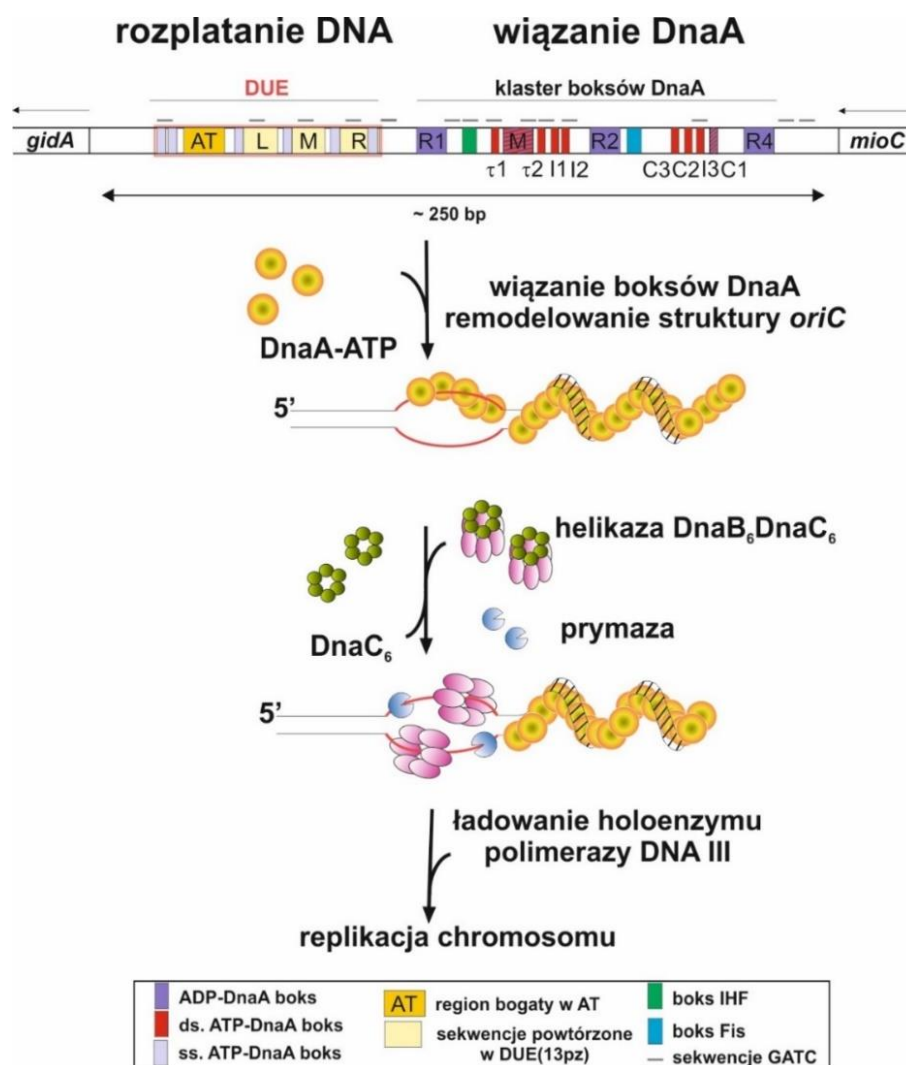
Wiązanie dodatkowych białek w regionie *oriC*

W regionie *oriC* *E. coli* znajdują się miejsca wiązania dwóch istotnych dla inicjacji replikacji chromosomu białek. Białko IHF związane z nukleoidem zakrzywia nić DNA, ponadto stymuluje wiązanie białka DnaA do boksów o średnim (R2) i niskim powinowactwie (R5, I1-I3) (Grimwade, Ryan, and Leonard 2000; Katayama, Kashi, and Kawakami 2017). W testach *in vitro* wykazano stymulację otwierania regionu DUE i promowanie replikacji pod wpływem białka IHF. Dodatkowo białko IHF stymuluje wiązanie DnaA do ssDNA w otwartym oczku replikacyjnym, co skutkuje stabilizacją oczka replikacyjnego w początkowej fazie replikacji (Ozaki and Katayama 2012). Drugim białkiem wiążącym region inicjacji replikacji jest FIS. Postuluje się, że białko Fis pełni rolę regulatora dostępu białka ATP-DnaA do boksów o niższym powinowactwie do DnaA w trakcie szybkiego wzrostu bakterii, gdy w komórkach znajduje się wiele miejsc *oriC* (Rao et al. 2018). Miejsce wiązania FIS znajduje się pomiędzy boksami R2 i C3. Prawdopodobnie zdolność białka FIS do zaginania DNA ma wpływ na ograniczenie dostępności boksów dla DnaA do boksów. Kolejnym białkiem oddziałującym z DNA w regionie *oriC* jest białko SeqA. Wiąże się ono do krótkich sekwencji GATC nadreprezentowanych w regionie inicjacji replikacji w stosunku do reszty chromosomu (Lu et al. 1994). SeqA wiąże hemimetylowane DNA (tylko nić

rodzicielska w nowosyntezyowanym DNA jest metylowana), co zapobiega ponownej inicjacji replikacji dopóki nie zostanie zakończona bieżąca runda powielania. Poza opisanymi białkami w regionie *oriC* wiążą się jeszcze białka: HU, stymulujące inicjację replikacji, oraz białka związane ze stresem tlenowym lub niedoborem tlenu, odpowiednio Dps i ArcA, hamujące inicjację replikacji (Katayama et al. 2017; Wolański et al. 2014).

1.2.2 Inicjacja replikacji chromosomu bakteryjnego na przykładzie *E. coli*

Jak już wcześniej wspomniano w inicjacji replikacji chromosomu biorą udział *oriC* i białko DnaA. Na rysunku nr 3 schematycznie przedstawiono współdziałanie tych dwóch elementów prowadzące do rozpoczęcia replikacji.



Rysunek 3 Schemat inicjacji replikacji u *Escherichia coli* na podstawie (Donczew et al. 2014; Grimwade et al. 2018). ADP-DnaA boks - sekwencja wiążąca DnaA niezależnie od rodzaju związanego nukleotydu ATP lub ADP; ATP-DnaA boks - sekwencja wiążąca DnaA związane z nukleotydem ATP; ds. - dwuniciowy DNA, ss - jednociowy DNA.

Związanie się białka DnaA do boksów DnaA to pierwszy etap inicjacji replikacji (Messer 2002; Leonard and Méchali 2013). Białko DnaA oddziałuje ze sobą, tworząc na nici DNA oligomer. Prawdopodobnie wprowadza to zmiany torsyjne w najbliższym otoczeniu powstałego kompleksu, co prowadzi do otwarcia podwójnej helisy w regionie DUE. Po otwarciu helisy oligomer DnaA wydłuża się obejmując jeszcze fragment jednoniciowego DNA w regionie DUE. Stabilizuje to nowopowstałe oczko, do którego następnie rekrutowana jest helikaza DnaB. Rekrutacja przebiega czteroetapowo. W fazie pierwszej wolna helikaza, będąca homoheksamerem, który w komórce tworzy planarny pierścień występujący w dwóch konformacjach określanych jako zwężony i rozszerzony (zależnie od względnej orientacji podjednostek w heksamerze konformacje różnią się średnicą kanału). W drugiej fazie do helikazy dołącza się białko ładujące DnaC, którego zadaniem jest dostarczenie DnaB do oczka replikacyjnego. Połączenie DnaC do DnaB skutkuje zahamowaniem aktywności ATPazowej helikazy oraz zablokowaniem jej zdolności do przesuwania się po jednoniciowym DNA. W fazie trzeciej kompleks helikaza-białko ładujące oddziałują z jednoniciowym ssDNA (ang. *single stranded DNA*) oraz białkiem DnaA w regionie *oriC*. Faza czwarta polega na hydrolizie ATP związanego z DnaC, co prowadzi do odłączenia od kompleksu białka ładującego z jednoczesnym przywróceniem funkcji enzymatycznych helikazy i jej zdolności do przesuwania się po ssDNA (Chase et al. 2018). DnaB wiązane jest do każdej z pojedynczych nici DNA i przesuwa się po niej w kierunku 5'-3', rozplatając kolejne fragmenty DNA i tworząc miejsce dla prymazy DnaG. DnaG odpowiedzialne jest za syntezywanie krótkich fragmentów RNA (4 pz), służących polimerazie DNA III jako startery do syntezy nici potomnych (polimeraza nie jest w stanie syntezywać nowych nici DNA *de novo* bez wykorzystania istniejącego już startera) (Berg, Tymoczko and Stryer 2008). Do oczka replikacyjnego rekrutowane jest białko DnaN (tzw. β -klamra) będące składnikiem holoenzymu polimerazy DNA III. Po utworzeniu replisomu i zakończeniu syntezy fragmentów Okazaki, β -klamra pozostaje na DNA i wiąże się z białkiem homologicznym do ADP-DnaA (Hda). Powstały kompleks ADP-Hda- β klamra-DNA stymuluje hydrolizę ATP związanego z białkiem DnaA, na skutek czego powstaje białko w formie związanej z ADP, które nie jest zdolne do inicjacji replikacji (Katayama et al. 2010). Jeszcze jednym białkiem mającym wpływ na inicjację replikacji jest DiaA. Białko to oddziałuje z DnaA wspomagając jego wiązanie do boksów DnaA. DiaA tworzy homotetramery (dimer złożony z homodimerów DiaA) mogące oddziaływać jednocześnie z 4 cząsteczkami DnaA (Ishida et al. 2004; Keyamura et al. 2007).

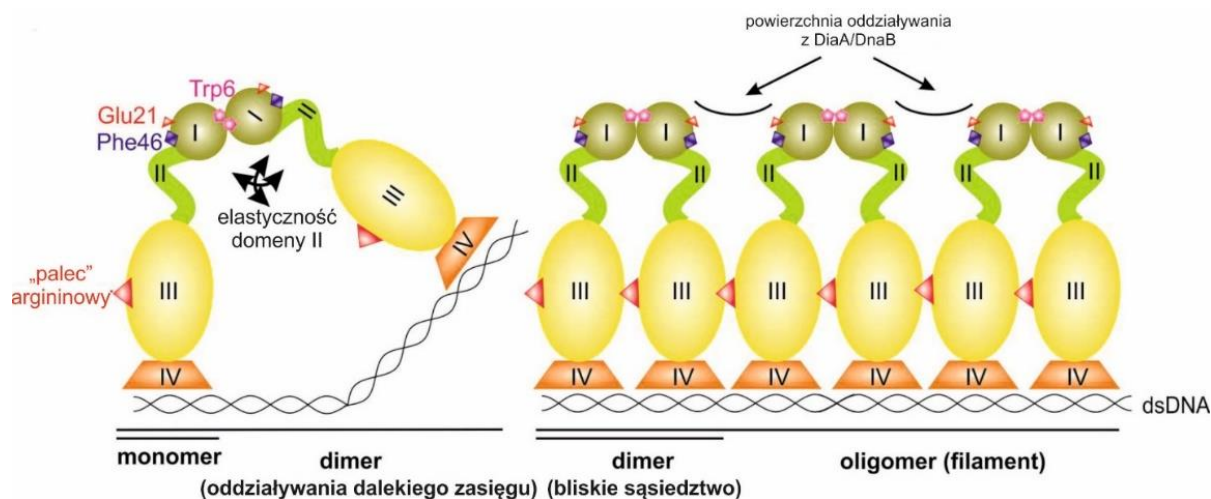
1.3 Bakteryjne białko inicjatorowe DnaA

Gen *dnaA* zidentyfikowano na chromosomach większości badanych mikroorganizmów z wyjątkiem kilku endosymbiotycznych bakterii np. *Azolla filiculoides*, *Blochmannia floridanus*, i *Wigglesworthia glossinidia*. W ich przypadku mechanizm inicjacji replikacji pozostaje nieznany (Akman et al. 2002; Gil et al. 2003; Ran et al. 2010). Białko DnaA odpowiedzialne jest za inicjację replikacji. Jego zwiążanie się do boksów DnaA (sekwencja boksu konsensusowego *E. coli* 5'-TT^A/_TTNCACA-3') w regionie *oriC* prowadzi do otwarcia helisy w regionie DUE. To podstawowe zadanie DnaA. Interesujące jest to, że jedno bakteryjne białko DnaA łączy w sobie funkcjonalność wielopodjednostkowych kompleksów białkowych (ORC) odpowiedzialnych za inicjację replikacji u eukariotów; jako jedyne jest zdolne nie tylko rozpoznać i zwiążać odpowiednie sekwencje, lecz również otworzyć helisę DNA.

Poza regionem *oriC* zlokalizowano kilka innych miejsc wiążania się DnaA na chromosomie, w tym również pomiędzy dwoma promotorami genu *dnaA* (np. *E. coli*). W zwiążku z istnieniem innych miejsc wiążania, zbadano czy DnaA pełni również rolę czynnika transkrypcyjnego. Wykazano, że DnaA pełni funkcję m. in. represora dla genów *dnaA*, *mioc*, *rpoH*, *uvrB*, *proS* (*E. coli*) i *sda* (*B. subtilis*) oraz aktywatora dla *nrd*, *gua*, *glpD*, *fliC*, *polA*, λ _R (*E. coli*) i *wlC*, *vpr*, operony: *yyzF-yydD*, *trmE-noc* i *ywcl-sacT* (*B. subtilis*) (Smith, McAteer, and Masters 1997; Messer and Weigel 2003; Smith and Grossman 2015).

Oprócz wiążania się z DNA w różnych regionach, DnaA oddziałuje z innymi białkami, które poprzez tę interakcję wpływają na inicjację replikacji np. DiaA (*E. coli*), HobA (*H. pylori*) lub są rekrutowane do oczka replikacyjnego (DnaB *E. coli*). Ponadto samo białko DnaA podlega regulacji swojej aktywności poprzez wiążanie kofaktora (ATP/ADP).

Złożoność pełnionych przez DnaA funkcji odzwierciedla się w złożoności jego budowy. Mimo różnic w sekwencji aminokwasowej białek z różnych organizmów ich budowa jest konserwowana. Białka DnaA składają się z czterech domen, pełniących różne funkcje. Wyznaczono je na podstawie porównania sekwencji wielu białek oraz eksperymentalnie (Messer and Weigel 2002, <https://owww.molgen.mpg.de/~messer/>) (Sutton and Kaguni 1997; Messer et al. 1999; Erzberger, Pirruccello, and Berger 2002)



Rysunek 4 Schemat budowy białka DnaA i tworzonych oligomerów na podstawie dostępnych informacji o białku DnaA *E. coli*. Zaznaczono najważniejsze aminokwasy odpowiedzialne za oddziaływania międzybiałkowe. Na podstawie (Zawilak-Pawlik, Nowaczyk, and Zakrzewska-Czerwińska 2017)

Tabela 1 Podsumowanie informacji o budowie i oddziaływaniach białek DnaA z różnych gatunków bakterii. Na podstawie (Zawilak-Pawlik et al. 2017)

	DOMENA I	DOMENA II	DOMENA III	DOMENA IV
INFORMACJE OGÓLNE	~10kDa; podobna do domeny KH; sekwencja słabo konserwatywna	~ok 5kDa; nieuorganizowana; największa zmienność sekwencji	~25kDa; motyw AAA+, wiąże i stabilizuje ssDNA	~13kDa; motyw HTH, wiąże dsDNA
ODDZIAŁYWANIA				
<i>E. coli</i>	domena I DnaA, DnaB, HU, Dps, DiaA, L2, YfdR, DnaN-Hda	nieznane	domena III DnaA, DnaN-Hda	boksy DnaA, DnaN-Hda
<i>H. pylori</i>	HobA	nieznane	nieznane	boksy DnaA
<i>B. subtilis</i>	SirA	nieznane	domena III DnaA, SojA, YabA, DnaD	
<i>S. coelicolor</i>	N-koniec DnaA	nieznane	nieznane	

1.3.1 Budowa białka DnaA

Dotychczas nie otrzymano kryształu białka DnaA pełnej długości z żadnego mikroorganizmu. Informacje na temat budowy przestrzennej DnaA to wypadkowa modelowań komputerowych, rozwiązanych struktur krystalicznych domeny I *E. coli*, *H. pylori*, *B. subtilis*, *A. aeolicus*, *M. genitalium*, domen III-IV *A. aeolicus* oraz domeny IV *E. coli* (Duderstadt, Chuang, and Berger 2011; Fujikawa et al. 2003a; Katayama 2017; Katayama et al. 2017). Szereg analiz *in vitro* i *in vivo* prowadzonych przez wiele zespołów naukowców na wariantach białka DnaA z punktowymi mutacjami oraz delecjami fragmentów białka, pozwoliło na identyfikację reszt aminokwasowych istotnych dla funkcji pełnionych przez DnaA. Większość badań została przeprowadzona na białku DnaA *E. coli*. W związku z dużą homologią struktur DnaA pomiędzy gatunkami, z dużym prawdopodobieństwem można założyć, że funkcje poszczególnych domen białka są zachowane u wielu gatunków bakterii. Jednak należy pamiętać, że istnieją różnice w sekwencji zarówno białek DnaA jak i regionów *oriC*, które mogą powodować różnice w mechanizmach molekularnych oddziaływań proteinowych i nukleoproteinowych poszczególnych gatunków bakterii.

Tabela 2 Podział białka DnaA różnych gatunków bakterii na domeny. Skrót aa oznacza aminokwasy. Na podstawie (Duderstadt et al. 2011; Fujikawa et al. 2003a; Katayama 2017; Katayama et al. 2017).

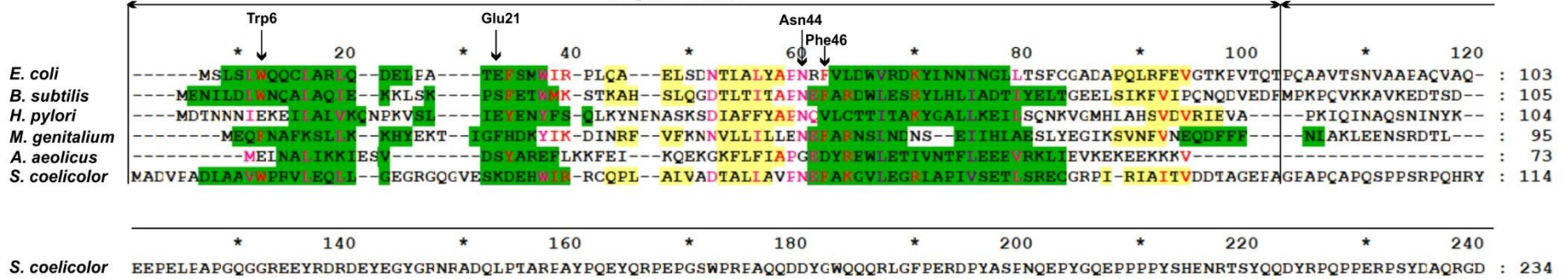
Bakteria	Domena I		Domena II		Domena III		Domena IV	
	Numery aa	Liczba aa	Numery aa	Liczba aa	Numery aa	Liczba aa	Numery aa	Liczba aa
<i>E. coli</i>	1-86	87	87-132	46	133-373	241	374-467	94
<i>B. subtilis</i>	1-89	90	90-111	22	112-353	242	354-446	93
<i>H. pylori</i>	1-90	91	91-110	20	111-349	239	350-459	110
<i>M. genitalium</i>	1-82	83	83-101	19	102-348	247	349-437	89
<i>A. aeolicus</i>	1-73	74	74-79	6	80-302	223	303-399	97
<i>S. coelicolor</i>	1-96	97	96-317	222	318-561	244	562-656	95

Tabela 3 Najważniejsze reszty aminokwasowe w białku DnaA; numeracja reszt zgodna z sekwencją białka DnaA *E. coli*, na podstawie (Katayama 2017; Katayama et al. 2017)

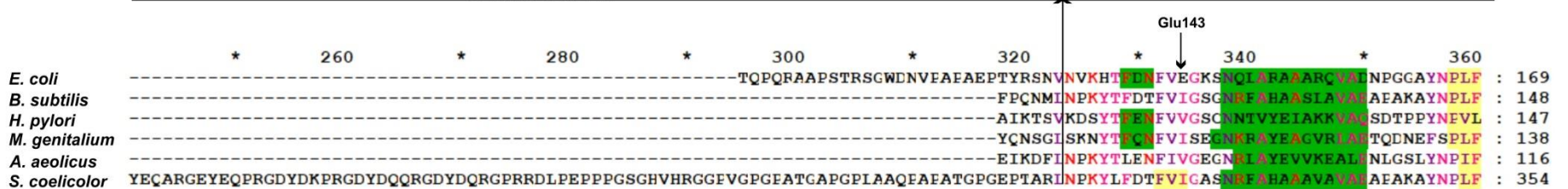
AMINOKWAS/AMINOKWASY	DOMENA	MOTYW, ZNACZENIE I/LUB FUNKCJA
Trp6 (W6)	I	Oddziaływania domena I - domena I
Glu21 (E21)	I	Oddziaływania z helikazą DnaB
Asn44 (N44)	I	Oddziaływanie z Hda
Phe46 (F46)	I	Oddziaływanie z helikazą DnaB, DiaA, YfdR
Glu143 (E143)	III	N-linker AAA+, stabilizacja wiązania ATP/ADP
Gly173 - His182 (G173-H182)	III	Motyw Walker A
Lys178 (K178)	III	Reszta aminokwasowa odpowiedzialna za wiązanie ATP
Glu204 - Ser228 (E204-S228)	III	Motyw charakterystyczny dla inicjatorów ISM (ang. <i>initiator specific motif</i>)
Val211 (V211)	III	Motyw H wiązania ssDUE
Arg227 (R227)	III	Motyw AID1, oddziaływania domena III-domena III
Leu232 - Asp235 (L232-D235)	III	Motyw Walker B
Arg245 (R245)	III	Motyw B wiązania ssDUE
Thr267-Asp269 (T267-D269)	III	Sensor I AAA+, stabilizacja wiązania ATP/ADP
Asp 269 (D269)	III	Istotna reszta aminokwasowa w sensorze I
Arg281-Phe286 (R281-F286)	III	Boks VII AAA+, oddziaływania domena III-domena III
Arg281 (R281)	III	Najistotniejsza reszta aminokwasowa w boksie VII
Arg285 (R285)	III	Palec argininowy AAA+, rozpoznawanie ATP, oddziaływania domena III-domena III
Leu290 (L290)	III	Motyw AID2, oddziaływania domena III-domena III
Arg334 (R334)	III	Sensor II AAA+, hydroliza ATP w systemach RIDA i DDAH
Leu366 (L366)	III	Odpowiada za zmiany konformacyjne zachodzące w powstającym kompleksie DnaA na <i>oriC</i>
Arg399-Lys443 (R399-K443)	IV	Motyw HTH, oddziaływanie z boksami DnaA
Leu422, Pro423 (L422, P423)	IV	Oddziaływanie z Hda
Arg432-His439 (R432-H439)	IV	Sekwencja charakterystyczna dla DnaA

Rysunek 5 (na następnej stronie) Porównanie sekwencji aminokwasowych wybranych białek DnaA. Sekwencje zestawiono z pomocą narzędzia PRALINE z serwera <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>. Kolorem zielonym zaznaczono helisy, a kolorem żółtym β -kartki. W przypadku domen I-II białek DnaA *E. coli* (pdb 2E0G), *H. pylori* (pdb 2WP0), *B. subtilis* (pdb 4TPS), *M. genitalium* (pdb 2JMP), domen III-IV DnaA *A. aeolicus* (pdb 3R8F) oraz domeny IV DnaA *E. coli* (pdb 1J1V) strukturę drugorzędową zaznaczono zgodnie z rozwiązanymi strukturami krystalograficznymi (numery z bazy pdb podane w nawiasach). Pozostałe struktury drugorzędowe to przewidywania wykonane przez PRALINE. Na złożeniu granatowymi i różowymi prostokątami zaznaczono na sekwencjach istotne dla aktywności białka. Motywy na podstawie: (Duderstadt et al. 2011; Fujikawa et al. 2003a; Katayama 2017; Katayama et al. 2017). Poziomymi strzałkami zaznaczono granice pomiędzy domenami, strzałkami pionowymi istotne dla białka DnaA *E. coli* reszty aminokwasowe, które opisano w tekście oraz zebrano w tabeli nr 3.

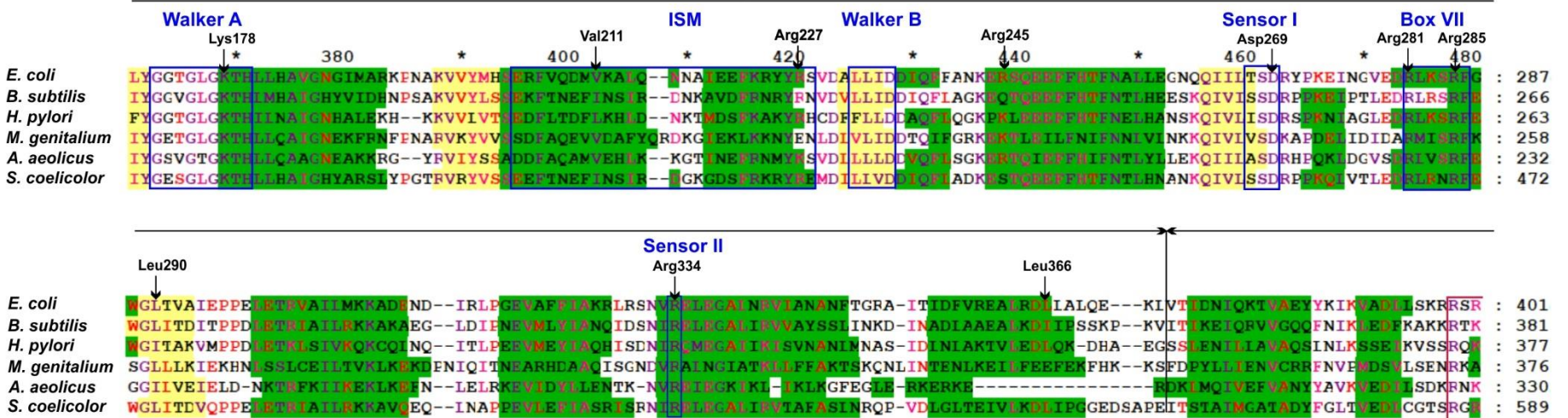
DOMENA I



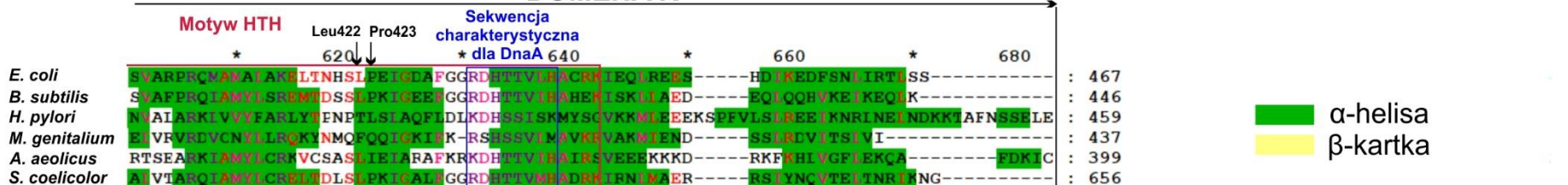
DOMENA II



DOMENA III



DOMENA IV

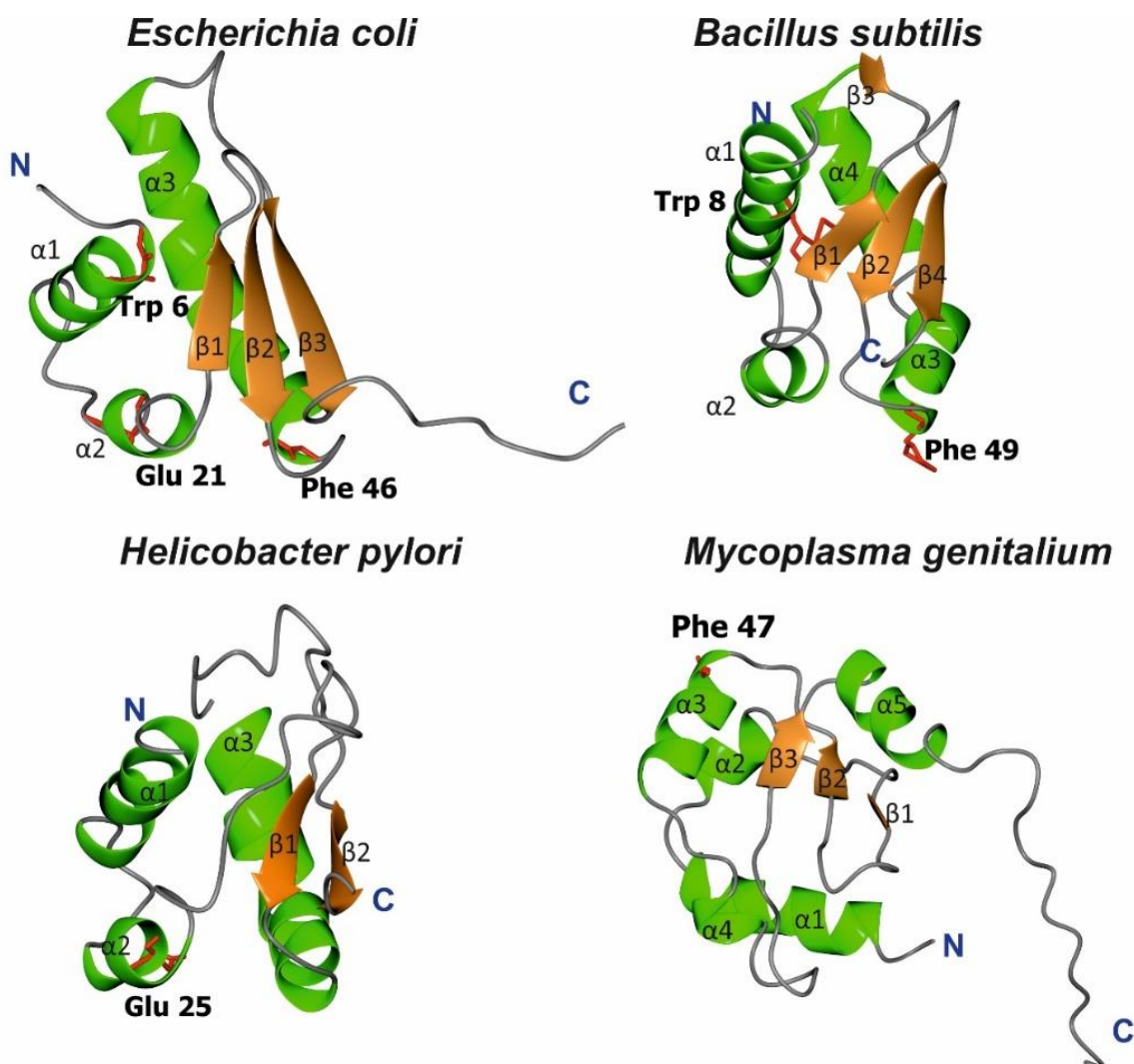


α-helisa
 β-kartka

Rysunek 5 Porównanie sekwencji aminokwasowych wybranych białek DnaA. Szczegółowy opis na poprzedniej stronie

Domena I: dotychczas otrzymano kryształy tej domeny kilku białek DnaA (m.in. *E. coli*, *B. subtilis*, *H. pylori*, *M. genitalium*). Na podstawie tych struktur oraz analiz bioinformatycznych uważa się, że ta N-końcowa część białka, o stosunkowo mało konserwatywnej sekwencji aminokwasowej, jednak wykazuje dużą homologię struktury drugo- i trzeciorzędowej. Kolejności α -helis i β -kartek w obrębie domeny I białek DnaA, których kryształy otrzymano, są następujące (rysunek nr 6):

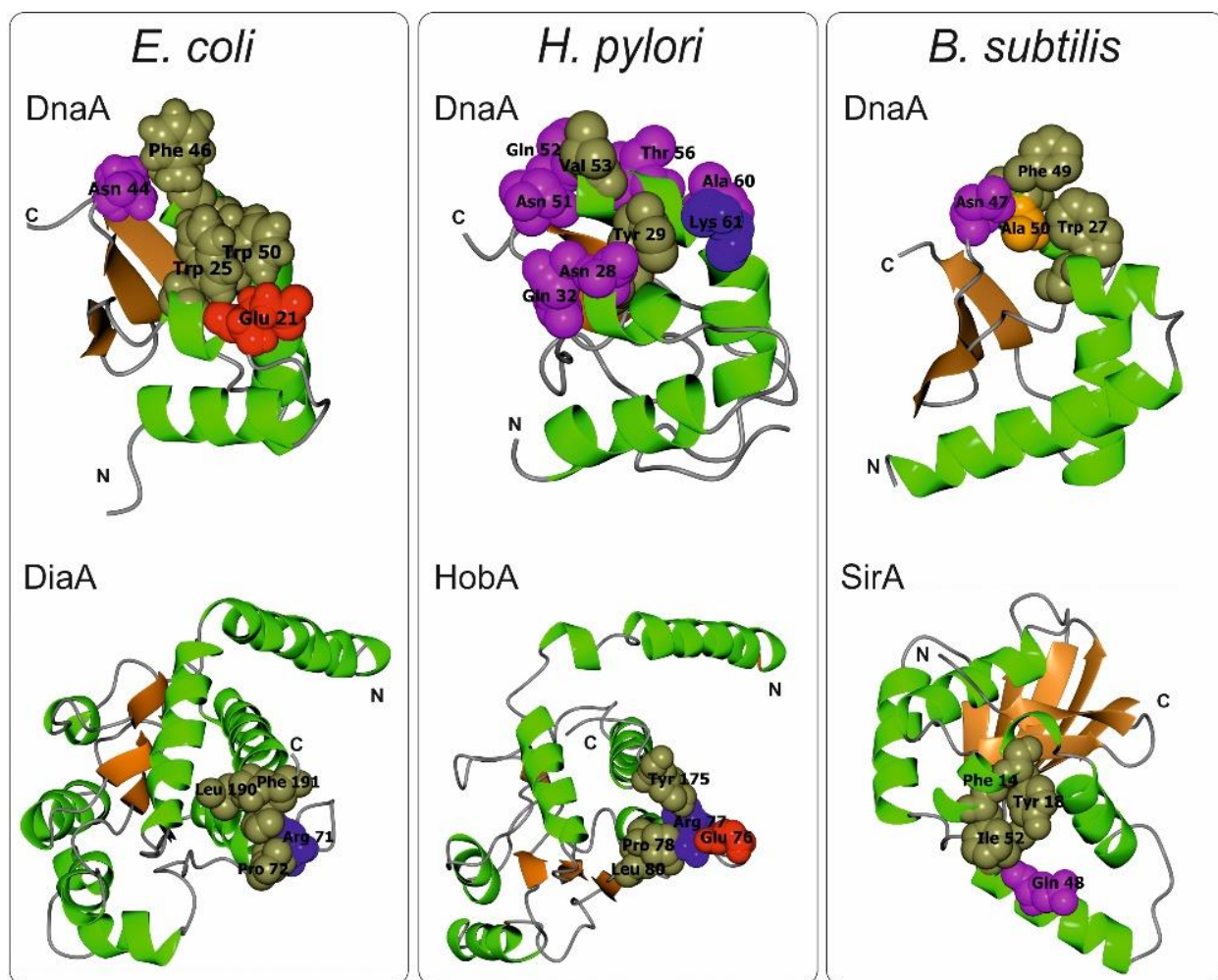
- *E. coli*: $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 3$,
- *B. subtilis*: $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 3$
- *H. pylori*: $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$,
- *M. genitalium*: $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 3$ - $\alpha 5$ - $\beta 4$



Rysunek 6 Modele przestrzenne domen I białek DnaA *E. coli* (pdb2E0G), *B. subtilis* (pdb 4TPS), *H. pylori* (pdb 2WP0) i *M. genitalium* (pdb 2JMP). Kolorem czerwonym zaznaczono reszty aminokwasowe ważne dla dimeryzacji (Trp) oraz oddziaływań z DnaB (Glu, Phe), jeżeli są konserwatywne. Na podstawie (Zawilak-Pawlik et al. 2017).

Wykazano, że domena I *E. coli* DnaA zdolna jest do dimeryzacji (Abe et al. 2007; Felczak, Simmons, and Kaguni 2005; Simmons, Felczak, and Kaguni 2003). Kluczowym aminokwasem dla homodimeryzacji jest tryptofan w pozycji 6 (Trp6). W przypadku N-końca białka DnaA *S. coelicolor* zaobserwowano homodimeryzację (Zakrzewska-Czerwińska et al. 2000). Dotychczas nie ustalono, czy domena I *B. subtilis* DnaA oddziałuje ze sobą. Z analizy sekwencji tej domeny można wnioskować, że jest ona zdolna do homodimeryzacji, ponieważ zachowana jest reszta tryptofanu w pozycji 8 (Trp8) homologiczna do Trp6 u *E. coli*. Według doniesień literaturowych domena I DnaA *H. pylori* nie dimeryzuje (Natrajan et al. 2009).

Za pośrednictwem domeny I dochodzi do oddziaływań z innymi białkami. W domenie I DnaA *E. coli* zidentyfikowano reszty istotne dla interakcji z helikazą DnaB (Glu 21, Phe 46) (Sutton et al. 1998; Abe et al. 2007). W sekwencji domeny I DnaA *H. pylori* znajduje się homologiczny glutaminian w pozycji 25, natomiast brak homologicznej fenyloalaniny. Dotychczas nie potwierdzono czy i w jaki sposób DnaA *H. pylori* oddziałuje z helikazą DnaB. Dla białek DnaA *E. coli* oraz *H. pylori* określono powierzchnię oraz istotne aminokwasy dla oddziaływań z białkami stymulującymi oligomeryzację DnaA, odpowiednio DiaA i HobA (rysunek nr 7). W DnaA *E. coli* aminokwasy znajdujące się na helisach $\alpha 2$ (Glu21, Trp25) oraz $\alpha 3$ (Asn44, Phe46 i Trp50) tworzą powierzchnię oddziałującą z aminokwasami Arg71, Pro72, Leu190 i Phe191 białka DiaA (Keyamura et al. 2007, 2009; Su'etsugu et al. 2013). W DnaA *H. pylori* w oddziaływaniach zaangażowane są aminokwasy: na helisie $\alpha 2$ Tyr29, Asn28 i Gln32, na helisie $\alpha 3$ Lys61, Val53, Gln52, Asn51, Thr56, i Ala60. Powierzchnia utworzona przez wymienione aminokwasy oddziałuje z powierzchnią białka HobA, którą budują aminokwasy Glu76, Arg77, Pro78, Leu80 i Tyr175 (Natrajan et al. 2009). W obu białkach DnaA w oddziaływaniach z DiaA/HobA zaangażowane są homologiczne struktury drugorzędowe (helisy $\alpha 2$ i $\alpha 3$). Mimo to, powierzchnie oddziaływań różnią się charakterem. W przypadku białka DnaA *E. coli* większość powierzchni oddziaływania jest hydrofobowa, u *H. pylori* powierzchnia jest polarna.



Rysunek 7 Modele przestrzenne domen I białek DnaA z *E. coli*, *H. pylori* i *B. subtilis* wraz z odpowiadającymi im oddziaływanymi partnerami, odpowiednio DiaA (pdb 4U6N), HobA (pdb 2WP0) i SirA (pdb 4TPS). Najważniejsze dla oddziaływań reszty aminokwasowe zaznaczono kolorowymi kulami. Poszczególne kolory odpowiadają typom aminokwasów: fioletowy - polarne, pomarańczowy - małe niepolarne, oliwkowozielony - hydrofobowe, czerwony - negatywnie naładowane, niebieski - pozytywnie naładowane. Na podstawie (Zawilak-Pawlik et al. 2017).

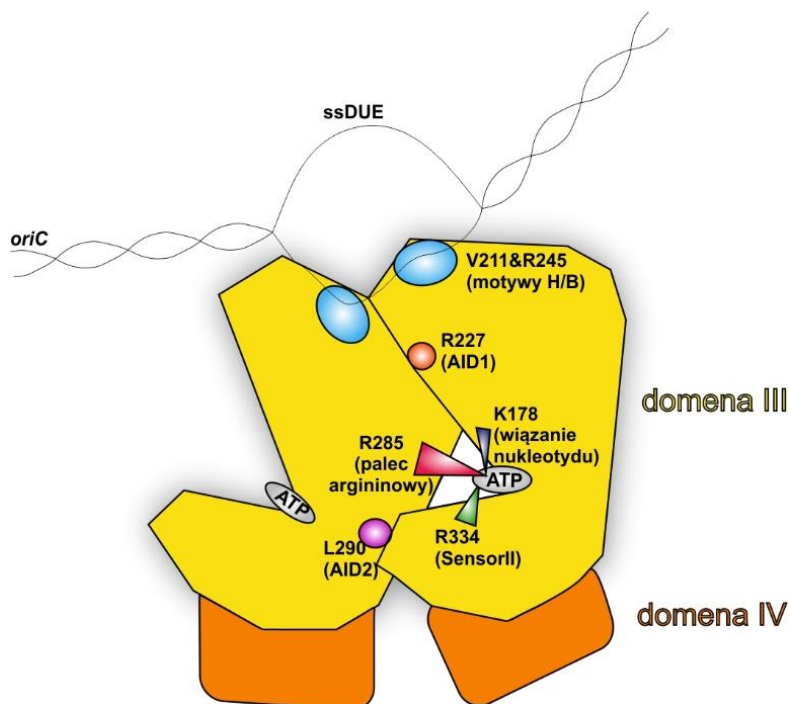
N-koniec białka DnaA *E. coli* oddziałuje również z wieloma białkami odpowiedzialnymi za regulację inicjacji replikacji, np. Hda (N44), YfdR (F46), HU, Dps i L2 (dla tych trzech białek nie określono dotąd, które aminokwasy domeny I z nimi oddziałują). Domena I białka *B. subtilis* wchodzi w interakcje z białkami SirA (synchronizuje inicjację replikacji ze sporulacją, hamuje inicjację dając pierwszeństwo sporulacji) i DnaD (białko wspomagające ładowanie helikazy) (Martin et al. 2018). Powierzchnia oddziaływania, podobnie jak w przypadku białek DnaA *E. coli* i *H. pylori*, znajduje się na helisach $\alpha 2$ i $\alpha 3$ (Jameson et al. 2014; Rahn-Lee et al. 2009). Dotychczas nie udało się określić mechanizmu pozostałych oddziaływań. W przypadku *H. pylori* na chromosomie nie zidentyfikowano homologów wspomnianych białek (Zawilak-Pawlik et al. 2007, 2017)

Domena I DnaA wykazuje podobieństwo do domeny homologii K (domena KH), która odpowiada za wiązanie RNA i ssDNA, a wielokrotnie powtórzony motyw KH zwiększa powinowactwo białka do ssDNA i RNA (Abe et al. 2007; Natrajan et al. 2009). Domena I DnaA *E. coli* wykazuje słabe powinowactwo do ssDNA (Abe et al. 2007), ale nie udokumentowano, czy jest to istotna funkcja, ponieważ białko pozbawione N-końca rozplata helisę w regionie DUE i stabilizuje ssDNA poprzez domenę III (Duderstadt et al. 2011; Richardson et al. 2016).

Domena II: ta część białka DnaA jest najbardziej zróżnicowana pod względem sekwencji oraz długości pomiędzy gatunkami. Jej długość waha się od 6 aminokwasów (*Aquifex aeolicus*) nawet do ok. 250 (*Streptomyces coelicolor*). Modelowania komputerowe sekwencji aminokwasowych nie wskazują na tworzenie się α -helis lub β -kartek ani innych uporządkowanych struktur. Uważa się, że jest to elastyczny łącznik pomiędzy N-końcem białka a domenami III i IV. W przypadku białka *E. coli* wykazano, że można usunąć część tej domeny bez znacznego uszczerbku na aktywności białka (Nozaki and Ogawa 2008). Postuluje się, że mimo możliwości usunięcia znacznego fragmentu domeny II, jej długość wpływa na wydajność procesu inicjacji replikacji poprzez utworzenie i odpowiednie umiejscowienie w przestrzeni powierzchni oddziaływania z DnaB (Molt et al. 2009). Z domeny II można nie tylko usuwać duże fragmenty białka bez szkody dla jego aktywności, ale również wstawić dodatkowo białko GFP, również zachowując funkcjonalność białka DnaA (*E. coli*) (Boeneman et al. 2009). Ponadto, jest to jedyne miejsce w białku DnaA *E. coli* gdzie można dokonać fuzji z GFP, w przypadku białka *H. pylori* fuzję z białkiem zielonej fluorescencji można dokonać na C-końcu (Zawilak et al. 2003).

Domena III: DnaA należy do rodziny białek AAA+. Związanie z odpowiednim nukleotydem jest kluczowe dla aktywności białka: ATP-DnaA to forma aktywna, prowadząca do rozpoczęcia replikacji chromosomu, ADP-DnaA to forma nieaktywna białka, niezdolna do inicjacji replikacji. W tej domenie znajdują się motywy związane z aktywnością ATPazową: Walker A i B, sensor I, boks VII i sensor II biorące udział w wiązaniu nukleotydów adeninowych (ATP oraz ADP) i hydrolizie ATP (Erzberger et al. 2002). Dotychczas w DnaA *E. coli* zidentyfikowano kilka aminokwasów szczególnie ważnych dla oddziaływań DnaA-DnaA oraz DnaA-DNA zależnych od ATP, często konserwowanych dla innych ortologów. Wykaz istotnych reszt aminokwasowych znajduje się w tabeli nr 3. R227 oraz L290 zaangażowane są w interakcje pomiędzy sąsiednimi domenami III białek DnaA. Podane aminokwasy to specyficzne dla ATP-DnaA loci istotne do otwierania DUE, odpowiednio AID1 (R227) oraz AID2 (L290) (ang. *ATP-DnaA specific interactive*

locus for DUE unwinding). Warianty białka DnaA z mutacjami R227A oraz L290A nie rozplatają DNA w regionie DUE (Ozaki et al. 2012). Oddziaływania, w które zaangażowane są AID1 oraz AID2, ustawiają w odpowiedniej orientacji reszty waliny 211 (V211) oraz argininy 245 (R245). Aminokwasy V211 i R245 tworzą odpowiednio motywy H (hydrofobowy, ang. *hydrophobic*) i B (zasadowy, ang. *basic*) odpowiedzialne za wiązanie jednoniciowego DUE (ssDUE, ang. *single-stranded DUE*) w regionie bogatym w reszty tymidylowe (Felczak and Kaguni 2004; Ozaki et al. 2008). V211 i R245 znajdują się w obrębie motywu charakterystycznego dla białek inicjatorowych ISM (ang. *initiator specific motif*) (Duderstadt et al. 2011). Arginina w pozycji 285 (R285) pełni rolę tzw. „palca argininowego”. Reszta R285 jest eksponowana po drugiej stronie cząsteczki białka w stosunku do miejsca wiązania ATP przez DnaA. Jest niezbędna do oddziaływań pomiędzy domenami III sąsiadujących białek (rysunek nr 4). Jej działanie można przyrównać do swego rodzaju zamka – palec argininowy pochodzący z jednego białka oddziałuje z cząsteczką ATP związaną z domeną III sąsiedniego tworząc oligomer DnaA (rysunek nr 8) (Kawakami, Keyamura, and Katayama 2005). R285 jest również istotna dla wiązania boksów ATP-DnaA. Ponadto R285 jest zaangażowana w hydrolizę ATP zależną od miejsca *datA* (DDAH, ang. *datA-dependent DnaA-ATP hydrolysis*), jednego z systemów regulacji aktywności DnaA za pomocą hydrolizy ATP. Zamiana tej argininy na alaninę (R285A) powoduje obniżenie zdolności białka DnaA do hydrolizy ATP (Kawakami et al. 2005). W pozycji 281 znajduje się arginina (R281) odpowiedzialna za hydrolizę ATP w systemie DDAH i jest jedną z najważniejszych reszt w boksie VII (Kawakami et al. 2005). Arginina 334 (R334), tworząca sensor 2, jest istotna dla aktywności inicjatorowej białka DnaA. Reszta aminokwasowa 334 oddziałuje z ATP związanym z cząsteczką DnaA, stabilizując jego wiązanie z białkiem. Zamiana tego aminokwasu na alaninę (R334A) powoduje wyłączenie hydrolizy ATP w białku DnaA, co prowadzi do niewrażliwości białka DnaA na regulacyjną inaktywację (RIDA, ang. *regulatory inactivation of DnaA*) (Nishida et al. 2002). Wykazano również, że taka substytucja powoduje zbyt częste inicjowanie replikacji chromosomu (Nishida et al. 2002).



Rysunek 8 Schemat oddziaływania domen III białka DnaA (na przykładzie *E. coli*) z sąsiadującą domeną III oraz jednoniciowym regionem DUE (ssDUE). Na schemacie zaznaczono reszty aminokwasowe zaangażowane w oddziaływanie. Na podstawie (Katayama et al. 2017)

Reszta asparaginianu 269 (D269), która znajduje się w sensorze 1, odpowiedzialna jest za stabilizację wiązania ATP - DnaA (Kawakami et al. 2006). Lizyna 178 (K178) jest ważna dla wiązania nukleotydów przez białko DnaA. Zmiana w tym miejscu na izoleucynę (K178I) prowadzi do blokady wiązania ATP przez DnaA oraz wiązania ADP (Mizushima et al. 1998). Leucyna 366 (L366) odpowiedzialna jest za zmiany konformacyjne zachodzące w powstającym oligomerze DnaA na *oriC*. Zamiana L366 na lizynę (L366K) powoduje zmianę aktywności białka DnaA: DnaA L366K związane zarówno z ATP jak i ADP zachowuje się tak, jak DnaA-ADP - jest nieaktywne pod względem inicjacji replikacji (Saxena et al. 2011).

Domena IV: tworzona jest przez C-koniec białka. Posiada motyw helisa-zwrot-helisa (motyw HTH), który odpowiada za rozpoznawanie sekwencji boksów DnaA i wiązanie ich przez białko (Erzberger et al. 2002; Obita et al. 2002). Domena ta jest niezbędna i wystarczająca do związania DNA. Związanie domeny IV DnaA *E. coli* powoduje zgięcie DNA o ok 28° (Fujikawa et al. 2003b). Reszty aminokwasowe 434-451 tworzą helisę, która jest częścią motywu HTH i oddziałuje specyficznie z zasadami nukleotydów w wielkim rowku DNA boksu DnaA, rozpoznając część 3' sekwencji konsensowej (5'-TNCACA-3'). Natomiast arginina 399 (R399), będąca częścią zwrotu z HTH, oddziałuje w małym rowku DNA rozpoznając część 5' sekwencji konsensowej (5'-TTA-

3') boks DnaA (Fujikawa et al. 2003b). Ponadto wykazano, że substytucje treoniny 435 na metioninę (T435M) oraz argininy 399 na alaninę (R399A) powodują utratę zdolności wiązania boksów DnaA (Sutton and Kaguni 1997; Blaesing et al. 2000). Pomiędzy domenami III i IV znajduje się niedługi łącznik w postaci elastycznej pętli umożliwiający zmianę położenia domeny IV (Erzberger et al. 2002). Symulacje dynamiki tworzenia oligomeru DnaA związanego *oriC* wykazały, że ta ruchomość jest istotna dla utworzenia kompleksu (Shimizu et al. 2016). Leucyna w pozycji 366 (L366) znajdująca się w helisie poniżej opisanego łącznika jest potrzebna do zmian konformacyjnych w kompleksach tworzących się podczas wiązania *oriC* (Shimizu et al. 2016). W domenie IV zidentyfikowano również aminokwasy oddziałujące z białkiem Hda – leucyna 423 (L423) i prolina 424 (P424) (Katayama et al. 2017; Keyamura and Katayama 2011).

1.4 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori to niewielka (2-5 μm długości, 0,5-1 μm szerokości), spiralna, ruchliwa Gram-ujemna bakteria, zasiedlająca środowisko ludzkiego układu pokarmowego. W 1984 roku dwóch australijskich lekarzy, Barry Marshall i Robin Warren, opisali bakterię wyizolowaną z biopłatów pobranych z żołądka i udowodnili, że jest ona odpowiedzialna za zapalenie żołądka i chorobę wrzodową. Odkrycie początkowo zostało przyjęte z bardzo dużą rezerwą, gdyż nie wierzono, że w tak kwaśnym środowisku żołądka, uważanego wręcz za aseptyczne, mogły przeżyć mikroorganizmy. Jednakże już w 1893 włoski naukowiec Giulio Bizzozero opisał helikalne bakterie żyjące w kwaśnym środowisku psiego żołądka. Warto wspomnieć polski wątek prac nad *H. pylori*. W 1899 chorobotwórczość helikalnych bakterii (nazwanych *Vibrio rugula*) postulował Walery Jaworski (polski lekarz, pionier gastrologii). Niestety swoje spostrzeżenia opublikował jedynie po polsku w książce „Podręcznik chorób żołądka i dietetyki szczegółowej” (Wydawnictwo Dziel Lekarskich Polskich, Kraków 1899). Taka forma publikacji i niepowodzenie w hodowli laboratoryjnej opisanych bakterii spowodowała brak zainteresowania odkryciem przez środowisko naukowe. Za odkrycie *H. pylori* i udowodnienie chorobotwórczości tej bakterii doktorzy Marshall i Warren zostali nagrodzeni w 2005 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii.

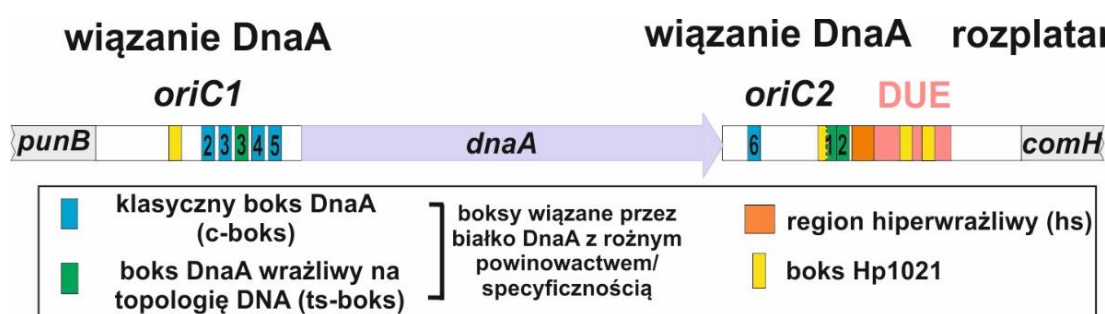
H. pylori jest mikroorganizmem chorobotwórczym człowieka. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) szacuje, że około 50% ludzkości jest zarażone tą bakterią. Jest ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka żołądka i chłoniaka związanego z błoną śluzową

(MALT). Mimo tego, że wiele osób zakażonych tą bakterią nie ma objawów klinicznych (Atherton 2006; Hunt 1996; Moss and Malfertheiner 2007), u wysokiego odsetka (ok 17%) zakażonych rozwinię się choroba wrzodowa (Malaty 2007). Szacuje się, że u jednej czwartej takich pacjentów (około 4,25% populacji) wystąpią powikłania choroby wrzodowej, a u 1% spowoduje to rozwój nowotworów żołądka (Malaty 2007; McGee and Mobley 2000). Jeśli przeliczymy te wartości procentowe na liczbę osób zakażonych *H. pylori*, to szacuje się, że kilkaset milionów ludzi (około 500 milionów) zostanie dotkniętych owrzodzeniem trawiennym, a u dziesiątków milionów (około 30 milionów) rozwinię się rak żołądka (Salih 2009). Dlatego w 1994 roku WHO zaklasyfikowała *H. pylori* jako karcynogen klasy I (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans 1994).

Ponieważ zakażenia *H. pylori* i konsekwencje związane z jej rozwojem w organizmach ludzkich są istotnym czynnikiem chorobotwórczym, większość grup naukowych badająca tę bakterię skupia się na zagadnieniu wirulencji. Procesy fizjologiczne oraz biologia molekularna tego mikroorganizmu jest wciąż niewystarczająco zbadana.

1.4.1 Chromosomalny region inicjacji replikacji *Helicobacter pylori*

OriC *H. pylori* znajduje się pomiędzy genami *punB* - *dnaA* - *comH*. Jest to pierwszy zidentyfikowany u bakterii Gram-ujemnych dwuczłonowy region inicjacji replikacji (rysunek nr 9) (Donczew et al. 2012). Wcześniej dwuczłonowe regiony *oriC* zidentyfikowano w bakteriach Gram-dodatnich, jak np. *Bacillus subtilis* (Moriya et al. 1999) i *Mycoplasma pulmonis* (Cordova et al. 2002).



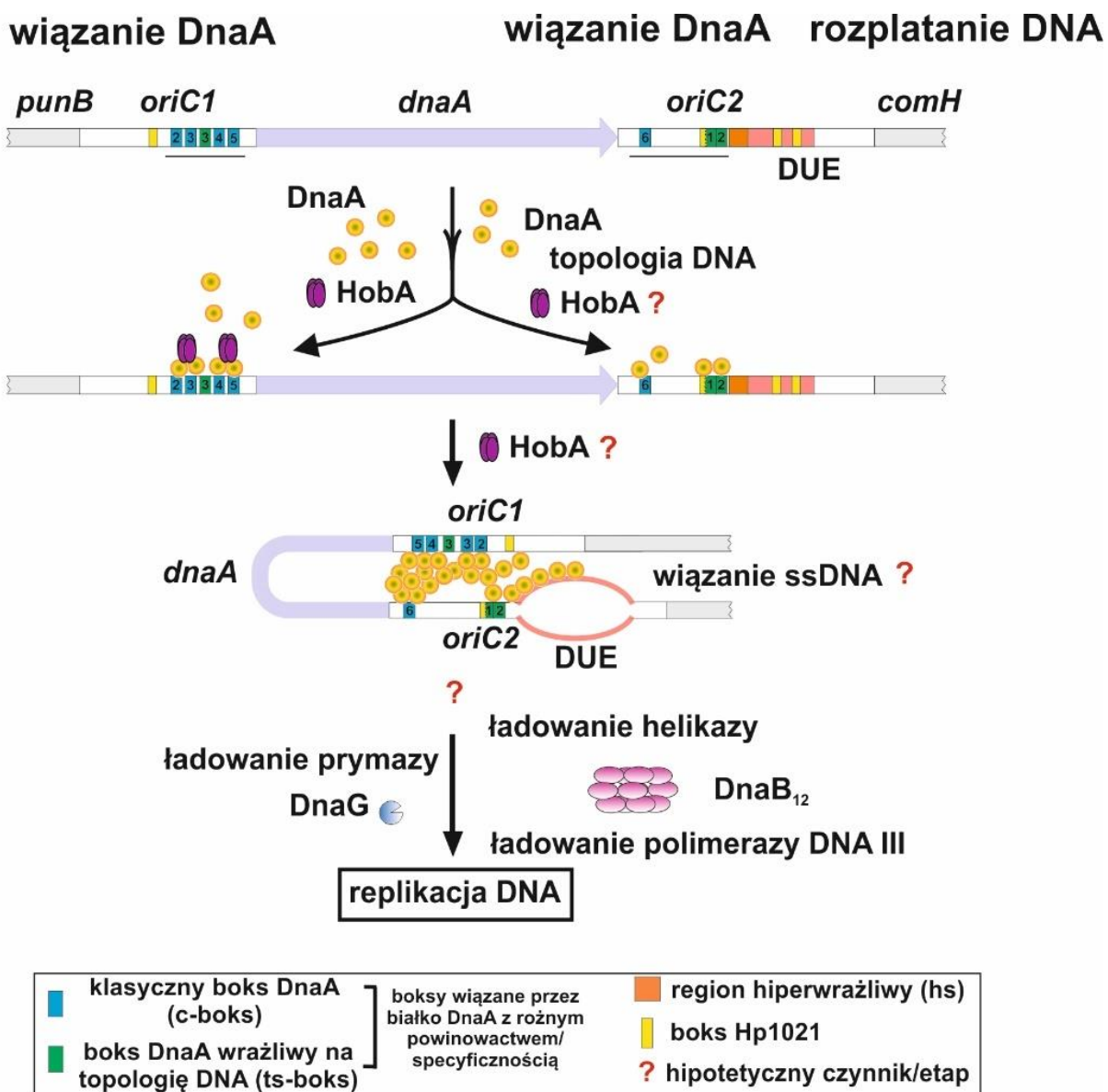
Rysunek 9 Schemat budowy regionu *oriC* *H. pylori*, na podstawie (Donczew et al. 2014; Jaworski et al. 2016; Jaworski nieopublikowane)

W regionie *oriC* *H. pylori* znajdują się dwa zgrupowania boksów DnaA, *oriC1* i *oriC2*. Okalają one gen *dnaA*, znajdujący się centralnej części regionu. W regionie *oriC1* zlokalizowane są 4 tzw.

boksy klasyczne c2-c5 (ang. *classic*, c-boksy) oraz tzw. boks wrażliwy na topologię ts3 (ang. *topology sensitive*, ts-boks). W regionie *oriC2* znajduje się jeden boks klasyczny c6 oraz dwa boksy zależne od topologii ts1-ts2 (rysunek nr 9). Wiązanie c-boksów zależy jedynie od sekwencji DNA, natomiast boksy ts1-ts3 są wiązane przez DnaA tylko wtedy, gdy DNA znajduje się w stanie superskręconym. Wiązanie boksów DnaA w regionie *oriC* zależne od topologii to dotychczas nieobserwowane u bakterii zjawisko. Przypomina to rozpoznawanie regionów *ori* u eukariota i archeonów, gdzie nie tylko sekwencja jest ważna do związania DNA, lecz również topologia i związanie innych białek do regionów okalających. Sekwencja konsensowa boksów DnaA *H. pylori* to 5'-T^C/_TATTACACN-3' i różni się od sekwencji konsensowej boksów *E. coli* w pozycjach 2 i 9. Ponadto sekwencje konsensowe boksów DnaA *H. pylori* i *E. coli* dodatkowo różnią się w 5 pozycji. U *E. coli* w tym miejscu może znaleźć się dowolny nukleotyd w przeciwieństwie do *H. pylori*, gdzie zawsze jest reszta tyminy (T). Poniżej *oriC2* znajduje się rozplątany region DUE, składający się z 64 pz o podwyższonej zawartości reszt A i T (81% AT w regionie DUE wobec 61% ogólnie na chromosomie) (Donczew et al. 2012) poprzedzony powtórzonym ośmiokrotnie motywem DnaA-trio (Richardson et al. 2016). Oprócz boksów specyficznych dla DnaA w regionie *oriC* znajdują się miejsca wiązania białka HP1021. Jedno z miejsc znajduje się w *oriC1*, trzy miejsca zlokalizowane są w *oriC2*, z czego pierwsze pokrywa się dwoma nukleotydami z boksem ts1 a drugie i trzecie zlokalizowane są w DUE. Dotychczas nie określono dokładnej roli białka HP1021 w regulacji inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori*. Wiadomo, że *in vitro* białko to konkuruje o wiązanie w regionie *oriC2* z DnaA, a jego oddziaływanie z *oriC2* hamuje rozplecenie DNA (Donczew et al. 2015).

1.4.2 Inicjacja replikacji chromosomu *Helicobacter pylori*

Proces inicjacji replikacji chromosomu u *H. pylori*, w przeciwieństwie do analogicznego procesu u *E. coli*, jest słabo poznany. Dotychczas badania prowadzono głównie *in vitro* i dotyczyły charakterystyki budowy i funkcji regionu *oriC* (rysunek nr 9).



Rysunek 10 Schemat inicjacji replikacji chromosomu *Helicobacter pylori* na podstawie (Donczew et al. 2014; Jaworski et al. 2016; Jaworski nieopublikowane)

Wiadomo, że związanie białka DnaA do boksów zachodzi w obu podregionach *oriC*. Nie wiadomo jednak, czy wiązanie przebiega jednocześnie do obu podregionów, czy też w określonej kolejności (najpierw wiązanie do *oriC1*, później *oriC2* lub odwrotnie). Oligomery DnaA powstałe

na podregionach *oriC* oddziałują ze sobą prowadząc do wypełnienia genu *dnaA* (rysunek nr 10). Po utworzeniu kompleksu DnaA-DNA powstałe w regionie DUE napięcia torsyjne powodują otwarcie podwójnej helisy. Z przeprowadzonych testów *in vitro* wynika, że obecność regionu *oriC1* nie jest niezbędna do rozplecenia helisy. Wyniki testów wykazały, że obecność *oriC2* jest do tego wystarczająca. *In vivo* wykazano, że DnaA oddziałuje z dwoma podregionami, *oriC1* i *oriC2* oraz że usunięcie regionu *oriC1* nie jest możliwe (Donczew et al. 2012). Ponadto zaobserwowano wydajniejsze rozplatanie DNA, gdy oba regiony znajdowały się w swoich dzikich loci. Prawdopodobnie obecność regionu *oriC1* stymuluje powstawanie orisomu i otwieranie helisy (Donczew et al. 2012). Prawdopodobnie białko DnaA *H. pylori*, podobnie jak białko z *E. coli*, wiąże ssDNA regionu DUE stabilizując w ten sposób otwarte oczko. W późniejszych etapach w nieznanym dotąd sposób do powstałego oczka replikacyjnego rekrutowana jest helikaza DnaB, prymaza DnaG oraz polimeraza DNA. U *H. pylori* nie odnaleziono białka homologicznego do białka DnaC *E. coli*, ani białka homologicznego do białka DnaI *B. subtilis* odpowiedzialnych za ładowanie helikazy DnaB *E. coli* (DnaC *B. subtilis*). Natomiast podobnie jak u innych bakterii nieposiadających homologów DnaC/DnaI, zidentyfikowano gen *dciA*. Uważa się, że białko DciA (ang. *Dna[CI] antecedent*) jest pierwotnym białkiem odpowiedzialnym za ładowanie helikazy DnaB (Brézellec et al. 2016b). Podobnie nie zidentyfikowano innych białek regulujących inicjację replikacji chromosomów innych bakterii. Jedynym dotychczas zidentyfikowanym białkiem oddziałującym z DnaA jest białko HobA, będące homologiem strukturalnym białka DiaA *E. coli*. HobA wspomaga wiązanie DnaA do boksów DnaA, ale dokładna rola i mechanizm działania HobA wciąż nie jest poznany. HobA, podobnie jak DiaA, tworzy homotetramery zbudowane z dwóch homodimerów i może jednocześnie oddziaływać z 4 cząsteczkami DnaA (Natrajan et al. 2009; Zawilak-Pawlik et al. 2007, 2011).

2. CEL PRACY

Dotychczas prowadzono intensywne badania nad wirulencją i chorobotwórczością *Helicobacter pylori*, podczas gdy podstawowe procesy fizjologiczne tej bakterii nie były przedmiotem wielu badań. Jednym z niewyjaśnionych wciąż procesów jest cykl komórkowy *H. pylori*. Do kluczowych etapów cyklu komórkowego zaliczamy powielenie materiału genetycznego, które jest kontrolowane głównie na etapie inicjacji replikacji chromosomu.

W ostatnich latach w naszym laboratorium prowadzono intensywne prace nad charakterystyką regionu inicjacji replikacji *H. pylori*, jednak wciąż mało wiadomo o czynniku inicjatorowym jakim jest białko DnaA tej bakterii. Dotychczas najwięcej informacji udało się uzyskać na temat oddziaływań domeny IV DnaA z *oriC*. Jednak aby uzyskać pełen obraz procesu, należy scharakteryzować wszystkie jego składowe, tj. region *oriC* oraz białko DnaA.

Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka domeny I i III białka DnaA:

- zbadanie roli oligomeryzacji DnaA w oddziaływaniu z DNA,
- określenie roli homooligomeryzacji domeny I w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego,
- określenie roli oddziaływania HobA-DnaA w tworzeniu orisomu oraz rozplataniu regionu DUE,
- analiza wpływu ATP i ADP na oddziaływania DnaA-DNA,
- charakterystyka wariantów białka DnaA zmutowanych w resztach aminokwasowych K156 (*E. coli* K178), R261 (*E. coli* R285) i R310 (*E. coli* R334), kluczowych dla aktywności białka związanej z oddziaływaniem z ATP/ADP.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Odczynniki i enzymy

W pracy, w odpowiednich rozdziałach opisujących metody badawcze, podawane jest pochodzenie odczynników, które, zgodnie z dotychczasowym doświadczeniem, mogą być krytyczne dla przebiegu eksperymentów, a ich zmiana może mieć istotny wpływ na powtarzalność wyników.

Pozostałe odczynniki stosowane w doświadczeniach mogą pochodzić od wielu dostawców, i według naszego doświadczenia ich pochodzenie nie ma znaczenia dla uzyskiwanych wyników.

3.2 Oligonukleotydy

Tabela 4 Spis oligonukleotydów wykorzystanych w pracy

NAZWA*	SEKWENCJA	UWAGI [§]
Hp1529rev_dstop <u>XhoI</u>	CCG <u>CTCGAG</u> TTCACCTGAATTGAAA GCGGTTTTT	Powielenie genu <i>dnaA</i> , bez kodonu STOP (1-1371pz), homologiczny do 3'końca genu
HP1529 <u>BamHI</u>	CGGGATCCATGGATACCAACAACA ATATTG	Powielenie genu <i>dnaA</i> homologiczny do 5'końca genu
HP1529_III_IV <u>BamHI</u>	GCGGATCCATGAGCGTCAAAGACT CTTACAC	Powielenie fragmentu kodującego domeny III-IV genu <i>dnaA</i> (323-1374pz), homologiczny do 5'końca genu
HP1529_IV <u>BamHI</u>	CCGGATCCATCCATGGATCATGCTG AAGGTTCAAG	Powielenie fragmentu kodującego domenę IV genu <i>dnaA</i> (1032-1374pz), homologiczny do 5'końca genu
HP1529I-II <u>XhoI</u>	CCG <u>CTCGAG</u> GTCTTTGACGCTCGTT TTTATGGCT	Powielenie fragmentu kodującego domeny I-II genu <i>dnaA</i> (1-336pz) homologiczny do 3'końca genu
DnaA <u>SphI</u> fwGA	CCAGAATAAAGTCG <u>G</u> CATGC	Powielenie fragmentu kodującego gen <i>dnaA</i> w obrębie domeny III, homologiczny do 5'końca genu; wykorzystywany do wprowadzenia mutacji K178I oraz R285A metodą Gibsona - (ang. <i>Gibson assembly</i>)
K178I_rev	CGTTTAAAATGTGCGTGATCCCTAA CCCTGTGCCGCCATA	Zestaw starterów używanych razem ze starterem DnaA <u>SphI</u> fwGA zastosowany do wprowadzenia mutacji K178I w genie <i>dnaA</i> metodą Gibsona
K178I_fw	TATGGCGGCACAGGGTTAGGGATC ACGCACATTTTAAACG	
DnaA <u>PvuI</u> revGA	GCGATGTTTTTAGG <u>C</u> GATCG	

R285A_rev	GCGGTTATCCCCATTCAAAGGCCG ATTTTAAGCGATCTTCTA	Zestaw starterów używanych razem ze starterem z DnaA_SphI_fwGA zastosowany do wprowadzenia mutacji R285A w genie <i>dnaA</i> metodą Gibsona
R285A_fw	TAGAAGATCGCTTAAAATCGGCCTT TGAATGGGGGATAACCGC	
DnaA_XhoI_revGA	TGGCTCCAAGCGCTCTCGAGTTCAC TTGAATTGAAAGCGG	
DnaA_PvuI_fwGA	GTATTGATTCAGACCGATCG	Zestaw starterów używanych razem ze starterem DnaA_XhoI_revGA zastosowany do wprowadzenia mutacji R334A w genie <i>dnaA</i> metodą Gibsona
R334A_rev	ATGATCGCGCCTTCCATTTGCGCAA TATTGTCGCTGATGTGTTG	
R334A_fw	CAACACATCAGCGACAATATTGCG CAAATGGAAGGCGCGATCAT	
Bio_HP0180_fw	BioCTCTATTTTGAAAACCCCTATTTTC	Powielenie genu <i>hp0180</i> znakowanego biotyną na końcu 5', wykorzystywanego w SPR jako kontrolny DNA niewiązany przez białko DnaA
HP0180_rev	CTATATTTTTTCAATGGTTTAGTGC	
Bio-pOCrv	BioCATGTTTGACAGCTTATCATCG	Powielenie regionu <i>oriC1</i> znakowanego biotyną na końcu 5', wykorzystywanego w SPR jako region wiązany przez białko DnaA
pOC_fw	GCATAAGATCTAGGAGTAAGA	
non-box_lower	AGCAATAAACGAGCTACATTGCGA GACTACTGCCTTAAAA	Hybrydyzacja tej pary oligonukleotydów tworzy fragment DNA znakowany biotyną na jednym z końców 5' wykorzystywany w SPR jako kontrolny DNA niewiązany przez białko DnaA
non-box_upper	BioTTTTAAGGCAGTAGTCTCGCAAT GTAGCTCGTTTATTGCT	
RHpbox2	AGGAATAACATGIGAATGAAATGT GAATGAAGCCTTAAAA	Oligonukleotydy z sekwencją DnaA boksów 2 i 3 znakowane biotyną na końcu 5' wykorzystywane w SPR do badania oddziaływania DnaA z sekwencjami boksów DnaA
FHpbox2	BioTTTTAAGGCTTCATTCACATTTCA TTCACATGTTATTCCT	
pOCrev	CATCGATAGGATATCCTGGG	Zestaw starterów do powielania regionu <i>oriC1</i> ze znacznikiem fluorescencyjnym FAM na końcu 5', wykorzystywany do EMSA
FAM-pOCfw	FAMGGAGTAAGAATAGCTTCGAAT	
T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG	Zestaw starterów hybrydujących do sekwencji promotora i terminatora T7 w wektorze pET21b(+)/Strep3.
T7term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
pILL50_57rev	GATCTGAATTCGAGCTCGGTAC	Uniwersalny starter hybrydujący w regionie 3' za miejscem klonowania w plazmidach pILL2150 oraz pILL2157
Fw_pILL2150	GGTGTTCACGAGCACTTCAC	Starter hybrydujący w regionie 5' przed miejscem klonowania w plazmidzie pILL2150
Fw_pILL2157	CGGATAACAATTAATTGTGAGCGG	Starter hybrydujący w regionie 5' przed miejscem klonowania w plazmidzie pILL2157

1530_Fw	CAGTTTCTATGTGAATGAAATTAT	Para starterów hybrydująca do chromosomu <i>H. pylori</i> powyżej oraz poniżej miejsca podwójnego crossing over pomiędzy genem <i>dnaA</i> a plazmidem pILL2284
1527_Rv	GTTGTTTCTAAAGAAAGTTTTTCA	
Lbox2+3lower	GGAATAACATGTGAATGAAATGTG AATGAAGCCTTAAACCAGACCAGG GCAC	Oligonukleotydy stosowane do stworzenia fragmentu z boksami DnaA 2 i 3 znaczonego FAM, stosowanego do EMSA.
Lbox2+3upper	TTTAAGGCTTCATTCACATTCATTC ACATGTTATTCC	
FAM-luego	FAMGTGCCCTGGTCTGG	

* w nazwie oraz sekwencji pogrubioną podkreśloną czcionką zaznaczono nazwy enzymów restrykcyjnych oraz rozpoznawaną przez nie sekwencję;

Bio - biotyna;

FAM - amid fluoresceiny - znacznik fluorescencyjny;

\$ startery związane z konstrukcją mutantów *dnaA* zaznaczone zostały na mapie genu *dnaA*, załącznik nr 1

3.3 Plazmidy

Tabela 5 Spis plazmidów wykorzystywanych w pracy

NAZWA	UWAGI
pET21b(+)Strep3	Wektor ekspresyjny, pochodna plazmidu pET21b(+), zawierająca w miejscu metki T7-tag sekwencję kodującą Strep-tag; Amp ^R ; (Jaworski et al. 2018) wykorzystywany do klonowania i ekspresji różnych wariantów genu <i>HpdnaA</i>
pET21HpDnaAstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAstrep
pET21HpDnaAIII-IVstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAIII-IVstrep
pET21HpDnaAI-IIstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAI-IIstrep
pET21HpDnaAI-II-IVstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAI-II-IVstrep
pET21HpDnaAIVstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAIVstrep
pET21HpDnaAK178Istrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAK178Istrep
pET21HpDnaAR285Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAR285Astrep
pET21HpDnaAR334Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAR334Astrep
pILL2150strep	Tzw. wektor czólenkowy <i>E. coli</i> - <i>H. pylori</i> (ang. <i>shuttle vector</i>); pochodna wektora pHeL2 z sekwencją genu LacZ pod kontrolą promotora <i>pTac</i> oraz dwiema kopiami <i>lacI^q</i> pod kontrolą promotora <i>pamiE</i> ; Cm ^R (Boneca et al.

	2008); wektor podlega replikacji w obu mikroorganizmach; synteza kodowanych na nim białek zachodzi również w dwóch gatunkach
pILL2157strep	Tzw. wektor czólenkowy <i>E. coli</i> - <i>H. pylori</i> (ang. <i>shuttle vector</i>); pochodna wektora pHeL2 z sekwencją genu LacZ pod kontrolą zmodyfikowanego promotora <i>ureI</i> oraz sekwencją genu <i>lacI^q</i> pod kontrolą promotora <i>amiE</i> ; Cm ^R (Boneca et al. 2008) wektor podlega replikacji w obu mikroorganizmach, natomiast synteza kodowanych na nim białek ma miejsce tylko w <i>Helicobacter pylori</i> .
pILL2150HpDnaA	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaA w <i>H. pylori</i>
pILL2150HpDnaAstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAstrep w <i>H. pylori</i>
pILL2150HpDnaAK178Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAK178Astrep w <i>H. pylori</i>
pILL2150HpDnaAR285Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAR285Astrep w <i>H. pylori</i>
pILL2150HpDnaAR334Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAR334Astrep w <i>H. pylori</i>
pILL2157HpDnaAstrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAstrep w <i>H. pylori</i>
pILL2157HpDnaAK178Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAK178Astrep w <i>H. pylori</i>
pILL2157HpDnaAR285Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAR285Astrep w <i>H. pylori</i>
pILL2157HpDnaAR334Astrep	Wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka HpDnaAR334Astrep w <i>H. pylori</i>
pILL2284	Wektor wykorzystywany do usuwania genu <i>dnaA</i> z locus na chromosomie na zasadzie podwójnego <i>crossing over</i> ramion homologii okalających gen <i>dnaA</i> i wymanię genu na kasetę <i>aph3</i> (Zawilak-Pawlik et al. 2007)
pori1ori2	Pochodna wektora pOC170, gdzie w miejscu regionu <i>oriC</i> z <i>E. coli</i> znajduje się region <i>oriC</i> (<i>oriC1dnaAoriC2</i>) <i>H. pylori</i> (Donczew et al. 2012)
pGEXHpDnaA(IV)	Pochodna wektora pGEX-KG zawierająca 343 pz kodujące domenę IV białka DnaA z <i>H. pylori</i> (Zawilak et al. 2001); wektor wykorzystywany do indukowanej syntezy białka GST-HpDnaAIV
pAZP23	Pochodna wektora pUT18C zmodyfikowanego w MSC (Zawilak-Pawlik et al. 2011) z wklonowaną sekwencją N-końca genu <i>dnaA</i> z <i>H. pylori</i> (reszty 1-112)

3.4 Techniki pracy z mikroorganizmami

3.4.1 Podłoża mikrobiologiczne

Odczynniki do hodowli *H. pylori*:

- H₂O, destylowana - (POCH - Avantor Performance Materials Poland S.A. (nr kat. 885040698))
- Cielęca surowica płodowa - (BioWest (nr kat. S1810-500))
- Brucella Broth - (Becton-Dickinson (nr kat. 211088))
- Odwłókniona krew końska - Pro Animal sp. z o. o.
- Columbia Blood Agar Base (CBA) - (Oxoid (nr kat. CM331))
- Brain Heart Infusion (BHI) - (Oxoid (nr kat. CM1135))

Do hodowli *E. coli*:

LB pH 7,5 [na 1 litr]

Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	10 g

Stałe podłoże LB

LB	1 l
Agar	15 g

SOB pH 7,0 [na 100ml]

Trypton	2,0 g
Ekstrakt drożdżowy	0,5 g
NaCl	0,05 g

KCl 250mM 1 ml

Po sterylizacji 0,5ml 2M MgCl₂

SOC

SOB	5 ml
Glukoza 1M	100 µl
MgCl ₂ 2M	25 µl

Do hodowli *H. pylori*:

CBA - Columbia Blood Agar

Columbia Blood Agar Base	4,875 g
H ₂ O POCH	112,5 ml
Odwłókniona krew końska	12,5 ml
Koktajl antybiotykowy	250 µl

Koktajl antybiotykowy [40ml]

PolimyksynaB:	6,2 mg
Vancomycyna:	250 mg
AmfoterycynaB:	50 mg
Trimetoprim:	125 mg

BBL

Brucella Broth	10,08 g
H ₂ O POCH	360 ml

Po sterylizacji, przed hodowlą dodawano 40 ml inaktywowanej termicznie (30 min, 56°C) cielęcej surowicy płodowej

BHI z glicerolem

Brain Heart Infusion	7,4 g
Glicerol 100%	40 ml
H ₂ O POCH	160 ml

3.4.2 Szczepy bakteryjne

Escherichia coli:

DH5 α – szczep stosowany do namnażania plazmidów

Genotyp: F- Φ 80dlacZ Δ M15 *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (*r_k⁻, mk⁺*) *supE44 relA1 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169

BL21 – szczep stosowany do nadprodukcji rekombinowanych białek

Genotyp: B F- *dcm ompT hsdS*(*r_Bm_B*)*gal*

MC1061 – szczep stosowany do namnażania plazmidów wykorzystywanych do transformacji *H. pylori* – szczep ten zapewnia odpowiednią metylację izolowanego DNA

Genotyp: K-12 F- λ - Δ (*ara-leu*)7697 [*araD139*]B/r Δ (*codB-lacI*)3 *galK16 galE15 e14- mcrA0 relA1 rpsL150*(Str^R) *spoT1 mcrB1 hsdR2*(*r-m⁺*)

Helicobacter pylori:

N6 – szczep *H. pylori*; wykorzystywany do eksperymentów *in vivo* związanych z mutacjami białka DnaA (Ferrero et al. 1992)

26695 – szczep *H. pylori*, którego genomowe DNA stosowane było jako matryca do klonowania genów *H. pylori* (Tomb et al. 1997)

3.4.3 Hodowle bakteryjne

3.4.3.1 *Escherichia coli*

Hodowle stałe prowadzono w szalkach Petriego zawierających podłoże LB-agar z lub bez dodatku odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego (ampicylina 100 μ g/ml, kanamycyna 50 μ g/ml, chloramfenikol 34 μ g/ml), w temp. 37°C.

Hodowle płynne prowadzono w kolbach stożkowych wypełnionych do 1/5 nominalnej objętości pożywką LB z lub bez dodatku odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego (stężenia jak w hodowlach stałych). Wzrost bakterii zachodził w wytrząsarce INFORS HT przy 180 RPM (obroty na minutę; ang. *rotations per minute*) oraz w temp. 37°C.

Hodowle stałe oraz płynne zaszczepiano bakteriami pobranymi bezpośrednio z kolonii z płytki z podłożem stałym lub biomasą pobraną z glicerolki.

Przechowywanie szczepów: Glicerolka to forma przechowywania szczepów bakteryjnych – nocne hodowle bakteryjne wzbogaca się o glicerol w końcowym stężeniu 20% (pełni funkcję krioprotektanta) i przechowuje w temp. -80°C.

3.4.3.1.1 Transformacja *E. coli*

Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* przeprowadzano metodą szoku cieplnego:

- 50 µl komórek kompetentnych rozmrażano na lodzie
- Dodawano około 10 ng plazmidu lub mieszaninę po ligacji
- Inkubowano na lodzie 30 min
- Inkubowano 90 sek. w temperaturze 42°C w łaźni wodnej
- Przenoszono na lód i inkubowano 2 min
- Do komórek z DNA dodawano 500 µl pożywki SOC o temperaturze pokojowej
- Hodowano w temp. 37°C z wytrząsaniem 180 RPM przez 1 h
- Wysiewano po 50 µl, 100 µl oraz całą pozostałą objętość hodowli po transformacji na podłoże LB-agar z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego
- Hodowano w temp. 37°C przez noc

3.4.3.2 *Helicobacter pylori*

Hodowle stałe prowadzono na plastikowych, wentylowanych płytkach Petriego na podłożu CBA bez lub z dodatkiem antybiotyków selekcyjnych (kanamycyna 15 µg/ml, chloramfenikol 8 µg/ml). Płytki układano w stosy i zamykano w specjalnych pojemnikach (słojach) do hodowli w zdefiniowanej atmosferze - wymiana atmosfery prowadzona była na dwa sposoby:

- z użyciem saszetek generujących odpowiednią atmosferę [CAMPYGEN, Oxoid: CN0025 na 2,5 l lub CN0035 na 3,5 l],
- odpompowanie powietrza i wprowadzenie z butli mieszanki gazów: 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂

Hodowle, zarówno stałe jak i płynne, prowadzono w temp. 37°C. Hodowle płynne wytrząsano przy 140 RPM.

Stosowano następujący ogólny schemat hodowli *H. pylori*:

Dzień 1: Na płytkę z podłożem stałym, w centralnej jej części, nakrapiano ok. 75 μ l hodowli z glicerolki. Płytki z naniesionymi hodowlami układano w stosy nakropioną powierzchnią do góry w celu uniknięcia spłynięcia hodowli i zamykano w słojach.

Dzień 2: Za pomocą sterylnych wymazówek pobierano biomasę i przenoszono na świeżą pożywkę stałą CBA. Kultury bakterii przesiewano rozmazując równomiernie pobraną biomasę na powierzchni pożywki aby uzyskać jednolity wzrost na całej powierzchni płytki (wzrost typu murawa).

Dzień 3: Z płytek z nocną hodowlą zbierano biomasę do dalszych eksperymentów lub do zabezpieczenia glicerolek.

Hodowle płynne dzień 1-2 jak w hodowlach stałych

Dzień 3: Z pobranej biomasy przygotowywano prehodowle płynne. Za pomocą wymazówki zaszczipiano 10 ml pożywki BBL do $OD_{600} \sim 0,5$. Hodowle prowadzono przez 8 h. Po upływie tego czasu hodowlę przeszczepiano do nowej pożywki do $OD_{600} \sim 0,05$; hodowlę prowadzono przez noc.

Dzień 4: Hodowle nocne przeszczepiano na nowe podłoże BBL, w celu prowadzenia dalszych hodowli bądź zwirowywano biomasy do późniejszej izolacji DNA.

3.4.3.2.1 Transformacja *H. pylori*

Do transformacji *H. pylori* wykorzystywano ich naturalną kompetentność do przyjmowania obcego DNA.

Przed transformacją *H. pylori* należało hodować tak jak to opisano w rozdziale 3.4.3.2 do dnia 2 włącznie.

Dzień 3: Na płytkę ze świeżą pożywką CBA nanoszono biomasę komórkową:

- z płytki z całonocną hodowlą na pożywkę stałą pobierano bakterie wymazówką
- wysiewano 5 niewielkich ok 1 cm hodowli (minihodowle) na płytkach bez antybiotyku selekcyjnego
- płytki inkubowano przez 4 h

- po 4 h inkubacji, na przygotowane minihodowle bezpośrednio наносzono roztwory zawierające DNA [3-10 µg DNA uzupełnione buforem EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) do 10 µl]; równolegle transformowano 3 rodzajami DNA: plazmidem wprowadzający zmienione wersje genu *dnaA* (tabela nr 5), plazmidem o sprawdzonej już wcześniej wydajności transformacji (kontrola pozytywna) oraz samym buforem EB (kontrola negatywna)
- płytki układano powierzchnią agaru do góry tak, żeby nie rozmazać nakropionego DNA
- bakterie hodowano przez całą noc

Dzień 4: Hodowle nocne przeszczepiano na nowe podłoże CBA z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym, przy czym każdą transformowaną minihodowlę przesiewano na 1 całą płytkę CBA. Płytki inkubowano 3 - 5 dni.

Dzień 7/9: Z płytek z rozsianymi transformantami przesiewano pojedyncze kolonie na płytkę podzieloną na 8 części. Kolonie pobierano sterylną ęzą i posiewano na trójkątnym polu na płytce, od brzegu w kierunku centrum płytki. Tak zaszczerpione płytki hodowano przez kolejne 2 - 3 dni. Ten oraz następny etap mają na celu przygotowanie dostatecznej ilości biomasy na pozyskanie materiału do izolacji DNA, w celu sprawdzenia, czy transformacja zakończyła się powodzeniem oraz zabezpieczenia glicerolek z otrzymanymi zmodyfikowanymi szczepami.

Dzień 9/11: Biomase z poszczególnych części płytki rozsiewano na pełne płytki z nowym podłożem CBA. Hodowano przez noc.

Dzień 10/12: Z płytek pobierano biomase do zabezpieczenia glicerolek oraz izolacji DNA w celu sprawdzenia, czy wprowadzono plazmid lub czy zaszła rekombinacja w miejscach homologii.

Zabezpieczanie glicerolek z hodowli *H. pylori*:

Biomase zebraną wymazówką z płytki z podłożem stałym zawieszano w 1ml pożywki BHI z 20% glicerolem. Następnie kilkakrotnie odwracano probówkę z zawiesiną góra-dół, aby zebrane komórki stworzyły jednorodną mieszaninę z pożywką. Tak przygotowaną glicerolkę przechowuje się w temp. -80°C.

3.5 Techniki pracy z DNA

3.5.1 Izolacja plazmidów na małą skalę (tzw. miniprep)

Plazmidy z 1,5 - 2 ml hodowli komórek *E. coli* DH5 α izolowano zestawem Plasmid Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcjami producenta.

3.5.2 Izolacja plazmidów na średnia skalę (tzw. midiprep)

Plazmidy z 50 ml płynnej hodowli komórek *E. coli* DH5 α i MC1061 izolowano zestawem Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcjami producenta.

3.5.3 Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA z *H. pylori* izolowano zestawem Genomic Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcjami producenta.

3.5.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcję PCR prowadzono w objętościach 20-100 μ l różnymi zestawami, w zależności od przeznaczenia powielanego fragmentu:

- do tzw. kolonijnego PCR (np. sprawdzenie, która kolonia po transformacji posiada właściwy plazmid/fragment DNA) stosowano polimerazę PCR Mix Plus (A&A Biotechnology)
- do powielania genów w celu klonowania stosowano High - Fidelity PCR Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific).

Reakcje prowadzone były zgodnie z zaleceniami producenta.

Standardowy przebieg etapów reakcji PCR:

95°C, 3 min	- denaturacja wstępna	} 25-30 powtórzeń
95°C, 30 sek.	- denaturacja	
Ts°C*, 30 sek.	- stapianie starterów	
72°C, ts** sek.	- synteza	
72°C, 5 min	- synteza końcowa	
12°C, 10 min	- schładzanie mieszaniny reakcyjnej	

*Ts=Tm-5, gdzie Tm=4x(C+G)+2x(A+T) - temperatura stapiania starterów wyliczona na podstawie składu nukleotydowego starterów

**ts – czas syntezy zależący od długości powielanego fragmentu DNA przy założeniu wydajności stosowanych polimeraz 1000 pz/min

3.5.5 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Plazmidy oraz fragmenty DNA trawione były enzymami restrykcyjnymi serii Fast Digest (ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta.

3.5.6 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

Do oczyszczania fragmentów DNA po reakcji trawień enzymatycznych oraz reakcji PCR po rozdziale w żelu agarozowym stosowano zestaw Gel Out (A&A Biotechnology) zgodnie z zaleceniami producenta. W przypadku przygotowywania próbek do sekwencjonowania, produktów PCR nie oczyszczano w żelu agarozowym tylko bezpośrednio zestawem Gel Out.

3.5.7 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Fragmenty DNA o wielkości 200-9000 pz rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym. Dla zobrazowania prążków DNA do żelu agarozowego dodawano fluorescencyjny barwnik SimplySafe (EURX). Do próbek nanoszonych na żel dodawano 1/5 objętości buforu do próbek, chyba że próbki, w których inkubowano DNA podczas reakcji enzymatycznych zawierały już obciążnik do elektroforezy. Rozdział DNA prowadzono w aparacie do elektroforezy horyzontalnej w buforze 1xTBE, w temperaturze pokojowej, przy napięciu 8-10 V/cm. Wielkości analizowanych fragmentów DNA określone były poprzez porównanie z jednocześnie nanoszonymi wzorcami wielkości. Stosowano wzorce mas λ /PstI (DNA faga λ trawiony enzymem PstI, wzorzec przygotowywany w laboratorium), GeneRuler 1kb DNA Ladder oraz GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific).

Bufor 10xTBE

Tris	890 mM
Kwas borowy	890 mM
EDTA	20 mM

Bufor 6x do próbek

Glicerol w H ₂ O	30%
Błękit bromofenolowy	0,25%
Cyjanol ksylenu FF	0,25%

3.5.8 Defosforylacja końców DNA

Reakcję defosforylacji DNA przeprowadzano za pomocą termowrażliwej alkalicznej fosfatazy (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta.

3.5.9 Ligacja

Do ligacji stosowano trzykrotny molowy nadmiar insertu względem wektora. Reakcja prowadzona była przez noc w temperaturze 4°C w objętości 10-20 μ l, z czego 0,5-1 μ l stanowiła Ligaza T4 (ThermoFisher Scientific nr kat. EL0011) oraz proporcjonalna objętość buforu 10x do ligacji. Po reakcji mieszaninę ligacyjną stosowano bezpośrednio do transformacji szokiem cieplnym lub zamrażano w temp. -20°C do późniejszego wykorzystania.

3.6 Techniki pracy z białkami

3.6.1 Elektroforetyczny rozdział białek w żelu poliakrylamidowym – SDS-PAGE

Rozdział elektroforetyczny białek prowadzony był w warunkach denaturujących w aparatach do elektroforezy wertykalnej. Przygotowywano minizele o wielkości 8,6x6,8x0,1 cm stosując zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Cell firmy BioRad. Stosowano dwa rodzaje żeli – klasyczne oraz tzw. stain free, zawierające 2,2,2-trichloroetanol (TCE) (Sigma Aldrich, nr kat. 8086100100) które umożliwiają wizualizację białek zaraz po zakończeniu elektroforezy bez konieczności dodawania barwników. Ograniczeniem metody „stain free” jest jej wykorzystanie tylko do wizualizacji białek zawierających tryptofan, ponieważ tylko ten aminokwas ulega reakcji z 2,2,2-trichloroetanolem pod wpływem światła UV (300 nm, do pierścienia indolowego dołączana jest grupa formylowa) dając fluorescencyjny produkt (Ladner et al. 2004)

Próbki przygotowywano z osadów komórkowych lub oczyszczonych preparatów białkowych poprzez dodanie 1/3 objętości obciążnika do próbek 4x β i podgrzaniu do temp. 95°C przez 5 min w celu denaturacji białek. Rozdział przeprowadzano przy natężeniu prądu 35 mA. Po elektroforezie żele barwiono CBB lub, w przypadku żeli „stain free” detekcję prowadzono wykorzystując Gel Doc XR+ System (Biorad) po wcześniejszym naświetleniu promieniami UV. Masy cząsteczkowe analizowanych białek określano porównując migrację prążków z równoległe

rozdzielanych wzorcem masy PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, nr kat. 26614)

Tabela 6 Skład żeli stosowanych do elektroforezy SDS-PAGE

SKŁADNIK	ŻEL ROZDZIELAJĄCY						ŻEL ZAGĘSZCZAJĄCY	
	ŻEL 10%		ŻEL 12%		ŻEL 15%		uniwersalny	
	standard	stain free	standard	stain free	standard	stain free		
TCE 2%	-	1,5 ml	-	1,5 ml	-	1,5 ml	-	
H ₂ O	2,4 ml	0,9 ml	2 ml	0,5 ml	1,5 ml	-	1,46 ml	
Akrylamid [1:39] 30%	2 ml	2 ml	2,4 ml	2,4 ml	3 ml	3 ml	0,34 ml	
1,88M Tris-HCl pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	0,625M Tris-HCl pH6,8	0,25 ml
SDS10%	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	20 µl	
APS10%	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	20 µl	
TEMED	2,4 µl	2,4 µl	2,4 µl	2,4 µl	2,4 µl	2,4 µl	2 µl	

Bufor Tris-Glicyna 1x

Tris-Glicyna 10x	100 ml
SDS 10%	10 ml
H ₂ O	do 1 l

Tris-Glicyna 10x

Tris	250 mM
Glicyna	1,92 M

Obciążnik 4xβ

Tris 0,625M pH 6,8	3,2 ml
SDS 10%	8 ml
Glicerol 70%	5,71 ml
β-mercaptoetanol 14M	0,28 ml
H ₂ O	6,81 ml
Bromophenol Blue	szczypta

CBB (Coomassie Brilliant Blue)

CBB R250	0,5 g
CBB G250	0,26 g
Etanol 96%	212 ml
Metanol	25 ml
Kwas octowy	50 ml
H ₂ O	213 ml

Odbarwiacz

Metanol 100%	175 ml
Kwas octowy	35 ml
H ₂ O	290 ml

3.6.2 Rekombinowane białka HpDnaA

W ramach prezentowanej pracy zostały skonstruowane plazmidy do syntezy różnych wariantów białka *H. pylori* DnaA z metką Strep - tag na C-końcu DnaA (Schmidt and Skerra 2007). Stworzono konstrukty syntezujące białka pełnej długości, poszczególnych domen i ich kombinacji oraz 3 warianty białka posiadające zamiany aminokwasów w miejscach istotnych dla oddziaływania z ATP. W tabeli nr 7 znajduje się charakterystyka przygotowanych konstruktów.

Tabela 7 Charakterystyka stworzonych wariantów rekombinowanego białka *H. pylori* z metką Strep-Tag

BIAŁKO	OPIS
HpDnaAstrep	białko DnaA pełnej długości (459 aminokwasów)
HpDnaAIII-IVstrep	białko DnaA pozbawione domen I-II; (109-459 aminokwasów)
HpDnaAI-IIstrep	domeny I i II DnaA (1-112 aminokwasów)
HpDnaAIVstrep	domena IV DnaA (344-459 aminokwasów)
HpDnaAI-II-IVstrep	białko DnaA pozbawione III domeny; (1-112 oraz 344-459 aminokwasów)
HpDnaAK178Istrep *	Białko DnaA z wprowadzoną mutacją w pozycji 156 (Lys156Ile); u <i>E. coli</i> analogiczna mutacja Lys178Ile powoduje redukcję zdolności wiązania nukleotydów (Mizushima et al. 1998);
HpDnaAR285Astrep *	Białko DnaA z wprowadzoną mutacją w pozycji 261 (Arg261Ala); u <i>E. coli</i> analogiczna mutacja Arg285Ala powoduje redukcję zdolności do oligomeryzacji (Kawakami et al. 2005)
HpDnaAR334Astrep *	Białko DnaA z wprowadzoną mutacją w pozycji 310 (Arg310Ala); u <i>E. coli</i> analogiczna mutacja Arg334Ala powoduje niezdolność do hydrolizy ATP (Nishida et al. 2002)

*w nazwach plazmidów i białek z nich syntezowanych pozostawiono numerację aminokwasów odpowiadającą pozycjom u *E. coli*, w celu późniejszej łatwiejszej dyskusji na tle wyników dostępnych w literaturze.

Wszystkie skonstruowane w ramach niniejszej pracy wersje genu *dnaA* zostały wklonowane do wektora pET21b(+)-Strep3 (tabela nr 5). Plazmid ten pozwala na syntezę rekombinowanych białek z metką Strep-Tag – krótkim, 8-aminokwasowym, inertnym peptydem połączonym z białkiem dwoma aminokwasami: **SAWSHPQFEK** (**łącznik** oraz **metka**) (Schmidt and Skerra 2007). Oczyszczanie białek polega na wiązaniu się rekombinowanych białek do złoża Strep-Tactin, a białka odmywane są z kolumny za pomocą destiobiotyny.

3.6.2.1 Konstrukcja wektorów:

Tabela nr 8 zawiera informacje dotyczące sposobu skonstruowania wektorów stosowanych do syntezy różnych wariantów białka DnaA.

Tabela 8 Opis strategii klonowania wariantów genu *dnaA*

NAZWA DOCELOWEGO KONSTRUKTU (tabela nr 5)	STOSOWANE STARTERY (tabela nr 4)	MATRYCA PCR	ENZYMY RESTRYKCYJNE STOSOWANE DO KLONOWANIA
Poniższe klonowania przeprowadzono standardowo: fragmenty PCR oraz wektor pET21b(+)<i>Strep3</i> trawiono zaznaczonymi enzymami restrykcyjnymi i oczyszczano z żelu agarozowego. Oczyszczony wektor defosforylowano, następnie ligowano z fragmentami DNA. Szczegółowe opisy metod poszczególnych etapów znajdują się w rozdziałach 3.5.4-3.5.9			
pET21HpDnaAstrep	HP1529 <u>BamHI</u> Hp1529rev_dstop_ <u>XhoI</u>	genomowy DNA <i>H. pylori</i> 26695	BamHI/XhoI
pET21HpDnaAIII-IVstrep	HP1529_III_IV_ <u>BamHI</u> Hp1529rev_dstop_ <u>XhoI</u>	genomowy DNA <i>H. pylori</i> 26695	BamHI/XhoI
pET21HpDnaAI-IIstrep	HP1529 <u>BamHI</u> HP1529I-II_ <u>XhoI</u>	genomowy DNA <i>H. pylori</i> 26695	BamHI/XhoI
pET21HpDnaAIVstrep	HP1529_IV_ <u>BamHI</u> Hp1529rev_dstop_ <u>XhoI</u>	genomowy DNA <i>H. pylori</i> 26695	BamHI/XhoI
pET21HpDnaAI-II-IVstrep	Domena I-II wycięta z wektora pAZP23 i wklonowana do konstruktu pET21HpDnaAIVstrep.		BamHI
pET21HpDnaAK178Istrep	Gen wycięty z wektora pILL2150HpDnaAK178Istrep i wklonowany do wektora pET21b(+) <i>Strep3</i>		BamHI/XhoI
pET21HpDnaAR285Astrep	Gen wycięty z wektora pILL2150HpDnaAR285Astrep i wklonowany do wektora pET21b(+) <i>Strep3</i>		BamHI/XhoI
pET21HpDnaAR334Astrep	Gen wycięty z wektora pILL2150HpDnaAR334Astrep i wklonowany do wektora pET21b(+) <i>Strep3</i>		BamHI/XhoI
pILL2150HpDnaAsterp	Gen wycięty z wektora pET21HpDnaAstrep i wklonowany do wektora pILL2150strep		BamHI/XhoI
Poniższe klonowania przeprowadzono metodą Gibsona z zastosowaniem zestawu OverLap Assembly (A&A Biotechnology), zgodnie z zaleceniami producenta. Każda reakcja polegała na ligacji dwóch produktów PCR (pary starterów zaznaczone klamrą) do wektora pILL2150HpDnaAstrep. Wszystkie elementy trawiono podanymi enzymami restrykcyjnymi oraz oczyszczano z żelu agarozowego (rozdziały 3.5.4-3.5.9)			
pILL2150HpDnaAK178Istrep	DnaA_ <u>SphI</u> _fwGA } K178I_rev } K178I_fw } DnaA_ <u>PvuI</u> _revGA }	pILL2150HpDnaAstrep	SphI/PvuI
pILL2150HpDnaAR285Astrep	DnaA_ <u>SphI</u> _fwGA } R285A_rev } R285A_fw } dnaA_ <u>XhoI</u> _revGA }	pILL2150HpDnaAstrep	SphI/XhoI
pILL2150HpDnaAR334Astrep	DnaA_ <u>PvuI</u> _fwGA } R334A_rev } R334A_fw } dnaA_ <u>XhoI</u> _revGA }	pILL2150HpDnaAstrep	PvuI/XhoI

Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki *E. coli* DH5 α (rozdział 3.5.9), dokonywano selekcji transformantów na podłożach z antybiotykiem. Poprawność klonowania sprawdzano izolując plazmidy, wykonując odpowiednie trawienia restrykcyjne. Poprawność sekwencji wklonowanych produktów PCR weryfikowano sekwencjonowaniem Sangera (Genomed). W tym celu na matrycy plazmidowego DNA wykonywano PCR z zastosowaniem starterów T7ter i T7prom dla wektorów serii pET21b(+)Strep3 oraz Fw_pILL2150 i pILL50_57rev dla wektorów serii pILL2150strep (tabela nr 4) i sekwencjonowano produkty reakcji (rozdział 3.5.4).

3.6.2.2 Izolacja białek

Wszystkie warianty białka DnaA *H. pylori* izolowano z komórek *E. coli* BL21 zawierających odpowiednie plazmidy z serii pET21b(+)Strep3 (tabela nr 5). 1l pożywki LB z ampicyliną zaszczipiano hodowlą nocną w stosunku 1:50 i inkubowano w temp. 37°C z wytrząsaniem 180 RPM. Gdy hodowla osiągnęła gęstość optyczną OD₆₀₀~1 komórki indukowano roztworem IPTG do stężenia końcowego 0,1 mM, a następnie hodowano w temp. 10°C przez noc. Po zakończeniu hodowli pożywkę zwirowywano (10 min, 6000 x g, 4°C), supernatant odrzucano, a osad zamrażano w temp. -20°C i przechowywano zamrożony do czasu izolacji. Osad rozmrażano na lodzie i zawieszano w 10 ml odpowiedniego buforu W (tabela nr 9) z dodatkiem inhibitorów proteaz [cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail]. Zawieszone komórki poddawano dezintegracji za pomocą ultradźwięków, następnie zwirowywano (30 min, 27 000 xg, 4°C). Otrzymany supernatant rozcieńczano dwukrotnie buforem W. Roztwór białek наносono na kolumnę z uprzednio odpowiednio przygotowanymi 200 μ l złoża Strep-Tactin® Superflow® high capacity (IBA, nr kat.: 2 - 1208 - 010). Po przepłynięciu przez kolumnę całej objętości supernatantu i związaniu białek do złoża chromatograficznego, niespecyficznie związane białka odpłukiwano nakładając kolejne porcje (600 μ l) buforu W, do momentu uzyskania negatywnego wyniku próby Bradford. Białka z metką Strep-tag eluowano kolejnymi porcjami odpowiedniego buforu E (tabela nr 10), do uzyskania negatywnego wyniku testu Bradford (E1 - 100 μ l, E2 do końca - 200 μ l). Ze wszystkich frakcji przygotowywano próbki na żel SDS-PAGE i sprawdzano elektroforetycznie wydajność izolacji oraz czystość poszczególnych frakcji białkowych.

Etapy procedury oczyszczania były jednakowe dla wszystkich wariantów białek, różnice dotyczyły składu buforów stosowanych przy izolacji. Składy buforów W (do zawieszania

i płukania) podane są w tabeli nr 9, bufor E (do elucji) składały się z odpowiedniego buforu W wzbogaconego o 5mM destiobiotynę (tabela nr 10).

Tabela 9 Skład buforów W do izolacji różnych wariantów białek HpDnaAstrep

SKŁADNIK BUFORU W	WARIANT BIAŁKA DnaA						
	HpDnaAstrep	HpDnaAIII-IVstrep	HpDnaAI-II-IVstrep	HpDnaAI-IIstrep	HpDnaAIVstrep	HpDnaAR285Astrep	HpDnaAR334Astrep
NaCl [mM]	300						
Tris-HCl [mM]	100						
DTT [mM]	1						
Glutaminian potasu [mM]	200	400	150	200	150	200	200
pH	8,4	8,0	8,4	8,0	8,2	8,3	8,3

Tabela 10 Skład buforów E do elucji wariantów białek HpDnaAstrep

SKŁADNIK BUFORU E	WARIANT BIAŁKA DnaA						
	HpDnaAstrep	HpDnaAIII-IVstrep	HpDnaAI-II-IVstrep	HpDnaAI-IIstrep	HpDnaAIVstrep	HpDnaAR285Astrep	HpDnaAR334Astrep
NaCl [mM]	300						
Tris-HCl [mM]	100						
DTT [mM]	1						
Destiobiotyna [mM]	5						
Glutaminian potasu [mM]	200	400	150	200	150	200	200
pH	8,4	8,0	8,4	8,0	8,2	8,3	8,3

3.6.3 Immunoblotting (Western blotting)

Technikę immunoblottingu stosowano do swoistej detekcji białek. W tym celu białka po rozdziale w żelu poliakrylamidowym przenoszono na membranę nitrocelulozową (Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit) za pomocą Trans-Blot® Turbo™ Transfer System zgodnie z zaleceniami producenta. Membrany z naniesionymi białkami blokowano przez 15 min w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w PBST, następnie przemywano raz buforem PBST przez 5 min. Membranę inkubowano przez 1 h w 10 ml PBST z dodatkiem 0,4 µl monoklonalnego przeciwciała anty Strep-tag® II skoniugowanego z peroksydazą chrzanową (StrepMAB-Classic, IBA, nr. kat. 2-1509-001). Po inkubacji z przeciwciałem membranę odpłukiwano dwukrotnie buforem PBST oraz trzykrotnie PBS, każde płukanie po 5 min. Kompleksy białko-przeciwciała wizualizowano na jeden z dwóch sposobów:

Reakcja kolorymetryczna: membranę przenoszono do buforu do wywoływania kolorymetrycznego (bufory A i B mieszano tuż przed wywoływaniem reakcji). Inkubację prowadzono do pojawienia się barwnych prążków na membranie.

Reakcja chemiluminescencyjna: wywoływanie membrany przeprowadzono w ciemni. Membranę inkubowano 1 min w roztworze do wywoływania chemiluminescencyjnego (bufory C i D mieszano tuż przed rozpoczęciem reakcji). Osuszoną membranę przenoszono do kasety do wywoływania. Na membranę zabezpieczoną folią nakładano kliszę rentgenowską i naświetlano ją od kilku sekund do kilku minut, w zależności od intensywności sygnału. Naświetloną kliszę inkubowano w roztworze wywoływacza, płukano w wodzie destylowanej i utrwalano w roztworze utrwalacza (Carestream Readymatic X-Ray solution Set, Carestream Health, nr kat. 1028869, przygotowane zgodnie z zaleceniami producenta).

PBS pH 7,4

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O	do 1 l

PBST

PBS	
Tween 20	0,1%
TBST	
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%

Wywołanie kolorymetryczne najskuteczniej wychodzi przy zastosowaniu TBST do przygotowania buforu B

Wywoływanie kolorymetryczne**Bufor A**

4-chloro-1-naftol	6 mg
Metanol 100%	2 ml

Bufor B

TBST	8 ml
H ₂ O ₂	6 μl

Wywoływanie chemiluminescencyjne**Bufor C**

1M Tris-HCl pH 8,5	1 ml
Luminol [250mM w DMSO]	100 μl
Kwas kumarynowy [90mM w DMSO]	44 μl
H ₂ O	do 10 ml

Bufor D

1M Tris-HCl pH 8,5	1 ml
30% H ₂ O ₂	6 μl
H ₂ O	do 10 ml

3.7 Techniki analizy oddziaływań białka DnaA z DNA

3.7.1 Test rozplatania helisy DNA (unwinding)

Procedura eksperymentalna opiera się na protokole opublikowanym w (Donczew et al. 2012). Białko DnaA inkubowano w roztworze reakcyjnym z plazmidem *pori1ori2* zawierającym *oriC Helicobacter pylori* (tabela nr 5) przez 10 min w temp. 30°C. Następnie dodawano 0,3 U nukleazy P1 (Sigma Aldrich, nr kat. N8630-1VL), trawiono jednoniciowy DNA przez 5 min w temp. 30°C. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie rozcieńczonego wodą buforu R7SI (85 μl H₂O do 100 μl R7SI) z zestawu Gel Out A&A Biotechnology i oczyszczano DNA zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. DNA eluowano 40 μl H₂O, a następnie zagęszczano w suszarce próżniowej typu na SpeedVac. DNA zawieszano w 10 μl mieszaniny do trawienia: 0,3 μl enzymu BglII, 1 μl buforu 10x Fast Digest i 8,3 μl H₂O. Następnie trawiono 30 min w temp. 37°C. Strawione

fragmenty DNA poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym bez barwnika DNA. Po rozdziale żel barwiono wodnym roztworem bromku etydyny (0,5 µg/ml) przez 15 min i płukano w wodzie przez 5 min. DNA wizualizowano światłem UV i dokumentowano systemem Gel Doc XR+ System (Biorad)

Mieszanina reakcyjna

DNA	200 ng
Białko (roztwór roboczy)	2 µl
ATP lub ADP [75 mM]	1 µl
BSA [10 mg/ml]	0,15 µl
Bufor unwindingowy 3x	5 µl
H ₂ O	do 15 µl

Bufor 3x unwindigowy:

HEPES KOH pH 7,6	75 mM
CaCl ₂	3 mM
EDTA	0,6 mM
Glicerol	36%

3.7.2 Opóźniona migracja kompleksów białko-DNA w żelu poliakrylamidowym

Fragmenty DNA znakowane fluorescencyjnie FAM na 5' końcu uzyskiwano w reakcji PCR stosując startery pOCrev oraz FAM-pOCfw (FAM-oriC1 - region *oriC1*, 291pz) lub przez hybrydyzację oligonukleotydów (fragment FAM-boksy2+3, 52 pz; równomolowo hybrydyzowano oligonukleotydy FAM-luego, Lbox2+3upper z 10% nadmiarem Lbox2+3lower (tabela nr 4)). Preparaty rekombinowanych białek DnaA oczyszczano wg odpowiednich procedur (rozdział nr 3.6.2.1)

Białka do analizy przygotowywano dwuetapowo: rozcieńczano w buforze 1x Marians z 4 mM DTT do stężeń 7,5x wyższych niż docelowe stężenia w reakcji, a następnie z tak przygotowanych roztworów dodawano po 2 µl do mieszaniny reakcyjnej. Inkubowano 20 min w temp. 30°C. Po inkubacji próbówki przekładane były na lód i do reakcji dodawano 3µ 40% sacharozy (końcowo 6,7%). Na 5% żel poliakrylamidowy nakładano po 18 µl próbek i rozciągano w temp. 10°C przy napięciu 5-10 V/cm w buforze 0,25x TBE. Po skończonej elektroforezie sygnały analizowano na skanerze Typhoon FLA 9500, uzyskane skany opracowywano wykorzystując oprogramowanie ImageQuant.

Mieszanina reakcyjna (1 reakcja):

DNA	20 ng
BSA [10 mg/ml]	0,15 μ l
ATP [75 mM]	1 μ l
Bufor 10x Marian's	1,5 μ l
Białko (roztwór roboczy)	2 μ l
H ₂ O	do 15 μ l

Żel poliakrylamidowy EMSA

Poliakrylamid 35% (1:30)*	6,67 ml
TBE 10x (rozdział nr 3.5.7)	1,25 ml
H ₂ O	42,08 ml
APS [10%]	275 μ l
TEMED	17,7 μ l
<i>*stosunek akrylamidu do bisakrylamidu</i>	

Bufor 10xMarian's

HEPES KOH pH 8,0	200 mM
Octan magnezu	50 mM
EDTA	10 mM
Triton X-100	2%

3.7.3 Mikroskopia elektronowa

Obrazowanie kompleksów nukleoproteinowych przeprowadzono w Max Planck Institute for Molecular Genetics w Berlinie, w Laboratorium Mikroskopii i Mikroskopii Krioelektronowej dr Thorstena Mielke. Zdjęcia kompleksów wykonano przy pomocy mikroskopu 100 kV Philips CM100. Protokół eksperymentalny opracowany na podstawie (Evrin et al. 2009)

3.7.3.1 Protokół przygotowania próbek do obrazowania:

- Mieszaninę reakcyjną składano wg przepisu:

DNA (plazmid)[30 ng/ μ l]	2 μ l
Białko [30 ng/ μ l]	2 μ l
ATP lub ADP [75 mM]	1,33 μ l
Bufor unwindingowy 3x [rozdział 3.7.1]	6,67 μ l
H ₂ O	8 μ l

- Roztwór białko-DNA inkubowano w temp. 30°C, przez 10 min
- Cząsteczki w roztworze sieciowano przez dodanie 2,2 μ l 2% glutaraldehydu

- Inkubowano w temp. 30°C, przez 20 min
- Sieciowanie hamowano przez dodanie 2,46 µl 0,5 M glicylo-glicyny
- Inkubowano do uzyskania jasnożółtej barwy
- Plazmid trawiono w buforze: 6 µl 1M KCl, 6 µl MgCl₂, 22,34 µl H₂O, 1 µl ScaI
- Inkubowano w temp. 37°C, przez 40 min.
- Oczyszczano na złożu Sephacryl S-200 (75% w 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂):
 - na kolumnę ze spiekim nakładano 500 µl złoża; wirowano 5', 800xg; supernatant odrzucano; kolumnkę wkładano do świeżej probówki; nakładano próbkę na szczyt złoża; wirowano 5 min, 800xg
- oczyszczoną próbkę wiązano do świeżej powierzchni miki:
 - na fragmencie parafilmu rzędami nakrapiano:
 - w dwóch powtórzeniach próbki (po 30 µl),
 - 100 µl 2% octanu uranylu,
 - trzykrotnie po 100 µl H₂O;
 - na każdej kropli fragment miki inkubowany był przez 2 min; pomiędzy inkubacjami fragmenty osuszano dotykając krawędzią miki o bibułę Whatman
- Na przygotowaną mikę napyłano film platynowy oraz film węglowy; stosowano napyłarkę Edwards Coating System E306A (Edwards Germany GmbH)
- Po naniesieniu filmów na powierzchnię miki, nakrapiano wokół fragmentów minerału wodę i pozostawiono w ciepłym miejscu na minimum 2 h.
- Po czasie inkubacji ściągano film węglowy z miki i наносzono na siatkę miedziową (Mesh 400) uprzednio zanurzoną w roztworze 2% CPC¹ w toluenie.
- Gotową siatkę umieszczano w sondzie mikroskopu i przystępowano do obrazowania utrwalonych kompleksów nukleoproteinowych.
- Kompleksy analizowano przeprowadzając pomiary długości plazmidów, uwzględniając odległości pomiędzy widocznymi kompleksami. Pomiarów dokonywano za pomocą programu ImageJ

¹ CPC jest tworzywem sztucznym używanym w przemyśle elektronicznym do izolowania zespołów płytek drukowanych. W technice adsorpcji miki siatki są zanurzone w 0,2% CPC w toluenie. Po odparowaniu toluenu siatki pozostają trochę lepkie, co ułatwia późniejsze przymocowanie (utrwalenie) filmu węglowego na siatkach.

3.7.4 Powierzchniowy rezonans plazmonowy

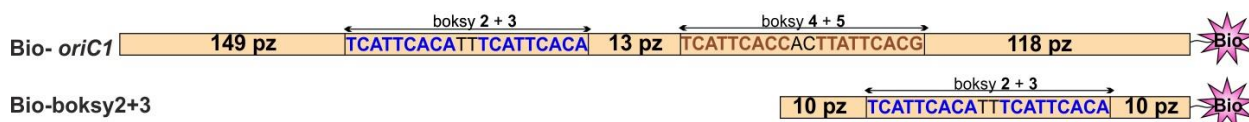
Analizy oddziaływania białko - DNA w czasie rzeczywistym prowadzone były techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów za pomocą Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences), a analiza wyników została przeprowadzona w programach Biacore T200 Evaluation Software oraz Excel 2017. Protokół eksperymentalny opracowany na podstawie (Weigel et al. 1997).

3.7.4.1 Immobilizacja fragmentów DNA

Do analiz używano sensora Sensor Chip SA (GE HealthCare, nr kat: BR100032). Wszystkie etapy eksperymentów prowadzono przy przepływie 15 μ l/min. Do streptawidynowej powierzchni sensora immobilizowano dwuniciowe fragmenty DNA biotynylowane na jednym z 5' końców (tabela nr 11, rysunek nr 11).

Tabela 11 Opis przygotowania biotynylowanych fragmentów DNA stosowanych w SPR

NAZWA FRAGMENTU	SPOSÓB OTRZYMANIA	OLIGONUKLEOTYDY	WIELKOŚĆ [pz]	OPIS
Bio-Hp0180	PCR, produkt oczyszczany z żelu agarozowego	Bio_HP0180_fw HP0180_rev	191	Fragment DNA nie wiązany przez DnaA; kontrola negatywna do <i>oriC1</i>
Bio- <i>oriC1</i>		Bio-pOCrv pOC_fw	320	Fragment DNA zawierający sekwencję <i>oriC1</i> związaną przez DnaA
Bio-bez_boksów	Stapianie oligonukleotydów w stosunku równomolowym	non-box_lower non-box_upper	40	Fragment DNA niewiązany przez DnaA, kontrola negatywna do boksów DnaA 2 i 3
Bio-boksy2+3		RHpbox2 FHpbox2	40	Fragment zawierający sekwencję boksów DnaA 2 i 3, wiązany przez DnaA



Rysunek 11 Schemat budowy biotynylowanych fragmentów DNA zawierających boksy DnaA opisanych w tabeli nr 11. Na rysunku przedstawiono liczbę par zasad okalających boksy DnaA w poszczególnych fragmentach DNA.

Wiązanie DNA przebiegało zgodnie z procedurą polecaną przez producenta. Powierzchnię sensora aktywowano poprzez przepłukanie każdego z 4 kanałów Buforem Aktywującym. Po aktywowaniu, do powierzchni sensora wiązano fragmenty DNA rozcieńczane do stężenia około 0,4 ng/ μ l w Buforze Wiązującym. Wiązanie prowadzono do momentu osiągnięcia ustalonego poziomu około 100RU. Niezwiązane DNA zalegające w instrumencie odmywano przez płukanie kanałów Buforem Płuczającym.

3.7.4.2 Badanie oddziaływań białko - DNA

Białka rozcieńczano w buforze KAC zawierającym kompetytor Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC) (Sigma Aldrich, nr kat: P4929) w stężeniu 12,5 ng/ μ l oraz 3 mM ATP lub 3 mM ADP. Preparaty wiązano do DNA przez 180 sek., faza dysocjacji trwała 180 sek. przy stałym przepływie buforu KAC (15 μ l/min). Po każdym cyklu asocjacja-dysocjacja kanały przepłukiwano przez 30 sek. roztworem 0,05% SDS w celu regeneracji powierzchni, następnie równoważono buforem KAC do ustabilizowania linii bazowej. Pomiędzy zestawami analiz sensor był przechowywany w maszynie na ustawieniach „stand by” przy podłączonym Buforze Przechowującym.

3.7.4.3 Analiza wyników

Analizę wyników przeprowadzano w programie Biacore T200 Evaluation Software, w którym dokonano odjęcia wartości kanałów kontrolnych, w których zachodzi wiązanie niespecyficzne od analizowanych - w ten sposób otrzymano sensogramy dla oddziaływań specyficznych. Ponadto w programie Biacore T200 Evaluation Software sprowadzono wszystkie sensogramy do jednej linii bazowej. Tak opracowane krzywe eksportowano do formatu odczytywanego przez program Exel 2017, w którym tworzą zestaw sensogramów.

Bufor Wiązający

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	500 mM
EDTA	1 mM

Bufor Odpłukujący

NaOH	50 mM
NaCl	1 M
Izopropanol	50%

Bufor Aktywujący

NaOH	50 mM
NaCl	1 M

KAC		Bufor Przechowujący	
Hepes - KOH pH 7,6	25 mM	Tris - HCl pH 7,6	10 mM
Octan potasu	100 mM	NaCl	100 mM
Octan magnezu	1 mM	EDTA	1 mM
Tween 20	0,05%	Regeneracja sensora	
		SDS	0,05%

3.8 Analiza utrwalonych kompleksów białkowych

Oddziaływania międzybiałkowe badane były w buforze KAC (rozdział 3.7.4.3), do którego przeprowadzano badane białka wykorzystując złożę Sephadex G-25 Medium na mini kolumnach wirówkowych. Kompleksy białkowe utrwalane były czynnikiem sieciującym - 2 mM glutaraldehydem. Do reakcji sieciowania używano 500 ng białka. Po reakcji dodawano 9 μ l obciążnika 4x β inkubowano w temp. 95°C przez 5 min (rozdział 3.6.1), następnie 210 ng białka rozdzielano w 12% żelu SDS-PAGE. Detekcję białek przeprowadzano za pomocą analizy western blot wykorzystując przeciwciało anty Strep-tag® II StrepMAB-Classic, przy czym reakcję immunoenzymatyczną wywoływano chemiluminescencyjnie (rozdział 3.6.3).

SKŁADNIK MIESZANINY REAKCYJNEJ	KONTROLA	SIECIOWANIE	WARUNKI INKUBACJI
Białko [250 ng/ μ l]	2 μ l	2 μ l	temp. 30°C, 10 min
Bufor KAC	22 μ l	18 μ l	
Glutaraldehyd [12 mM]	–	4 μ l	temp. 30°C, 10 min
Glicylo-glicyna [0,5 M]	2,8 μ l	2,8 μ l	temp. 30°C, 5 min

4. WYNIKI

W pracy przedstawiono wyniki przeprowadzonych analiz *in vitro* oraz *in vivo* zmierzających do scharakteryzowania domen I i III białka DnaA inicjującego proces replikacji chromosomu *Helicobacter pylori*.

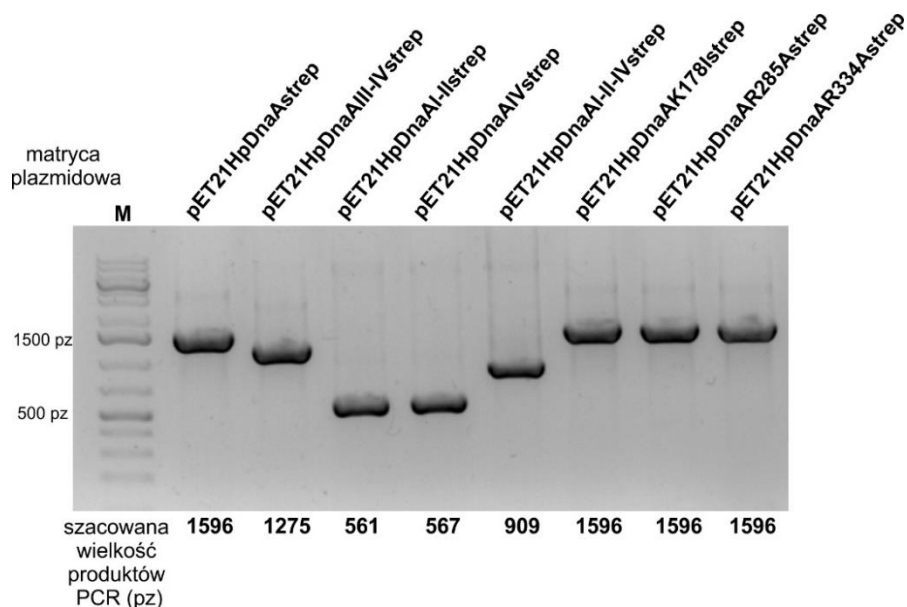
4.1 Konstrukcja wektorów

4.1.1 Konstrukcja wektorów kodujących warianty rekombinowanego białka DnaA wykorzystywane w analizach *in vitro*

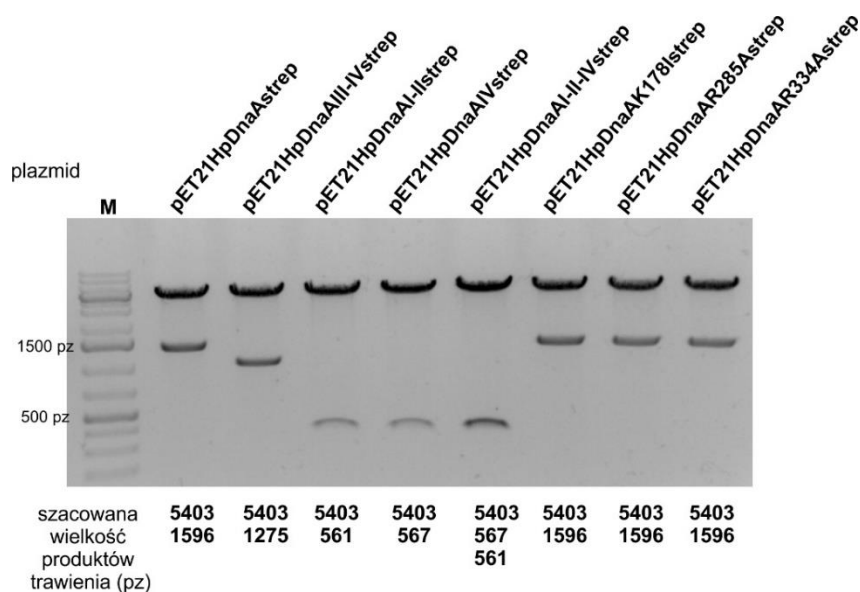
Przygotowanie serii wektorów ekspresyjnych, pochodnych wektora pET21b(+)-Strep3 (rozdział 3.6.2.1) miało na celu uzyskanie konstruktów do indukowanej syntezy i izolacji wariantów białka DnaA o różnym składzie domenowym i zmutowanych w obrębie domeny III (rozdział 3.6.2.2).

4.1.1.1 Konstrukty wektorów do syntezy wariantów rekombinowanego białka DnaA o różnym składzie domen

Na matrycy chromosomu *Helicobacter pylori* 26695 w reakcji PCR powielono fragmenty genu *dnaA* zgodnie z tabelą nr 8. W reakcji PCR uzyskano liniowe fragmenty DNA, które wraz wektorem pET21b(+)-Strep3 trawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI oraz XhoI. Wyjątek stanowiły konstrukty pAZP23 oraz pET21HpDnaAIVstrep trawione BamHI. Produkty trawienia rozdzielono w żelu agarozowym, a następnie oczyszczono. Fragmenty genu *dnaA* wklonowano do zdefosforylowanego wektora pET21b(+)-Strep3; fragment kodujący domeny I-II DnaA wycięty z pAZP23 wklonowano do pET21HpDnaAIVstrep (rozdziały 3.5.5-3.5.9). W celu sprawdzenia, które kolonie posiadają poprawny konstrukt, przeprowadzono reakcję PCR na matrycy wyizolowanych plazmidów wykorzystując startery T7prom i T7term (rysunek nr 12) oraz reakcję trawienia wyizolowanych plazmidów enzymami restrykcyjnymi BamHI-XhoI (rysunek nr 13). Analiza wyników reakcji PCR oraz analiza restrykcyjna potwierdziły poprawność skonstruowanych plazmidów. W celu dalszej weryfikacji poprawności wklonowanych sekwencji DNA przeprowadzono sekwencjonowanie uzyskanych produktów PCR, które potwierdziło bezbłądność wklonowanych sekwencji DNA (dane niepokazane).



Rysunek 12 Wyniki reakcji PCR przeprowadzonej z zastosowaniem starterów T7prom i T7ter na uzyskanych w pracy doktorskiej wektorach serii pET21b(+)-Strep3 opisanych nad zdjęciem, służących do indukowanej syntezy zmodyfikowanych wersji białka DnaA *H. pylori* w komórkach *E. coli*. Spodziewana wielkość produktów PCR podana pod zdjęciem, M - wzorec mas cząsteczkowych GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



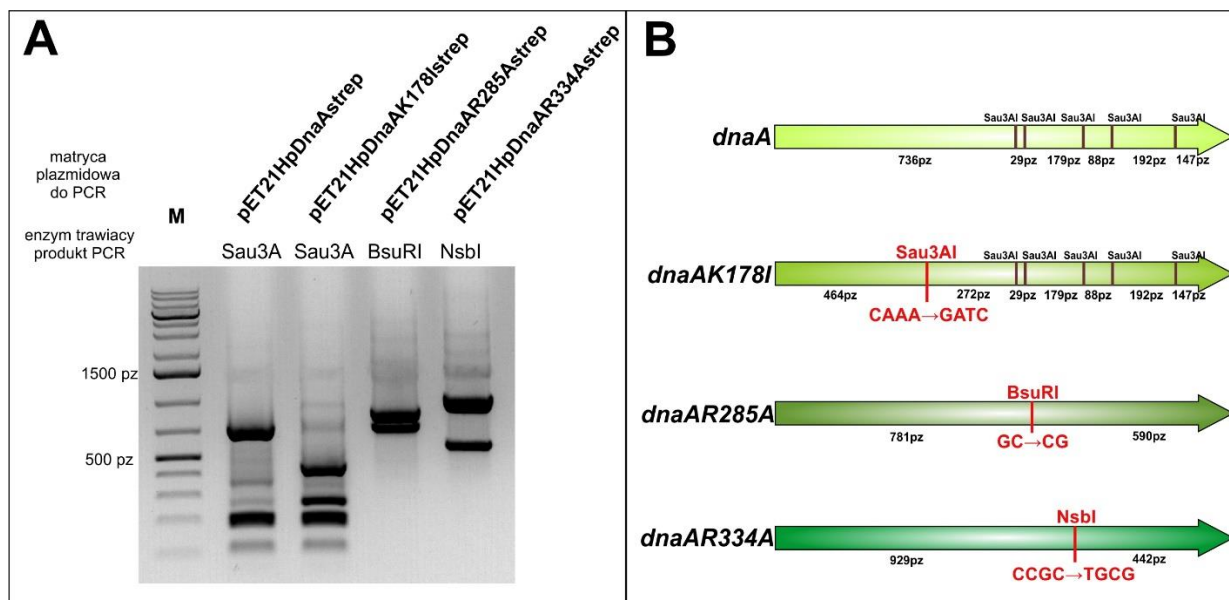
Rysunek 13 Wyniki kontrolnego trawienia restrykcyjnego enzymami BamHI i XhoI wektorów serii pET21b(+)-Strep3 uzyskanych w pracy doktorskiej. Spodziewaną wielkość produktów podano pod zdjęciem. W przypadku pET21HpDnaAI-II-IVstrep otrzymano 3 prążki, z czego dwa o bardzo podobnej wielkości (567 i 651 pz), migrujące jako jeden widoczny prążek (załączniki nr 2-6). M - wzorec mas cząsteczkowych GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

W wyniku procedury klonowania uzyskano plazmidy o poprawnej sekwencji regionu kodującego każdy zaplanowany wariant białka DnaA: pET21HpDnaAstrep, pET21HpDnaAIII-IVstrep, pET21HpDnaAI-IIstrep, pET21HpDnaAIVstrep, pET21HpDnaAI-II-IVstrep (tabela nr 5).

Plazmidami transformowano kompetentne komórki *E. coli* BL21, w których syntezowano i z uzyskanej biomasy izolowano rekombinowane białka (rozdział nr 3.6.2.2).

4.1.1.2 Konstrukty wektorów do syntezy rekombinowanych wariantów białka DnaA zmutowanych w obrębie domeny III

Plazmidy z serii pET21b(+)*Strep3*: pET21HpDnaAK178I*strep*, pET21HpDnaAR285A*strep*, pET21HpDnaAR334A*strep* wykorzystane do indukowanej syntezy białek, odpowiednio HpDnaAK178I*strep*, HpDnaAR285A*strep* oraz HpDnaAR334A*strep* skonstruowano przez wycięcie enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI fragmentów DNA, kodujących białka z wprowadzonymi mutacjami punktowymi w domenie III, z plazmidów z serii pILL2150*strep* (odpowiednio pILL2150DnaAK178I*strep*_3aa, pILL2150DnaAR285A*strep*_3aa oraz pILL2150DnaAR334A*strep*_3aa) (rozdział 4.1.2). Następnie wklonowano te fragmenty do wektora pET21b(+)*Strep3* trawionego tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. Poprawność przygotowanych konstruktów sprawdzono przeprowadzając reakcję PCR na matrycy wyizolowanych plazmidów z użyciem starterów T7prom i T7term oraz kontrolnym strawieniu produktów PCR (rysunek nr 14; szczegóły wprowadzenia miejsc restrykcyjnych w genie *dnaA* opisano w rozdziale nr 3.6.2.1)



Rysunek 14 Analiza poprawności konstrukcji plazmidów serii pET21b(+)*Strep3*. **A:** Wyniki trawienia restrykcyjnego produktów PCR powielonych z użyciem starterów T7prom i T7ter na matrycy skonstruowanych wektorów plazmidowych. M - wzorec mas cząsteczkowych GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. **B:** Schemat przedstawiający miejsca restrykcyjne w genie *dnaA* i jego mutantach. Na czerwono zaznaczono mutacje sekwencji DNA oraz wprowadzone miejsca restrykcyjne. Ponadto podano szacowane wielkości fragmentów otrzymanych w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi Sau3AI, BsuRI, NsbI.

Analiza produktów trawienia uzyskanych amplikonów potwierdziła uzyskanie poprawnych konstruktorów pET21HpDnaAK178Istrep, pET21HpDnaAR285Astrep oraz pET21HpDnaAR334Astrep.

4.1.2 Konstrukty wektorów do syntezy rekombinowanych wariantów białka DnaA zmutowanymi w obrębie domeny III stosowanych do analiz *in vivo*.

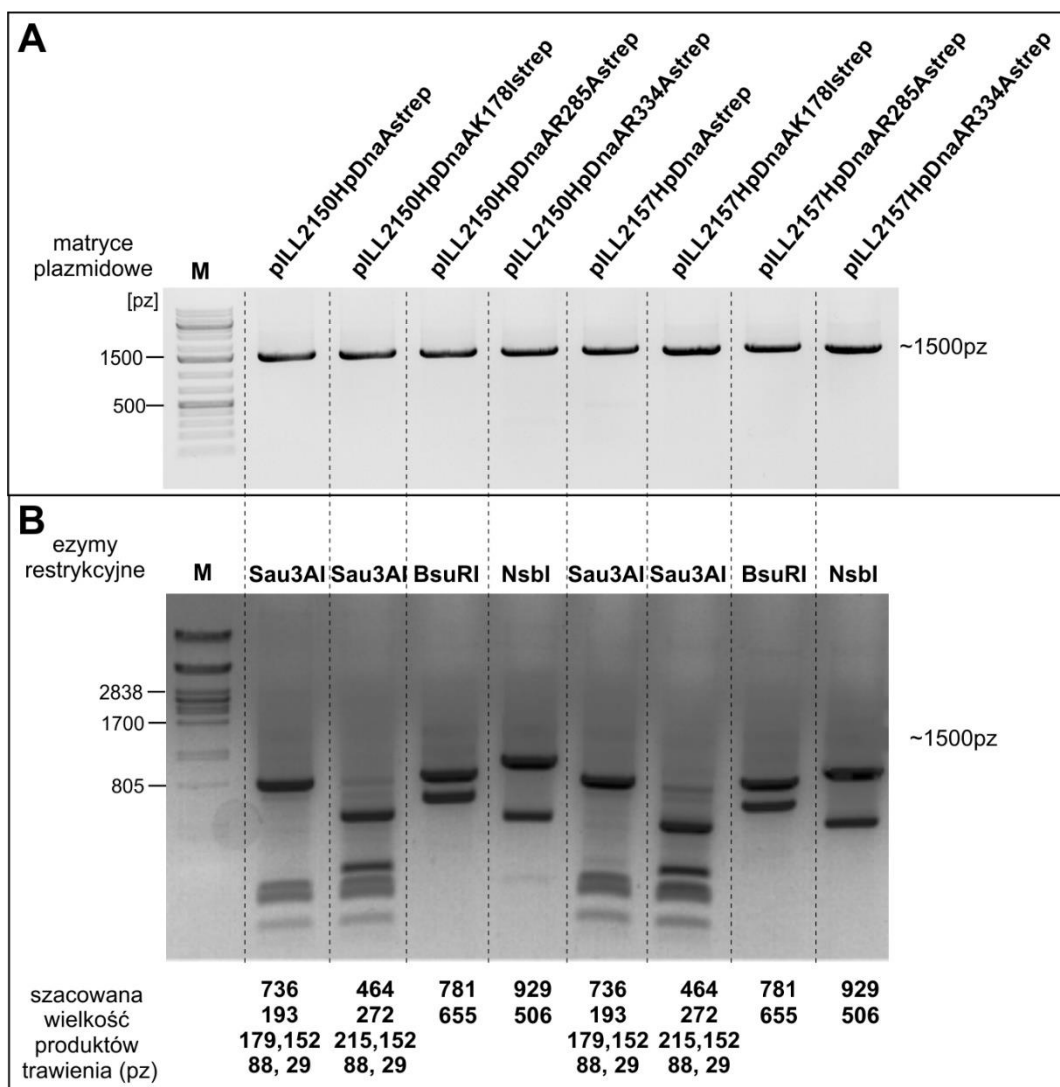
Wektory serii pILL należą do wektorów członkowych, powielających się w komórkach *E. coli* i *H. pylori* (Boneca et al. 2008). Wektor pILL2150strep umożliwia ściśle kontrolowaną, indukowaną IPTG syntezę białek w komórkach *H. pylori* na stosunkowo niskim poziomie, porównywalnym z poziomem syntezy dzikiego białka DnaA (Zawilak -Pawlik, dane nieopublikowane). Wektor pILL2157strep umożliwia indukowaną IPTG syntezę białek w komórkach *H. pylori* na stosunkowo wysokim poziomie, znacząco wyższym niż synteza DnaA w szczepie dzikim, ale synteza nie jest ściśle kontrolowana (tzw. wektor ciekący).

Serię wektorów ekspresyjnych *H. pylori*: pILL2150HpDnaAstrep, pILL2150HpDnaAK178Istrep, pILL2150HpDnaAR285Astrep, pILL2157HpDnaAstrep, pILL2157HpDnaAK178Istrep, pILL2157HpDnaAR285Astrep oraz pILL2157HpDnaAR334Astrep, pochodnych wektorów pILL2150strep oraz pILL2157strep, syntezujących warianty białka DnaA zmutowane w obrębie domeny III, przygotowano w celu zmutowania szczepu N6 *H. pylori* i przeprowadzenia analiz wpływu ATP na proces inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori in vivo*.

Do wektora pILL2150strep przeklonowano gen *dnaA* wycięty z wektora pET21HpDnaAstrep enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI (rozdziały 3.6.5.-3.6.9). Otrzymano wektor pILL2150HpDnaAstrep_3aa, który posłużył jako matryca do konstrukcji kolejnych wektorów zawierających gen zmutowany w miejscach istotnych dla oddziaływań zależnych od ATP - *dnaAK178I*, *dnaAR285A* oraz *dnaAR334A* (tabela nr 7). Gen powielono w reakcji PCR (tabela nr 8) wprowadzając odpowiednie mutacje punktowe, a następnie wklonowano do wektora pILL2150HpDnaAstrep_3aa, uzyskując wektory odpowiednio, pILL2150HpDnaAK178Istrep_3aa, pILL2150HpDnaAR285Astrep_3aa, pILL2150HpDnaAR334Astrep_3aa. Startery do wprowadzenia mutacji punktowych zaprojektowano tak, że wprowadzenie mutacji zmieniającej aminokwas wprowadzało również mutację synonimiczną, zmieniającą miejsca trawień enzymów restrykcyjnych w obrębie sekwencji wprowadzanej starterem. Dlatego poprawność klonowania można było sprawdzić

trawieniem restrykcyjnym odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (rysunek nr 14, załącznik nr 1). W tym celu gen *dnaA* powielono na matrycy uzyskanych plazmidów z wykorzystaniem starterów Fw_pILL2150 oraz pILL50_57rev. Otrzymane produkty reakcji PCR trawiono odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi, zależnie od powielanego wariantu genu: Sau3AI (geny *dnaA* oraz *dnaAK178I*), BsuRI (*dnaAR285A*) NsbI (*dnaAR334A*). Potwierdzono poprawność uzyskanych konstruktów (dane niepokazane).

W trakcie dalszych analiz okazało się, że dodatkowe 3 aminokwasy na N-końcu białka DnaA, powstające w trakcie syntezy DnaA kodowanego na wektorach pILL2150strep, mogą zaburzać aktywność białka, a w konsekwencji wyniki analiz. W związku z tym z wektora pILL2150HpDnaA (tabela nr 5), zawierającego natywną wersję genu *dnaA*, enzymami BglII oraz SphI wycięto fragment 1766 pz zawierający 5'-koniec genu *dnaA* (1-231 pz) i wklonowano w analogiczne miejsce w wektorach, pILL2150HpDnaAstrep_3aa, pILL2150DnaAK178Istrep_3aa, pILL2150DnaAR285Astrep_3aa oraz pILL2150DnaAR334Astrep_3aa. Poprawność otrzymanych wektorów sprawdzono trawieniami restrykcyjnym parami enzymów BamHI i XhoI oraz NdeI i XhoI. Trawienie obiema parami enzymów wektorów pILL2150HpDnaAstrep_3aa, pILL2150HpDnaAK178Istrep_3aa, pILL2150HpDnaAR285Astrep_3aa, pILL2150HpDnaAR334Astrep_3aa wytrawia fragment o wielkości ok. 1500 pz, ponieważ w regionie 3' powyżej genu *dnaA* znajdują się miejsca restrykcyjne BamHI i NdeI. W przypadku wektorów pILL2150HpDnaAstrep, pILL2150HpDnaAK178Istrep, pILL2150HpDnaAR285Astrep i pILL2150HpDnaAR334Astrep, produkt trawienia ok. 1500 pz otrzymano tylko dla pary NdeI i XhoI, ponieważ miejsce BamHI zostało usunięte w procesie wymiany fragmentu 1766 pz. W ten sposób uzyskano konstrukty pILL2150HpDnaAstrep, pILL2150DnaAK178Istrep, pILL2150DnaAR285Astrep, pILL2150DnaAR334Astrep. Z konstruktów pILL2150strep wycięto warianty genu *dnaA* za pomocą enzymów NdeI oraz XhoI i wklonowano do wektora pILL2157strep trawionego tymi samymi enzymami restrykcyjnymi, uzyskując plazmidy pILL2157HpDnaAstrep, pILL2157HpDnaAK178Istrep, pILL2157HpDnaAR285Astrep, pILL2157HpDnaAR334Astrep. Poprawność wszystkich uzyskanych konstruktów serii pILL sprawdzono trawiąc produkty PCR. uzyskane z zastosowaniem starterów Fw_pILL2157 i pILL50_57rev odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi: SauA3I (geny *dnaA* oraz *dnaAK178I*), BsuRI (*dnaAR285A*), NsbI (*dnaAR334A*) (rysunek nr 15).



Rysunek 15 Analiza poprawności otrzymanych konstruktów *dnaA* serii pILL2150strep oraz pILL2157strep. **A:** wyniki reakcji PCR prowadzonej na matrycach wyizolowanych plazmidów z zastosowaniem dwóch zestawów starterów: Fw_pILL2150 i pILL50_57rev dla pochodnych wektora pILL2150strep oraz Fw_pILL2157 i pILL50_57rev dla pochodnych wektora pILL2157strep. M -wzorzec mas GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. **B:** wyniki kontrolnych trawień produktów reakcji PCR uzyskanych jak w części A. Każdy produkt PCR został strawiony odpowiednim enzymem, tak aby zweryfikować wprowadzenie mutacji K178I, R285A, R334A. M -wzorzec mas λ /PstI.

Analiza PCR i trawienia produktów PCR potwierdziła uzyskanie poprawnych plazmidów pILL2150HpDnaAstrep, pILL2150HpDnaAK178Istrep, pILL2150HpDnaAR285Astrep, pILL2150HpDnaAR334Astrep pILL2157HpDnaAstrep, pILL2157HpDnaAK178Istrep, pILL2157HpDnaAR285Astrep, pILL2157HpDnaAR334Astrep. Plazmidy zostały wykorzystane do indukowanej syntezy białek w komórkach *H. pylori* (rozdział nr 4.2)

4.2 Izolacja rekombinowanych wariantów białka DnaA *H. pylori*

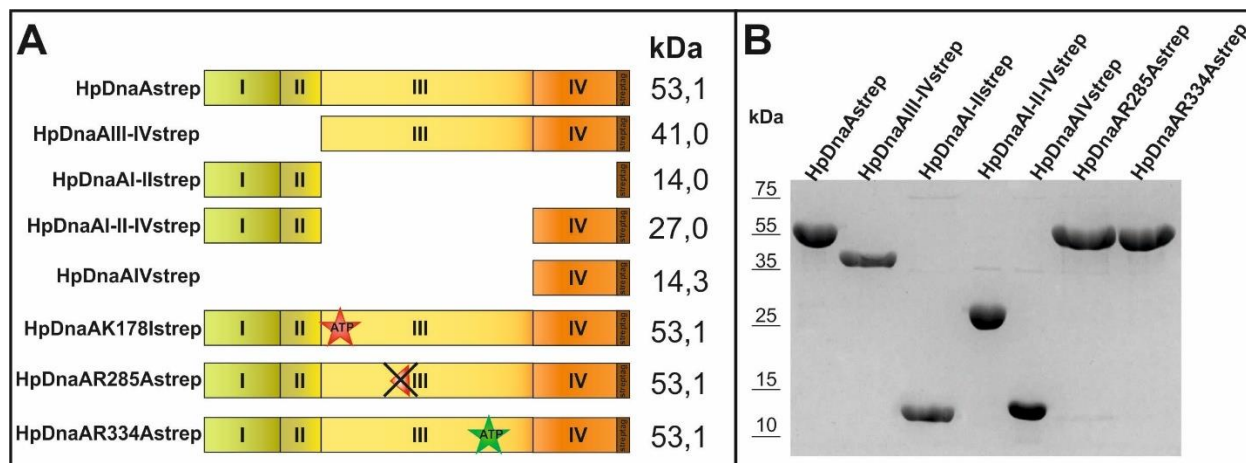
Białko GST-HpDnaAIV, stosowane w analizach oddziaływania DnaA z DNA, syntezowano i oczyszczano zgodnie z protokołem zawartym w (Zawilak et al. 2001). Białko 6HisHobA (dalej nazywane HobA) oczyszczono zgodnie z protokołem zawartym w (Zawilak-Pawlik et al. 2007).

Pozostałe rekombinowane białka otrzymano przy użyciu systemu ekspresyjnego pET w komórkach *E. coli* BL21, a oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa do złoża Strep - Tactin (rozdział 3.6.2.2.). Tabela nr 12 podsumowuje wyniki oczyszczania, a rysunek nr 16 przedstawia schematyczną budowę przygotowanych wariantów białka DnaA oraz analizę reprezentatywnych preparatów białkowych uzyskanych w trakcie prowadzonych badań.

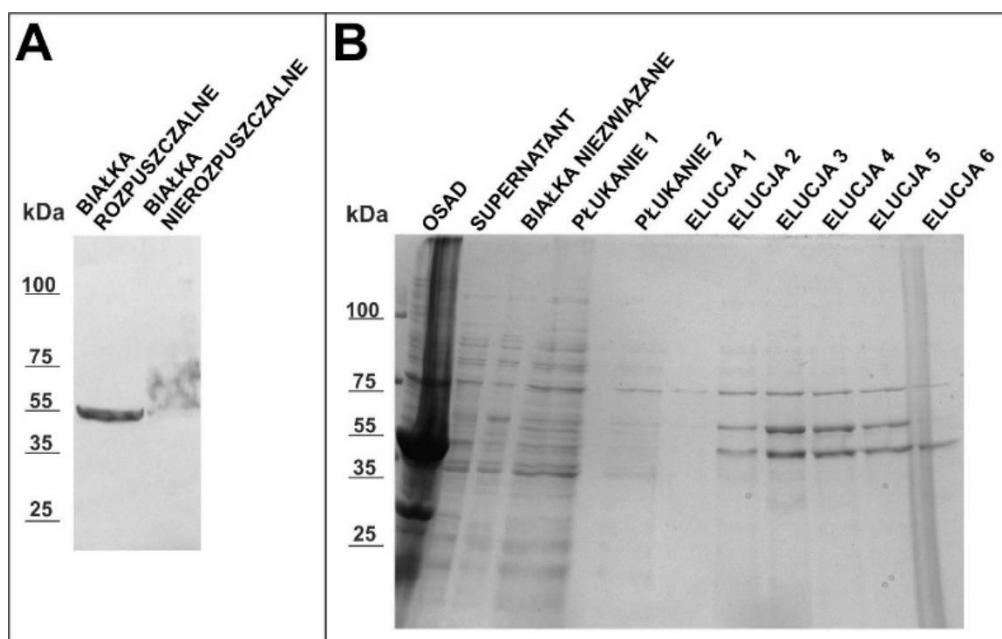
Tabela 12 Podsumowanie procedur izolacji rekombinowanych wariantów białek DnaA

BIAŁKO	STOSOWANY WEKTOR EKSPRESYJNY	WARUNKI INDUKCJI	STĘŻENIA BIAŁKA [mg/ml]	CZYSTOŚĆ Szacowana na podstawie analizy densytometrycznej żeli SDS-PAGE
HpDnaAstrep	pET21HpDnaAstrep	Hodowla objętości 1 l w temp. 37°C do osiągnięcia OD ₆₀₀ ~1, indukcja IPTG do końcowego stężenia 0,1 mM. Hodowla w temp. 10°C przez noc	1,3-2,5	Okolo 90% (rysunek nr 16 B)
HpDnaAIII-IVstrep	pET21HpDnaAIII-IVstrep		1,3-1,6	
HpDnaAI-IIstrep	pET21HpDnaAI-IIstrep		2,2-3,4	
HpDnaAI-II-IVstrep	pET21HpDnaAI-II-IVstrep		3,2-4,5	
HpDnaAIVstrep	pET21HpDnaAIVstrep		0,5-1,2	
HpDnaAR285Astrep	pET21HpDnaAR285Astrep		0,6-2,5	
HpDnaAR334Astrep	pET21HpDnaAR334Astrep		0,5-2,1	
HpDnaAK178Istrep	pET21HpDnaAK178Istrep		Izolacja nie powiodła się (rysunek nr 17)	

STĘŻENIA BIAŁKA - w tej kolumnie podano zakres stężeń otrzymanych dla różnych frakcji białek



Rysunek 16 Warianty rekombinowanych białek DnaA *H. pylori*. **A:** Schematyczna budowa przygotowanych wariantów białek rekombinowanych z zaznaczeniem poszczególnych domen białka HpDnaA oraz metki Strep-tag. Gwiazdkami i trójkątem zaznaczono mutowane miejsca związane z oddziaływaniem z ATP, gwiazdki: czerwona - wariant K178I o zredukowanej zdolności do wiązania ATP i ADP, zielona - wariant R334A niezdolny do hydrolizy ATP (ciągle związany z ATP); przekreślony trójkąt oznacza zmutowaną resztę argininy 261 (*E. coli* R285) w palcu argininowym, niezdolny do oligomeryzacji. **B:** Zdjęcie żelu SDS-PAGE przedstawiające przykładowe frakcje stosowanych preparatów białkowych. Mimo licznych podjętych prób nie udało się otrzymać preparatu białka zmutowanego w pozycji 156 (*E. coli* K178I).



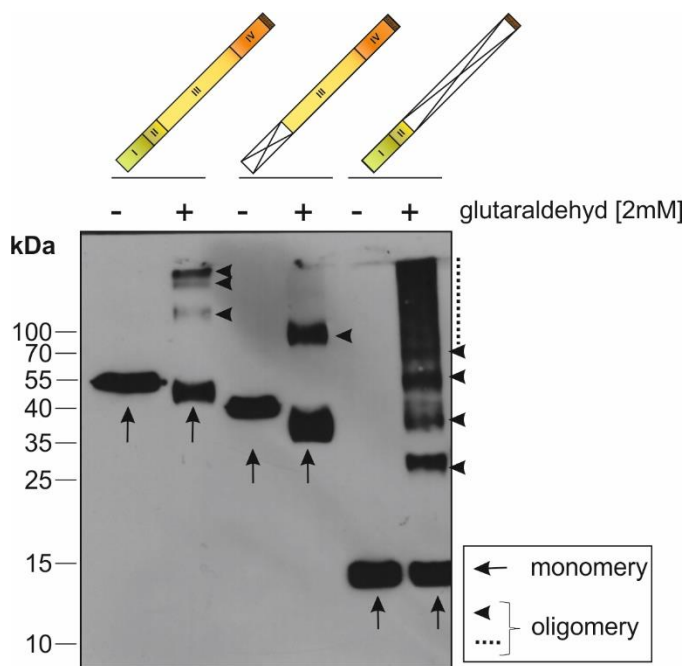
Rysunek 17 Analiza etapów oczyszczania białka HpDnaAK178Istrep. **A:** Analiza Western blot sprawdzająca syntezę i rozpuszczalność białka HpDnaAK178Istrep w komórkach *E. coli* BL21. Komórki zawierające plazmid pET21HpDnaAK178Istrep indukowano IPTG, komórki rozbijano ultradźwiękami i wirowano przy 27 000xg, na żel naniesiono frakcję supernatantu zawierającego białka rozpuszczalne oraz frakcję osadu po wirowaniu, zawierającego frakcję nierozpuszczalną białek i nierozbite komórki bakterii. Detekcji białka DnaA dokonano za pomocą przeciwciała StrepMAB-Classic, HRP conjugate. **B:** Żel SDS-PAGE przedstawiający etapy przykładową izolację białka. osad - nierozpuszczalne białka i resztki po rozbiciu komórek bakteryjnych, supernatant - frakcja rozpuszczalnych białek otrzymanych podczas wirowania rozbitych komórek bakteryjnych, białka niezwiązane - przesącz otrzymany po nałożeniu supernatantu na złożo, zawiera białka, które nie oddziaływały ze złożem, płukanie 1-2 - frakcje przepłukiwania złoża buforem W w celu odmycia niespecyficznie związanych ze złożem białek, elucja 1-6 - frakcje elucji specyficznie związanych ze złożem białek.

Oczyszczono siedem preparatów z ośmiu zaplanowanych wariantów białka DnaA *H. pylori*. Pomimo licznych prób nie udało się opracować protokołu syntezy i izolacji białka HpDnaAK178Istrep. Białko HpDnaAK178Istrep było syntezowane w komórkach *E. coli* BL21. Podczas optymalizacji warunków syntezy w małej skali (50 ml testowej hodowli) po rozbiciu komórek ultradźwiękami oraz zwirowaniu zawiesiny przy 27 000xg (rozdział 3.6.2.2) białko HpDnaAK178Istrep znajdowało się we frakcji białek rozpuszczalnych. Świadczy o tym sygnał otrzymany w analizie Western Blot (rysunek nr 17A). W trakcie przygotowywania biomasy z hodowli preparatywnej (objętości 1l), podczas rozbijania komórek rekombinowane białko przechodziło do frakcji białek nierozpuszczalnych, widoczne na rys. nr 17B w ścieżce opisanej jako osad (osad nierozpuszczalnych białek otrzymany podczas izolacji białka) jako intensywny prążek na wysokości odpowiadającej wielkości białka HpDnaAK178Istrep (ok. 55 kDa). Frakcje eluowane destybiotyną zawierały niejednorodny preparat białka, posiadający nieznaną zanieczyszczenia białkowe.

4.3 Rola domen I-II białka DnaA w oligomeryzacji DnaA oraz oddziaływania DnaA z DNA

4.3.1 Analiza zdolności białka DnaA do oligomeryzacji

Dotychczasowe doniesienia literaturowe stawiały tezę, że białko DnaA *Helicobacter pylori* nie oddziałuje ze sobą za pośrednictwem domeny I (Natrajan et al. 2009). Stało to w sprzeczności do badań przeprowadzonych w naszym laboratorium, w których, za pomocą bakteryjnego systemu dwuhybrydowego wykazano, że domena I białka DnaA *H. pylori* oddziałuje z całym białkiem jak i samą domeną I (Zawilak-Pawlik, dane nieopublikowane). W celu zbadania, czy domena I jest zdolna do homodimeryzacji oraz jaki ma wpływ na homooligomeryzację białka pełnej długości przeprowadzono analizę homooligomeryzacji DnaA wykorzystując technikę utrwalania glutaraldehydem kompleksów białkowych, a następnie analizując migrację tych kompleksów w żelu SDS-PAGE (rozdział 3.7.2) (rysunek nr 18).

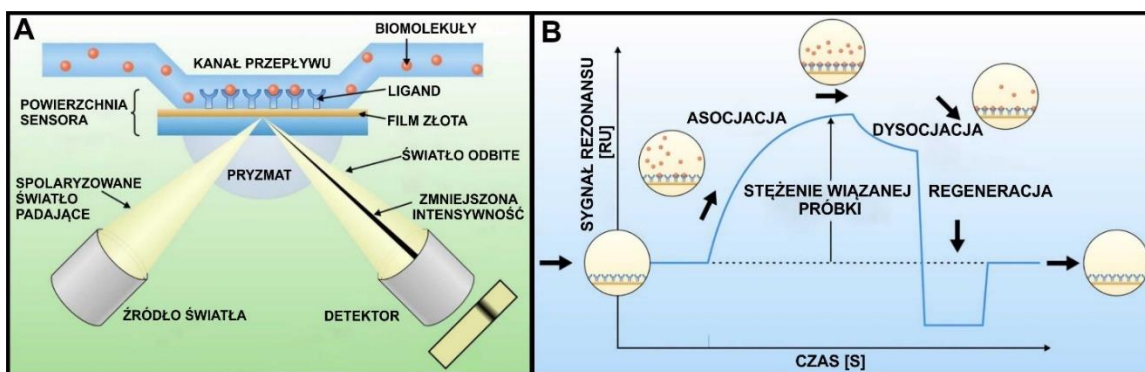


Rysunek 18 Analiza udziału domen I-II w homooligomeryzacji wariantów rekombinowanego białka DnaA. HpDnaAstrep, HpDnaAIII-IVstrep (po 42 ng/ μ l), HpDnaAI-IIstrep (84 ng/ μ l) sieciowano 2mM glutaraldehydem, a następnie rozdzielano w 12% żelu SDS-PAGE. Detekcji białek dokonywano techniką western blot przy użyciu przeciwciała StrepMAB-Classic, HRP conjugate. Reakcję wywoływano chemiluminescencyjnie.

Analiza sieciowania wykazała, że białko HpDnaAI-IIstrep (14 kDa) podlega sieciowaniu glutaraldehydem. Część białka migruje jak forma nieusieciowana, czyli monomeryczna, natomiast część frakcji migruje jako dimery (Mcz \sim 30 kDa) i oligomery wyższych rzędów, prawdopodobnie trimery (Mcz \sim 45 kDa), tetrametry (Mcz \sim 60 kDa) oraz kompleksy o bliżej nieokreślonej stechiometrii, widoczne w postaci rozległego tła w ścieżce z sieciowanym HpDnaAI-IIstrep. W przypadku pozbawionego N-końca białka HpDnaAIII-IVstrep (41 kDa) stwierdzono, że białko tworzy głównie dimer o masie cząsteczkowej \sim 90 kDa. W przypadku analizy kompleksów tworzonych przez białko pełnej długości HpDnaAstrep (53,1 kDa) wykazano tworzenie kilku kompleksów odpowiadających prawdopodobnie dimerowi i dwóm różnym oligomerom wyższego rzędu. Zaznaczyć należy, że z powodu niewystarczającej rozdzielczości żelu nie można jednoznacznie określić składu kompleksów HpDnaAstrep. Na podstawie porównania migracji kompleksów tworzonych przez 3 warianty białka DnaA stwierdzono, że w oddziaływania białka pełnej długości zaangażowane są prawdopodobnie domeny I-II oraz domeny III-IV, przy czym z danych literaturowych dotyczących innych białek DnaA można przypuszczać, że w oddziaływania zaangażowane są domeny I oraz III (dotychczas nie wykazano homooligomeryzacji domen II i IV białek DnaA).

4.3.2 Analiza plazmonowego rezonansu powierzchniowego (SPR) wpływu domen I-II oraz III na oddziaływania DnaA-DNA

Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR, ang. *surface plasmon resonans*) to technika optyczna polegająca na pomiarze zmiany współczynnika załamania światła spowodowanej oddziaływaniem biomolekuł przepływających nad powierzchnią sensora (tzw. cząsteczek analitu, np. białek) ze związanymi na powierzchni sensora cząsteczkami (tzw. ligand, np. DNA) (rysunek nr 19A). Jako wynik analizy otrzymuje się wykres (sensogram) zmian rezonansu w czasie wyrażany w jednostkach RU (ang. *resonanse unit*) 1 RU to jednostka sygnału odpowiadająca związaniu 1pg badanych biomolekuł na 1mm² sensora. Zwykle, szczególnie dla cząsteczek wykazujących nieswoiste oddziaływania z powierzchnią kanału bądź z ligandem (np. nieswoiste oddziaływania z DNA), stosuje się dodatkową kontrolną analizę dla nieswoistych oddziaływań analitu (np. z nieswoistym fragmentem DNA). Otrzymany wykres obrazujący oddziaływania swoiste to różnica pomiędzy sygnałami otrzymanymi dla kanału, w którym zachodzi oddziaływanie specyficzne i kanału, w którym do oddziaływań specyficznych nie dochodzi. Na sensogramie (rysunek nr 19B) obserwujemy poszczególne fazy zachodzących oddziaływań. Faza pierwsza to asocjacja, czyli wiązanie biomolekuł do ligandu. W przypadku oddziaływań analitu z ligandem obserwujemy wzrost sygnału RU, co obrazuje wzrost masy cząsteczek oddziałujących z ligandem na powierzchni sensora. Następnie osiągamy stan równowagi, czasem niezauważalny na sensogramie z powodu niestabilności kompleksów lub niskiego powinowactwa analitu do ligandu. Kolejno następuje dysocjacja, czyli rozpad kompleksów analit – ligand. W tej części sensogramu widać spadek wartości sygnałów RU. Ostatnia faza to regeneracja, czyli oczyszczenie powierzchni sensora ze wszystkich nieoddysocjowanych biomolekuł.



Rysunek 19 A: Schemat zasady działania plazmonowego rezonansu powierzchniowego. **B:** elementy sensogramu otrzymywanego jako wynik pomiaru SPR. Opracowane na podstawie (György et al. 2013)

SPR został wykorzystany do badań ilościowych oddziaływań DnaA – DNA w czasie rzeczywistym. Głównym celem badań było wyjaśnienie zależności powinowactwa domeny wiążącej DNA białka DnaA (domeny IV) do DNA od obecności pozostałych domen białka. W tym celu porównano wiązanie DNA przez kilka wariantów białka DnaA: HpDnaAstrep, HpDnaAI-II-IVstrep, HpDnaAIVstrep, GST-HpDnaAIV oraz HpDnaAI-IIstrep. Zasadniczo technika ta pozwala określać stałe kinetyczne reakcji, ale w przypadku białka DnaA nie jest to możliwe, ponieważ dochodzi do złożonych, równoczesnych oddziaływań międzybiałkowych i nukleoproteinowych, o nieokreślonej stechiometrii. Dlatego w przypadku przeprowadzonych analiz:

- na podstawie parametru RU_{max} (najwyższa wartości RU osiągnięta w czasie analizy dla danego układu DnaA-DNA) oraz masy cząsteczkowej badanego białka określono względną ilość białka związaną do sensora opłaszczonego DNA w stosunku do białka DnaAstrep (tabela nr 13)
- na podstawie RU_{max} oraz przebiegu krzywych w fazie asocjacji określono względne powinowactwo poszczególnych wariantów białka do DNA (porównano wartości otrzymane dla każdego białka z wartościami dla białka HpDnaAstrep)
- na podstawie przebiegu krzywych w fazie dysocjacji określono względną stabilność kompleksów nukleoproteinowych poszczególnych wariantów białka DnaA.

Analizowano oddziaływania wariantów DnaA z regionem Bio-*oriC1* zawierającym 4 boksy DnaA c2-c5 oraz fragmentem Bio- boksy2+3 zawierającym dwa silne boksy DnaA, c2 i c3 (rysunek nr 11). Ponieważ białko DnaA charakteryzuje się oddziaływaniami nieswoistymi z DNA (Zawilak et al. 2003), równolegle badano oddziaływanie wariantów DnaA z regionami Bio-Hp0180 oraz Bio-bez_boksów nieposiadającymi boksów DnaA. Wartości oddziaływań uzyskiwane w przypadku fragmentów DNA bez boksów DnaA odejmowano od wartości oddziaływania DnaA z Bio-*oriC1* lub Bio- boksy2+3, uzyskując charakterystykę oddziaływania DnaA ze swoistymi miejscami wiązania DnaA.

Do powierzchni sensora związano fragmenty biotynylowanego DNA w następującym porządku: kanał nr 1: Bio-Hp0180, kanał nr 2: Bio-*oriC1*, kanał nr 3: Bio-bez_boksów, kanał 4: Bio-boksy2+3. Nad powierzchnią sensora, przy przepływie 15 μ l/min przez 180 sek., podawano roztwory białek o wzrastającym stężeniu (4 – 1024 nM) (faza asocjacji i równowagi). Następnie przez

kolejne 180 sek. prowadzono fazę dysocjacji. Analizowany roztwór białka przepływał kolejno przez kanały 1, 2, 3 i 4. Otrzymane sensogramy to różnice pomiędzy sygnałami otrzymanymi dla kanałów oddziałujących (2 i 4) a kanałami kontrolnymi, na których nie zachodziły specyficzne interakcje białko-DNA (1 i 3).

Ponieważ SPR to metoda, w której duże znaczenie ma masa cząsteczek oddziałujących, otrzymane wartości RU_{max} zostały przeliczone względem masy badanych białek. Przeliczone RU_{max} porównano do przeliczonych wartości RU_{max} otrzymanych dla białka HpDnaAstrep. W tabeli nr 13 w kolumnie WIAZANIE DnaA zebrano wyliczone współczynniki. Do przeliczeń zastosowano poniższe wzory:

$$\Delta M_{CZ} = \frac{M_{CZ} \text{HpDnaAstrep}}{M_{CZ} \text{analizowanego białka}}$$

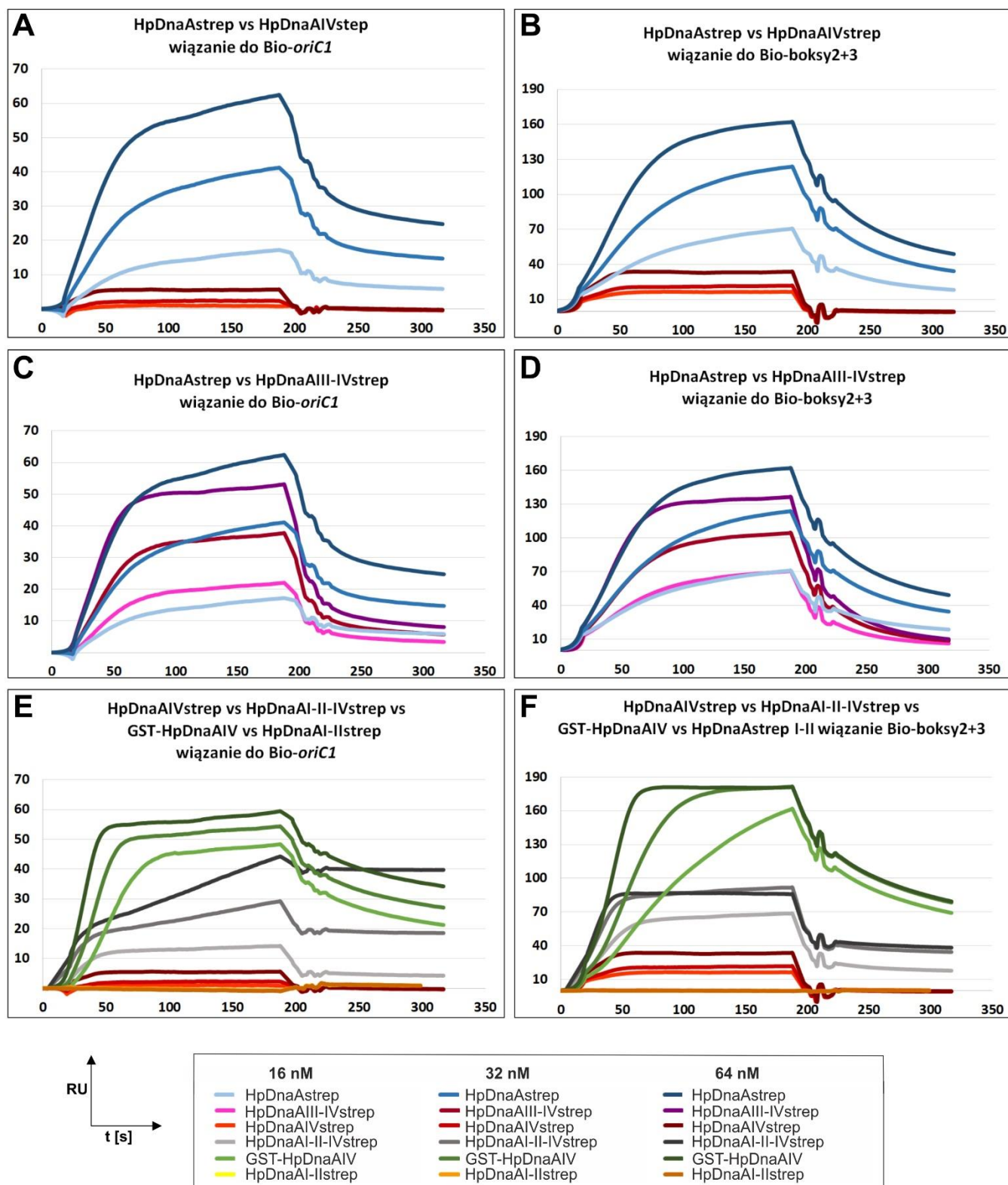
$$\text{WIAZANIE DnaA} = \frac{\Delta M_{CZ} \text{analizowanego białka} \cdot Ru_{max} \text{analizowanego białka}}{Ru_{max} \text{HpDnaAstrep}}$$

Gdzie:

M_{CZ} – masa cząsteczkowa;

RU_{max} – wartość RU na koniec fazy asocjacji, nawet jeżeli stan równowagi nie został osiągnięty;

WIAZANIE DnaA – krotność różnicy pomiędzy wiązaniem wariantów DnaA i dzikiego HpDnaAstrep z DNA.



Rysunek 20 Analiza oddziaływania wariantów białka DnaA *H. pylori* z DNA. Reprezentatywne sensogramy analizy SPR przedstawiające wpływ domen I-II oraz III na oddziaływanie DnaA z regionami Bio-oriC1 oraz Bio-boksy2+3. Prezentowane sensogramy zostały pomniejszone o wartości otrzymane dla oddziaływań niespecyficznych pomiędzy białkami a regionami bez boksy DnaA - Bio-Hp-0180 oraz Bio-bez_boksy

Tabela 13 Porównanie oddziaływania różnych wariantów białka DnaA *H. pylori* z DNA z uwzględnieniem różnic wielkości pomiędzy analizowanymi białkami.

RODZAJ BIAŁKA	M _{CZ} (kDa)	ΔM _{CZ}	STĘŻENIE (nM)	RU _{max}		WIĄZANIE DnaA	
				Bio- <i>oriC1</i>	Bio-boksy 2+3	Bio- <i>oriC1</i>	Bio-boksy 2+3
HpDnaAstrep	53,1	1,0	16	17,0	70,8	1,0	1,0
			32	41,0	123,7	1,0	1,0
			64	62,0	162,1	1,0	1,0
HpDnaAIVstrep	14,3	3,7	16	0,9	16,4	0,2	0,9
			32	2,4	21,8	0,2	0,7
			64	5,6	33,6	0,3	0,8
GST-HpDnaAIV	39	1,4	16	48,4	161,9	4,0	3,2
			32	54,3	180,8	1,8	2,0
			64	59,5	180,8	1,3	1,6
HpDnaAI-II-IVstrep	27	2,0	16	14,2	68,7	1,7	1,9
			32	29,1	91,9	1,4	1,5
			64	44,3	86,0	1,4	1,1
HpDnaAIII-IVstrep	41	1,3	16	22,0	70,5	1,7	1,3
			32	37,6	104,3	1,2	1,1
			64	52,1	136,4	1,1	1,1

M_{CZ} - masa cząsteczkowa;

ΔM_{CZ} - różnica masy cząsteczkowej pomiędzy wariantami białka DnaA a dzikim wariantem HpDnaAstrep wyliczona jako $\Delta M_{CZ} = \frac{M_{CZ} \text{HpDnaAstrep}}{M_{CZ} \text{analizowanego białka}}$; wszystkie wartości odnoszą się do tego samego stężenia molowego porównywanych białek

RU_{max} - wartość RU na koniec fazy asocjacji, nawet jeżeli stan równowagi nie został osiągnięty

WIĄZANIE DnaA - krotność różnicy pomiędzy wiązaniem wariantów DnaA i dzikiego HpDnaAstrep z DNA wyliczona na podstawie wzoru $\text{WIĄZANIE DnaA} = \frac{\Delta M_{CZ} \text{ analizowanego białka} \cdot \text{RU}_{\text{max}} \text{ analizowanego białka}}{\text{RU}_{\text{max}} \text{ HpDnaAstrep}}$; wszystkie wartości odnoszą się do tego samego stężenia molowego porównywanych białek

W przypadku białka HpDnaAI-IIstrep nie zaobserwowano zmian RU podczas przepływu roztrworu białka w kanałach sensora, co wskazuje na brak oddziaływania domen I-II z DNA. Białko HpDnaAstrep oddziałuje z regionem Bio-*oriC1* osiągając wartości 17 - 62 RU_{max}, a z regionem Bio-boksy2+3 70,8 - 162,1 RU_{max} w zakresie badanych stężeń (16, 32 i 64nM) (rysunek nr 20 i tabela nr 13.). HpDnaAIVstrep wykazuje niższe powinowactwo do regionu Bio-*oriC1* oraz Bio-boksy2+3 niż białko HpDnaAstrep: WIĄZANIE DnaA odpowiednio

w zakresach 0,2-0,3 oraz 0,7-0,9. Domena IV około 5x słabiej oddziałuje z regionem Bio-*oriC1* niż białko pełnej długości, niezależnie od badanego stężenia białka. W przypadku regionu Bio-boksy2+3 różnica w oddziaływaniach pomiędzy białkami jest niewielka - 0,7- 0,9 wartości wiązania HpDnaAstrep dla HpDnaAIVstrep. Wskazuje to na wpływ domen I-II-III na wiązanie domeny IV do *oriC1* - zmniejszenie powinowactwa do DNA prawdopodobnie wynika z braku oligomeryzacji białka podczas wiązania kilku boksów. W przypadku wiązania do Bio-boksów2+3 niewielka różnica w wiązaniu DNA pomiędzy HpDnaAstrep a HpDnaAIVstep prawdopodobnie wynika z wiązania tylko do jednej pary silnych boksów - inaczej niż ma to miejsce podczas oddziaływań z Bio-*oriC1*, gdzie dochodzi do kooperatywnych oddziaływań pomiędzy białkami związanymi ze słabymi i silnymi boksami (rysunek nr 11). W te oddziaływania zaangażowane są pozostałe domeny białka DnaA. Zestawiając ze sobą wartości wiązania HpDnaAIVstrep z wartościami uzyskanymi dla HpDnaAI-II-IVstrep oraz GST-HpDnaA można zaobserwować, że zdolność oligomeryzacji N-końca białka istotnie wpływa na wiązanie DNA przez domenę IV. Silnie oligomeryzująca domena GST (metka ta tworzy dimery, (Maru et al. 1996)) wpływa na wzrost wiązania białka z DNA, zarówno do Bio-*oriC1* jak i Bio-boksy2+3, dla niższych stężeń jest to odpowiednio 4,0 i 3,2 razy, a dla wyższych stężeń wartość ta jest około 2x wyższa niż dla białka HpDnaAstrep. W przypadku białka pozbawionego domeny III również obserwujemy silniejsze oddziaływanie z DNA. Dla wiązania Bio-*oriC1* dla kolejnych stężeń białka HpDnaAI-II-IVstrep są to wartości 1,7, 1,4 oraz 1,4x wyższe niż dla HpDnaAstrep. Dla fragmentu Bio-boksy2+3 to odpowiednio 1,9, 1,5 oraz 1,1x wyższe wartości wiązania białka HpDnaAI-II-IVstrep, niż dla białka pełnej długości. Białko HpDnaAIII-IVstrep w wyższych stężeniach oddziałuje z Bio-*oriC1* z podobnym powinowactwem jak białko HpDnaAstrep, natomiast wykazuje 1,7x większe powinowactwo do tego regionu w niższym stężeniu białek (16 nM). Powinowactwo do regionu Bio-boksy2+3 we wszystkich stężeniach białek jest zbliżone (dla białka bez N-końca powinowactwo jest 1,1-1,3x większe niż dla białka pełnej długości).

Analizując przebiegi sensogramów otrzymanych dla białek HpDnaAI-II-IVstrep, GST-HpDnaAIV oraz HpDnaAIVstrep zaobserwowano, że w fazie dysocjacji białka posiadające oligomeryzujący N-koniec nie oddysocjują tak szybko jak HpDnaAIVstrep. Obserwowany wzrost oddziaływania DnaA z DNA pod wpływem obecności na N-końcu domeny oligomeryzującej prawdopodobnie wynika ze wzrostu stabilności tworzonych kompleksów. Dla białek HpDnaAstrep oraz HpDnaAIII-IVstrep fazy asocjacji przebiegają podobnie, natomiast

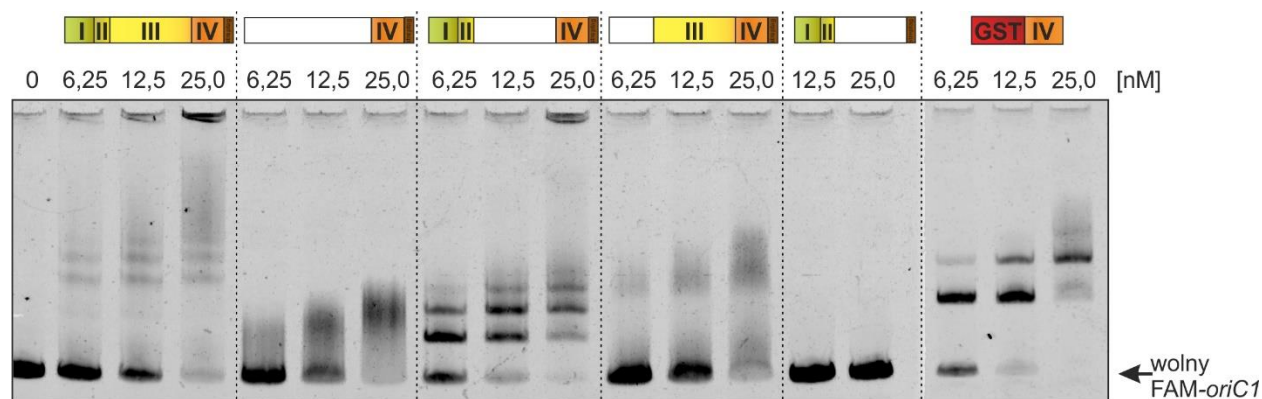
zaobserwowano różnicę w szybkości dysocjacji HpDnaAstrep i HpDnaAIII-IVstrep. Białko HpDnaAIII-IVstrep dysocjowało znacząco szybciej niż białko pełnej długości, co świadczy o niższej stabilności kompleksów HpDnaAIII-IVstrep niż kompleksów białka HpDnaAstrep. Wyniki otrzymane podczas analiz oddziaływania wszystkich białek z DNA wskazują na to, że domeny I-II pełnią rolę w stabilizacji kompleksów białka DnaA z DNA.

Analizy rezonansu powierzchniowego plazmonów wykazały znaczące różnice w charakterze oddziaływań białka DnaA zależnie od jego składu domenowego. Z analiz wynika, że N-koniec białka DnaA oligomeryzuje i ma istotny wpływ na stabilność powstających kompleksów nukleoproteinowych. Ponadto domeny I-II zapewniają kooperatywność oddziaływań zachodzących pomiędzy cząsteczkami białka HpDnaAstrep.

4.3.3 Analiza EMSA wpływu składu domenowego białka DnaA na oddziaływania DnaA z DNA

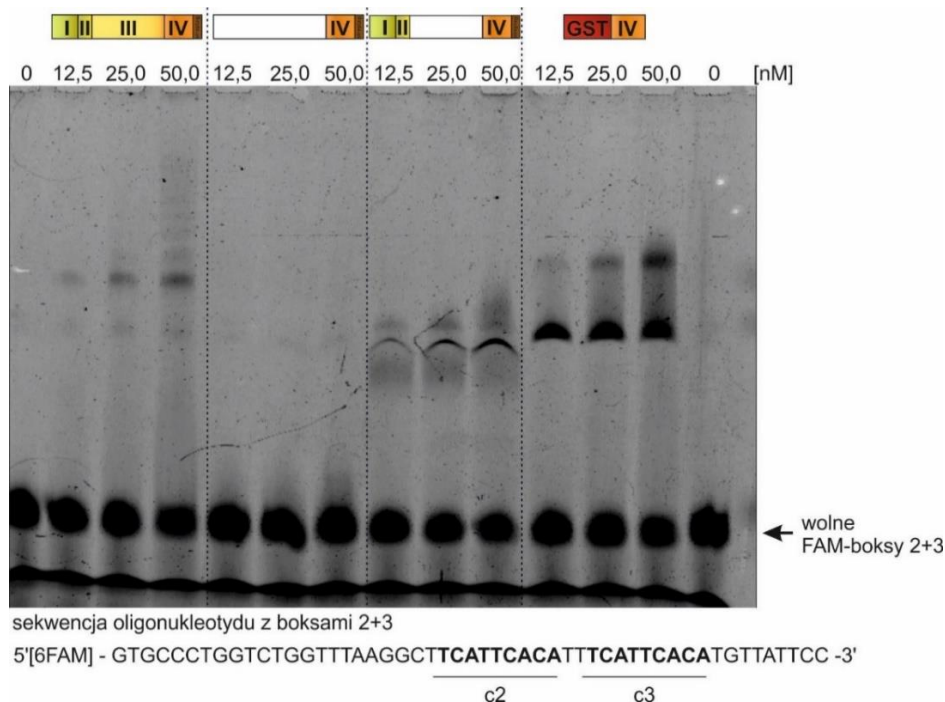
Prezentowane w tym rozdziale wyniki zostały otrzymane z pomocą mgr Doroty Żyły – Uklejewicz z Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Celem analizy było zbadanie wpływu poszczególnych domen białka DnaA na tworzenie kompleksów z *oriC1* (FAM-*oriC1*) oraz DNA zawierającym dwa boksy DnaA (FAM-boksy2+3). Stabilność oddziaływań wariantów białka DnaA z DNA zbadano analizując migrację tworzonych kompleksów nukleoproteinowych w żelu poliakrylamidowym. Białko o wzrastającym stężeniu inkubowano ze stałą ilością znakowanego fluorescencyjnie fragmentu DNA (FAM-*oriC1*, 291 pz, FAM-boksy2+3, 52 pz). Powstałe kompleksy białko-DNA rozdzielano w 5% żelu akrylamidowym i obrazowano za pomocą skanera Typhoon FLA 9500 (rozdział 3.7.2).



Rysunek 21 Analiza opóźnionej migracji kompleksów wariantów białka DnaA z fragmentem FAM-*oriC1*.

Analizując migrację utworzonych kompleksów zaobserwowano, że białko HpDnaAI-IIstrep nie oddziałuje z fragmentem FAM-*oriC1*, o czym świadczy brak zmiany intensywności sygnału niezwiązanego DNA w porównaniu z DNA w próbie bez DnaA oraz brak dodatkowych fluorescencyjnych sygnałów o wolniejszej migracji w żelu od wolnego DNA (rysunek nr 21). Białka HpDnaAIII-IVstrep oraz HpDnaAIVstrep oddziałują z FAM-*oriC1* w zbliżony sposób – powstałe kompleksy migrują tworząc rozmyty sygnał. Kompleksy tworzone przez białka posiadające N-koniec zdolny do oligomeryzacji (HpDnaAI-II-IVstrep oraz GST-HpDnaAIV) tworzą kompleksy widoczne jako ostre prążki w przeciwieństwie do kompleksów widocznych w postaci rozmytych sygnałów DNA dla kompleksów tworzonych przez białka HpDnaAIII-IVstrep i HpDnaAIVstep. Różnica ta prawdopodobnie wynika ze stabilności i/lub uporządkowania rozdzielanych kompleksów – oligomeryzacja białek przez domenę I sprzyja stabilności interakcji DnaA-DNA. Podobne wyniki zmiany stabilności kompleksów w zależności od obecności domen I-II uzyskano w przypadku analiz SPR (rozdział nr 4.3.2). Analizując migrację kompleksów białka HpDnaAstrep z DNA zaobserwowano tworzenie się dwojakiego rodzaju kompleksów: na tle rozmytego sygnału można wyróżnić ostrzejsze prążki DNA związanego z DnaA. Sugeruje to, że oddziaływania pomiędzy białkiem a FAM-*oriC1* są częściowo niestabilne, a pod wpływem oligomeryzacji domen I-II tworzą bardziej trwałe kompleksy.



Rysunek 22 Analiza opóźnionej migracji kompleksów wariantów białka DnaA z fragmentem FAM-boksy2+3

Analizując migrację kompleksów stworzonych przez badane białka i fragment FAM-boksy2+3, zaobserwowano, że sama domena IV w bardzo niewielkim stopniu oddziałuje z tymi bokсами – widoczny bardzo słaby sygnał od tworzonych kompleksów (rysunek nr 22). Natomiast dla białka, w którym domena rozpoznająca DNA połączona jest z domeną oligomeryzująca (HpDnaAI-II-IVstrep oraz GST-HpDnaAIV) zaobserwowano znaczący wzrost wydajności oddziaływania i stabilności kompleksów nukleoproteinowych. W przypadku białka pełnej długości również obserwowano zwiększenie trwałości zachodzących interakcji w stosunku do trwałości kompleksów tworzonych przez białko HpDnaAIVstrep. Wyniki analizy dokonanej dla kompleksów białko-FAM-boksy2+3 są zgodne z obserwacjami poczynionymi dla kompleksów białko-FAM-oriC1. Ponadto porównanie migracji kompleksów białko - FAM-oriC1 oraz białko-FAM-boksy2+3 pokazuje, że do wydajniejszego wiązania DNA przez białko wymagana jest kooperatywność interakcji pomiędzy białkami. Kooperatywność wymaga obecności domen oligomeryzujących, szczególnie domeny I. Ponadto kooperatywności sprzyja obecność większej liczby boksov DnaA (region FAM-oriC1 zawiera 4 boksy a FAM-boksy2+3 2 miejsca wiązania). Warunki analizy EMSA są bardziej agresywne niż warunki SPR – podczas analizy EMSA kompleksy nukleoproteinowe pod wpływem napięcia elektrycznego przeciskają się pomiędzy porami żelu poliakrylamidowego w przeciwieństwie do analizy trwałości kompleksów w warunkach natywnych. Prawdopodobnie również warunki analizy wpływają na różnicę w widocznej stabilności kompleksów.

4.3.4 Analiza mikroskopii elektronowej wpływu domen I-II oraz domeny III na tworzenie kompleksów DnaA - DNA

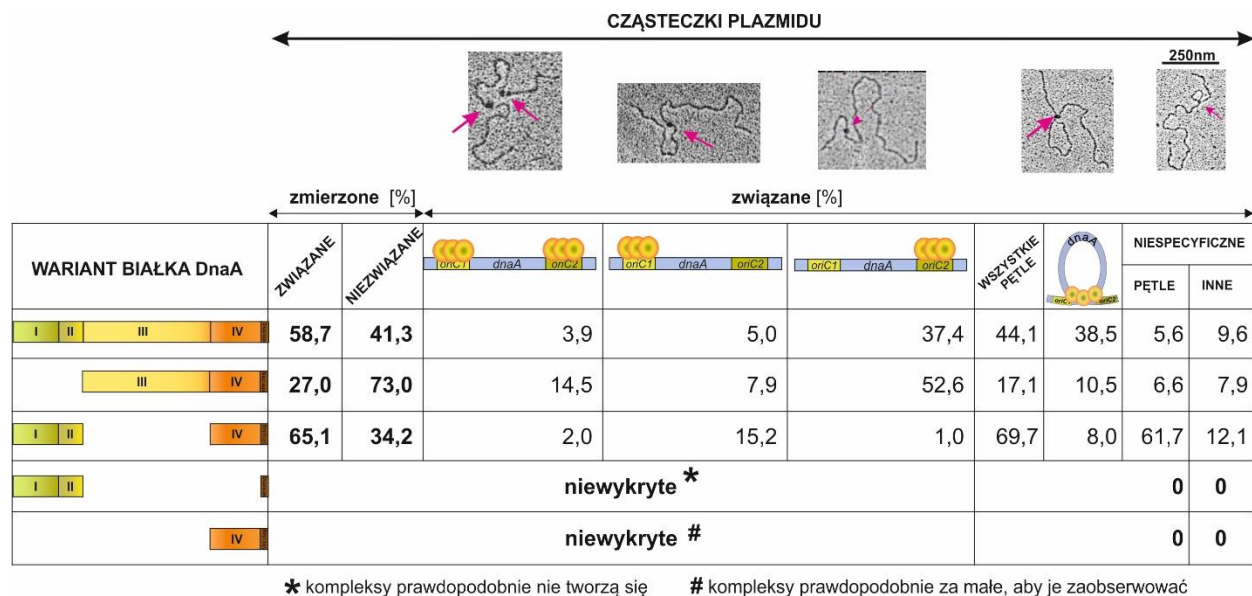
Analiza oddziaływań *H. pylori* DnaA z DNA jest bardziej skomplikowana niż w przypadku białka *E. coli* DnaA, ponieważ białko *H. pylori* rozpoznaje również topologię wiązanego fragmentu DNA (rozdział 1.4.1). We wcześniejszych badaniach wykazano, że białko DnaA *H. pylori* wiążąc się do obu podregionów *oriC*: *oriC1* i *oriC2*, tworzy subkompleksy nukleoproteinowe DnaA-*oriC1* i DnaA-*oriC2*, które oddziałują ze sobą prowadząc do wypełnienia genu *dnaA* znajdującego się pomiędzy nimi (Donczew et al. 2012). Zależność oddziaływania DnaA-DNA od konformacji cząsteczki DNA zawężyła liczbę metod mogących posłużyć do analizy tych oddziaływań, w tym oddziaływania DnaA z regionem *oriC2* lub z pełnej długości regionem *oriC1-dnaA-oriC2*. Oddziaływania DnaA zachodzą tylko z superskręconym *oriC2*, a superskręcony region *oriC2* lub *oriC1-dnaA-oriC2* najłatwiej uzyskać izolując plazmidowy DNA

zawierający badaną sekwencję. Mikroskopia elektronowa to jedna z nielicznych technik pozwalających na obserwację oddziaływań DnaA z dużymi cząsteczkami jakimi są plazmidy. W tej metodzie białka oddziałują z superskręconym plazmidem, który później jest linearyzowany enzymem restrykcyjnym. Utrwalone kompleksy obserwuje się pod mikroskopem elektronowym, a następnie analizuje wykorzystując odpowiednie programy komputerowe.

Warianty białka DnaA inkubowano z plazmidem por1ori2 (rozdział 3.7.3; tabela nr 14), kompleksy utrwalono 2% glutaraldehydem. Następnie trawiono plazmid enzymem restrykcyjnym ScaI i oczyszczano na złożu Sephacryl S-200. Kompleksy nanoszono na mikę, na której tworzone film platynowo-węglowy. Preparaty obserwowano i fotografowano przy pomocy mikroskopu 100 kV Philips CM100. Otrzymane zdjęcia analizowano w programie ImageJ, w którym mierzono całkowitą długość obserwowanych plazmidów oraz długości od początku cząsteczki do miejsca związanego przez białko, długość powstałej pętli oraz odległości pomiędzy obserwowanymi kompleksami.

Tabela 14 Stężenie białek oraz plazmidu zastosowana do przygotowania preparatów do mikroskopii elektronowej

SKŁADNIK MIESZANINY REAKCYJNEJ	STĘŻENIE [nM]
por1ori2	1,2
HpDnaAstrep	56,5
HpDnaAIII-IVstrep	73,2
HpDnaAR285Astrep	56,5
HpDnaAR334Astrep	56,5
HpDnaAI-II-IVstrep	166,7
HpDnaAIVstrep	314,7
HpDnaAI-IIstrep	321,4
HobA	56,5



Rysunek 23 Analiza kompleksów nukleoproteinowych wariantów białka DnaA z plazmidem *pori1ori2* metodą mikroskopii elektronowej. Panel nad tabelą przedstawia reprezentatywne zdjęcia z obserwowanych rodzajów kompleksów oraz skalę zdjęć. Różowe strzałki na zdjęciach wskazują cząsteczki białka związane z DNA. Pierwsza kolumna tabeli przedstawia badany wariant białka DnaA. Kolejne dwie kolumny to procentowy udział związanych i niezwiązanych przez białko cząsteczek plazmidów. Wartość procentowa odnosi się do całkowitej liczby zbadanych cząsteczek plazmidów. Następne kolumny przedstawiają procentowy udział różnych rodzajów kompleksów w liczbie związanych cząsteczek plazmidów. Kolejno opisywane kompleksy to: DnaA-*oriC1* oraz DnaA-*oriC2* bez utworzenia pętli DNA, DnaA-*oriC1*, DnaA-*oriC2*, wszystkie zaobserwowane pętłe (specyficzne i niespecyficzne), DnaA-*oriC1* oraz DnaA-*oriC2* tworzące pętlę DNA (specyficzne), pozostałe niespecyficzne oddziaływani z plazmidem (niespecyficzne pętłe, wiązanie w niespecyficznym miejscu na plazmidzie). Zmierzone – wszystkie cząsteczki poddane analizie; związane – tylko cząsteczki związane przez białko.

Białko HpDnaAI-IIstrep, pozbawione domeny IV oddziałującej z DNA, prawdopodobnie nie tworzy kompleksów nukleoproteinowych. W przypadku białka HpDnaAIVstrep nie zaobserwowano kompleksów z plazmidem. Mimo zdolności wiązania do DNA (rozdziały 4.3.2 i 4.3.3), białko jest prawdopodobnie zbyt małe, aby uformować kompleksy widoczne z zastosowaniem metody mikroskopii elektronowej.

Białko HpDnaAstrep wiąże się do 58,7% zbadanych cząsteczek plazmidu *pori1ori2*, tworząc najczęściej (38,5%) specyficzne kompleksy z dwoma podregionami *oriC1* i *oriC2* z wypętlnym genem *dnaA* (rysunek nr 23). Spośród związanych cząsteczek nietworzących pętli najczęściej obsadzany przez białko pełnej długości jest region *oriC2*. 15,2% wszystkich kompleksów to wiązania niespecyficzne, tzn. kompleksy utworzone poza regionami *oriC1* i *oriC2* oraz pętle o niepoprawnej długości (tzw. pętle niespecyficzne). Porównując HpDnaAIII-IVstrep do białka pełnej długości zaobserwowano, że rzadziej wiąże się ono do *pori1ori2*. Tylko 27,0% zbadanych cząsteczek stworzyło kompleksy nukleoproteinowe, z czego jedynie 10,5% kompleksów

utworzyło specyficzne pętle DNA. Wskazuje to na wpływ domeny I-II i/lub oddziaływań międzybiałkowych przez nią tworzonych na zdolność wiązania białka HpDnaAstrep do *oriC2*. Dla białka HpDnaAIII-IVstrep, podobnie jak dla białka pełnej długości, w cząsteczkach bez pętli kompleks białkowy preferencyjnie tworzy się w regionie *oriC2*. Oba białka charakteryzują się podobnym odsetkiem niespecyficznych oddziaływań nukleoproteinowych: 15,2% w przypadku HpDnaAstrep, 14,5% w przypadku HpDnaAIII-IVstrep. Analizując wyniki wiązania białka HpDnaAI-II-IVstrep zauważano, że większy procent cząsteczek plazmidu został związany niż w przypadku HpDnaAstrep (odpowiednio 65,1% i 58,7%). Spośród utworzonych kompleksów tylko 8% charakteryzowało się specyficznie utworzoną pętlą. Należy zwrócić uwagę na ogólną liczbę utworzonych pętli przez białko HpDnaAI-II-IVstrep: 69,0%, czyli więcej niż w przypadku białka pełnej długości (44,1%). Jednakże znacząca większość z nich była niepoprawnie uformowana (DnaA związane w innych regionach niż *oriC1* i *oriC2*). W przypadku białka HpDnaAI-II-IVstrep częściej wiązany był region *oriC1* (15,2%), w przeciwieństwie do białek HpDnaAstrep i HpDnaAIII-IVstrep, które częściej wiązały region *oriC2* (odpowiednio 37,4% i 52,6% cząsteczek ze związanym regionem *oriC2*).

Analiza tworzenia kompleksów przez powyższe trzy warianty białka DnaA wskazuje, że domeny I-II odpowiedzialne są za oddziaływania pomiędzy kompleksami utworzonymi na subregionach *oriC* - białka posiadające natywny N-koniec częściej oddziałują z DNA tworząc pętle. Dodatkowo obecność tej domeny białka zwiększa zdolność białka do wiązania do DNA - białka HpDnaAstrep i HpDnaAI-II-IVstrep częściej tworzą kompleksy niż HpDnaAIII-IVstrep (odpowiednio 58,7%, 65,1% oraz 27,0%). Zaobserwowano natomiast, że domena III zwiększa specyficzność oddziaływania DnaA-DNA. Białko HpDnaAI-II-IVstrep w 74,1% tworzy niespecyficzne kompleksy w przeciwieństwie do białek HpDnaAstrep i HpDnaAIII-IVstrep (odpowiednio 15,2% oraz 14,5%).

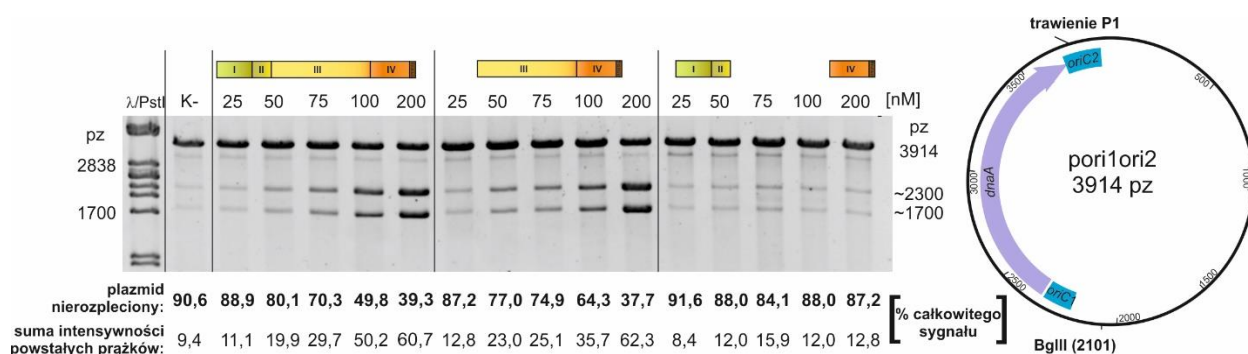
4.3.5 Analiza wpływu domen I-II i III na zdolność białka DnaA do rozplatania helisy DNA

Dotychczasowe wyniki prac nad charakterystyką regionu inicjacji replikacji oraz białka inicjatorowego DnaA *H. pylori* wykazały, że białko to, w przeciwieństwie do białka *E. coli* DnaA wymagającego oddziaływania z HU (Hwang and Kornberg 1992), nie wymaga udziału dodatkowych protein aby otworzyć helisę DNA (Donczew et al. 2012). W celu określenia roli

domen I-II oraz III w inicjacji replikacji chromosomu przeprowadzono szereg testów rozplatania regionu DUE przez różne warianty białka DnaA *H. pylori*.

Stałą ilość plazmidu *pori1ori2* (200ng, stężenie 5,4 nM) inkubowano ze wzrastającym stężeniem badanego białka (25 - 200 nM) (rozdział nr 3.7.1). Następnie plazmid traktowano enzymem nukleazą P1, który trawi jednoniciowe DNA. Oczyszczony plazmid trawiono enzymem BglIII. Otrzymane fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym, barwiono bromkiem etydydy i obrazowano systemem Gel Doc XR+ System (Biorad). W przypadku rozplecenia DNA przez białko DnaA obserwowano pojawianie się prążków o wielkości 2300 pz oraz 1700 pz, które powstawały w wyniku trawienia nukleazą P1 i BglIII. Gdy do rozplecenia nie dochodziło, enzym P1 nie trawił ssDNA, a plazmid ulegał linearyzacji na skutek trawienia BglIII, a na żelu obserwowano prążek o wielkości 3914 pz. Ponieważ plazmid *pori1ori2* zawiera region DUE, który jest niestabilny helikalnie, również w próbkach inkubowanych bez białka obserwowano prążki wytrawianych fragmentów DNA na skutek samoistnego rozplatania DNA. We wszystkich analizach rozplatania DNA uwzględniano zachodzące niespecyficzne rozplatanie helisy. Im silniejsze rozplatanie plazmidu przez białko, tym intensywniejsze prążki obserwowano.

Na rysunku nr 24 przedstawiono wyniki testu rozplatania plazmidu *pori1ori2* przez trzy warianty białka DnaA: DnaA pełnej długości, DnaA pozbawione N-końca oraz DnaA bez domeny III.



Rysunek 24 Wyniki analizy rozplatania regionu DUE przez warianty białka DnaA o różnym składzie domenowym. Poniżej każdej ścieżki umieszczono wyniki analizy densytometrycznej otrzymanych prążków przeprowadzonej programem Image Lab. Analiza densytometryczna uwzględniła:

plazmid nierozpleciony: procent całkowitego sygnału (sygnał otrzymany dla nałożonej na żel agarozowy ilości DNA) pochodzący od niestrawionego plazmidu *pori1ori2* (najwyższy prążek)

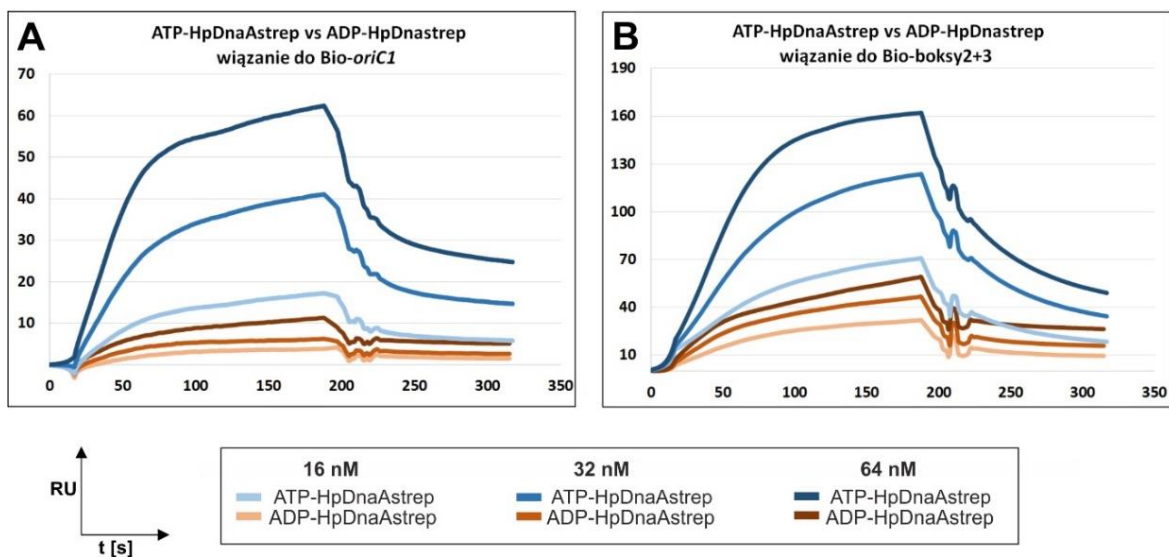
suma intensywności powstałych prążków: procent całego sygnału stanowiący sumę sygnałów pochodzących od prążków otrzymanych z trawienia plazmidu *pori1ori2*. K- próba bez białka DnaA, będąca kontrolą samoistnego rozplatania plazmidu.

Wraz ze wzrostem ilości białka HpDnaAstrep inkubowanego z *pori1ori2* zaobserwowano wzrost intensywności wytrawianych fragmentów DNA. Świadczy to o zdolności związanego białka HpDnaAstrep do utworzenia otwartego oczka, czyli rozplecenia helisy DNA w regionie DUE. Analizując intensywność prążków otrzymanych w wyniku trawienia kompleksów HpDnaAIII-IVstrep-*pori1ori2* zaobserwowano, że jest ona zbliżona do tych, otrzymywanych dla białka pełnej długości (dla kolejnych stężeń białek różnica w procencie nierozpleczonego plazmidu wynosi ok 2-4 punktów procentowych). Podobne nieznaczące różnice powtarzały się w kolejnych analizach. W przypadku białka HpDnaAI-II-IVstrep powstające prążki swoją intensywnością odpowiadają tym w kontroli negatywnej, czyli samoistnemu rozplataniu plazmidu w regionie niestabilnym helikalnie – dla kontroli negatywnej procent nierozpleczonego DNA wynosi 90,6%, dla białka HpDnaAI-II-IVstrep w najniższym stężeniu jest to 91,6%. Wartości dla pozostałych stężeń białka różnią się o ok 3 punkty procentowe i nie jest istotna biologicznie. Z dokonanych analiz można wnioskować, że to domena III odpowiedzialna jest za zdolność białka HpDnaAstrep do otwierania helisy DNA, ponieważ niezależnie od obecności natywnego N-końca białka DnaA dochodzi do rozplecenia DNA. Natomiast brak domeny III skutkuje zahamowaniem zdolności białka DnaA do rozplecenia DNA *in vitro*. Domena I nie jest niezbędna do rozplatania DNA przez białko DnaA *H. pylori in vitro*.

4.3.6 Wpływ oddziaływań białek DnaA – HobA na interakcje DnaA-DNA

4.3.6.1 Analiza wpływu oddziaływania białek HobA-DnaA na tworzenie kompleksów DnaA-DNA

Mikroskopię elektronową kompleksów nukleoproteinowych wykorzystano również do zbadania wpływu interakcji HobA – DnaA na zdolność wiązania DNA przez HpDnaAstrep. Oba białka w równomolowych ilościach inkubowano z plazmidem *pori1ori2*, a powstałe kompleksy analizowano tak jak opisano w rozdziale 3.7.3.



Rysunek 27 Analiza oddziaływania białka DnaA z DNA w zależności od związanego nukleotydu ATP lub ADP. Reprezentatywne sensogramy analizy SPR przedstawiające wpływ interakcji ATP-HpDnaAstrep i ADP-HpDnaAstrep na oddziaływanie DnaA z regionami Bio-oriC1 oraz Bio-boksy2+3.

Tabela 15 Zestawienie wartości RU_{max} analizy SPR oddziaływania białek ATP-HpDnaAstrep i ADP-HpDnaAstrep z DNA.

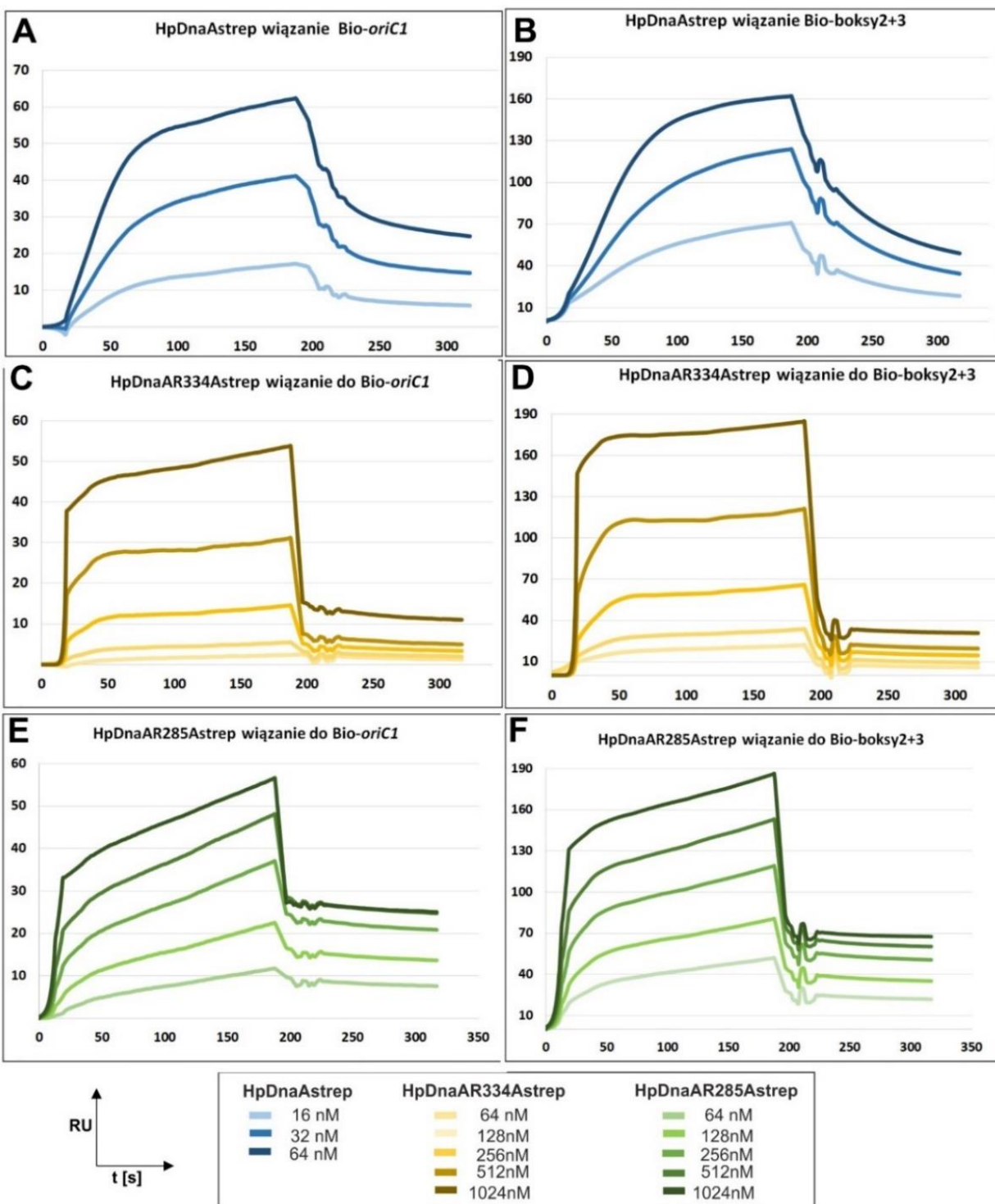
Stężenie [nM]	RU_{max}	RU_{max}	RU_{max}	RU_{max}
	ATP-HpDnaAstrep	ADP-HpDnaAstrep	ATP-HpDnaAstrep	ADP-HpDnaAstrep
	Bio-oriC1		Bio-boksy 2+3	
16	17,2	5,1	70,8	31,8
32	41,2	7,1	123,7	46,7
64	62,3	11,3	162,1	58,8

Analiza sensogramów otrzymanych dla białka HpDnaAstrep inkubowanego z ATP lub ADP wykazała, że w przypadku inkubacji DnaA z ATP ok. 5 razy więcej cząsteczek białka oddziałuje z Bio-oriC1 i ok 4 razy więcej z Bio-boksy2+3, we wszystkich analizowanych stężeniach białka. Różnice w oddziaływaniu z DNA z białkiem HpDnaAstrep pokazuje, że białko DnaA związane z ATP wykazuje większe powinowactwo do rozpoznawanego DNA. Świadczy to o tym, że aktywność białka DnaA może być regulowana na drodze zależnej od ATP.

4.4.2 Analiza SPR oddziaływania HpDnaAR334Astrep i HpDnaAR285Astrep z DNA

Powierzchniowy rezonans plazmonowy wykorzystano również do zbadania wpływu mutacji aminokwasów odpowiedzialnych za oddziaływanie z ATP na zdolność wiązania białka DnaA

z DNA. Wyniki otrzymane dla białek HpDnaAR285Astrep oraz HpDnaAR334Astrep porównano z wynikami oddziaływań białka dzikiego typu.



Rysunek 28 Analiza oddziaływania wariantów białka DnaA z DNA. Reprezentatywne sensogramy analizy SPR przedstawiające oddziaływanie białek HpDnaAR334Astrep o HpDnaAR285Astrep z regionami Bio-oriC1 oraz Bio-boksy2+3. Prezentowane sensogramy zostały pomniejszone o wartości otrzymane dla oddziaływań niespecyficznych pomiędzy białkami a regionami bez boksów DnaA - Bio-Hp-0180 oraz Bio-bez_boksów

W przypadku białek HpDnaAstrep, HpDnaAR285Astrep i HpDnaAR334Astrep, porównanie ze sobą oddziaływania DnaA-DNA, nie wymagało przeliczenia mas tak jak przy białkach o zmienionych składach domenowych (rozdział 4.3.2). Porównując ze sobą otrzymane sensogramy, zaobserwowano, że białka HpDnaAR285Astrep oraz HpDnaAR334Astrep oddziaływały z DNA podobnie (zarówno z Bio-*oriC1* i z Bio-boksy2+3 wykazują zbliżone wartości RU_{max}), ale znacząco słabszej niż białko HpDnaAstrep (należy zauważyć różne zakresy stężeń stosowanych dla zmutowanych i dzikiego). Dla białek HpDnaAR285Astrep oraz HpDnaAR334Astrep najwyższe RU otrzymano dla najwyższych analizowanych stężeń – dla stężenia białka 1024nM w obu przypadkach RU_{max} wynosił około 55 RU dla Bio-*oriC1* oraz ok 190 RU dla Bio-boksy2+3. W przypadku białka HpDnaAstrep takie wyniki otrzymano dla stężenia 64 nM, czyli 16 razy mniejszego niż dla białek zmutowanych w obrębie motywu AAA+. Mimo podobnej siły wiązania białek HpDnaAR334Astrep i HpDnaAR285Astrep różnią się one stabilnością kompleksów – oddziaływania pomiędzy HpDnaAR285Astrep a DNA są trwalsze niż te między HpDnaAR334Astrep a DNA.

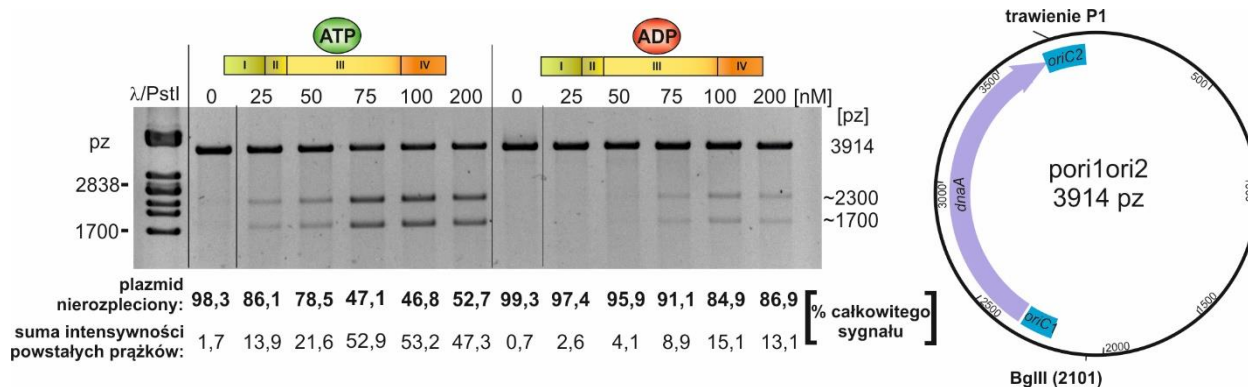
4.4.3 Analiza mikroskopii elektronowej wpływu mutacji w obrębie motywu AAA+ na tworzenie kompleksów nukleoproteinowych

Aby zbadać wpływ oddziaływań zależnych od ATP na tworzenie kompleksów DnaA z dwuczłonowym regionem *oriC* przeprowadzono analizę mikroskopową kompleksów nukleoproteinowych tworzonych przez warianty HpDnaAstrep zmutowane w obrębie motywu AAA+ (HpDnaAR285Astrep i HpDnaAR334Astrep) oraz HpDnaAstrep w obecności ADP. Na rysunku nr 29 przedstawiono wyniki analizy statystycznej badanych kompleksów.

jednakże z powodu zaburzenia oddziaływań między cząsteczkami DnaA nie można zaobserwować dostatecznie dużych kompleksów nukleoproteinowych. Z przeprowadzonych analiz można wnioskować, że interakcja białka DnaA z ATP jest istotna zarówno dla wiązania białka z DNA jak i dla specyficzności tych oddziaływań. Białko DnaA związane z ADP jest mniej aktywne – rzadziej tworzy kompleksy, które częściej są niespecyficzne. Podobne oddziaływania charakteryzują białko HpDnaAR334Astrep. Oddziaływania zachodzące za pośrednictwem palca argininowego odpowiadają za oligomeryzację *H. pylori* DnaA, co jest widoczne jako utworzenie widocznych kompleksów nukleoproteinowych przez białko dzikiego typu. Takich kompleksów nie tworzy zmutowany wariant HpDnaAR285Astrep.

4.4.4 Analiza wpływu ATP na rozplatanie DNA przez białko DnaA

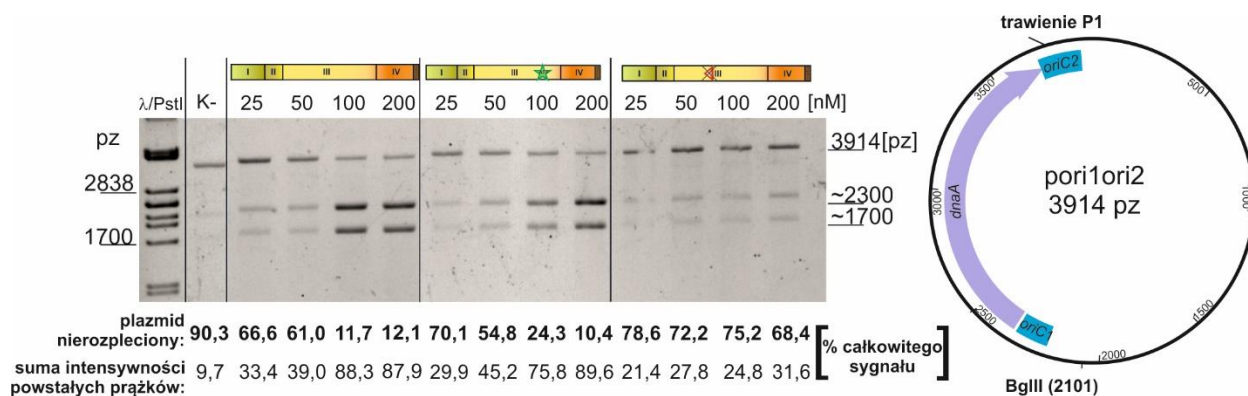
Dotychczas nie ustalono jak oddziaływanie białka DnaA *H. pylori* z ATP i z ADP wpływa na rozplatanie helisy DNA przez białko. W celu określenia różnic w aktywności rozplatania w zależności od związanego nukleotydu przeprowadzono testy rozplatania DNA przez zmutowane w domenie III wersje białka DnaA *H. pylori* oraz białko typu dzikiego w obecności ATP i ADP (rysunki nr 30 i 31).



Rysunek 30 Wyniki analizy rozplatania plazmidu por1ori2 przez białko HpDnaAstrep w zależności od obecności ATP i ADP. Opis analizy densytometrycznej jak przy rysunku nr 24

Porównując intensywność prążków (rysunek nr 30) odpowiadających nierozplecionemu plazmidowi zaobserwowano zahamowanie rozplatania DNA przez białko ADP-HpDnaAstrep w stosunku do białka ATP-HpDnaAstrep. Odsetek nierozplecionych cząsteczek plazmidów w przypadku ADP-HpDnaAstrep wynosił kolejno 97,4%, 95,9%, 91,1%, 84,9% oraz 86,9%, a dla białka ATP-HpDnaAstrep wyniósł 86,1%, 78,5%, 47,1%, 46,8% i 52,7%. Analiza wykazała, że białko HpDnaAstrep jest aktywne w formie związanej z ATP, natomiast wiązanie z ADP

powoduje zahamowanie aktywności białka. Zaznaczyć należy, że białko HpDnaAstrep jest oczyszczane w warunkach natywnych i być może niewielka frakcja cząsteczek DnaA po zakończeniu procedury wciąż wiąże ATP, co może wpływać na wiązanie ADP przez HpDnaAstrep.



Rysunek 31 Wyniki analizy rozplatania plazmidu *pori1ori2* przez warianty białka DnaA zmutowanych w obrębie motywu AAA+. Opis analizy densytometrycznej jak przy rysunku nr 24

Intensywność prążków DNA otrzymanych w przypadku białka HpDnaAR334Astrep nieznacznie różni się od wyniku rozplatania plazmidu przez HpDnaAstrep. Wraz ze wzrostem stężenia białko niezmutowane rozplatało DNA w odsetku: 33,4%, 39,0% 88,3% i 87,9%, o kilka punktów procentowych wydajniej od zmutowanego białka HpDnaAR334Astrep w analogicznych stężeniach odpowiednio 29,9%, 45,2%, 75,8% i 89,6%, przy czym dla najwyższego stężenia różnica w rozplataniu była najmniejsza. Obserwacja ta pozwala wnioskować, że białko niezdolne do hydrolizy ATP wykazuje zbliżoną aktywność rozplatania DNA do białka dzikiego typu. Zdecydowaną różnicę w zdolności rozplatania zaobserwowano w przypadku HpDnaAR285Astrep. Białko z nieaktywnym palcem argininowym wykazuje bardzo niewielką zdolność do otwierania helisy. HpDnaAR285Astrep przy stężeniu 200nM rozplata DNA w stopniu podobnym do HpDnaAstrep w stężeniu 25nM. Analiza rozplatania wskazuje, że reszta R261 (R285 *E. coli*) białka DnaA jest istotna dla rozplatania DNA przez DnaA, prawdopodobnie z powodu oddziaływania DnaA-DnaA (oligomeryzacji białka DnaA) zachodzącego z udziałem ATP, istotnego dla tworzenia oczka replikacyjnego przez białko DnaA *H. pylori*.

4.5 Analiza wpływu syntezy wariantów białek DnaA zmutowanych w obrębie motywu AAA+ *Helicobacter pylori*

4.5.1 Przygotowanie szczepów *H. pylori* syntezujących zmutowane warianty białka DnaA

Delecja genu *dnaA* jest letalna dla *Helicobacter pylori* (Zawilak et al. 2003); podobnie letalna może być mutacja aminokwasów istotnych dla funkcji DnaA. Mutageneza *H. pylori* następuje z powodu trudności z powodu krótkich ramion homologii wykorzystywanych przez bakterie do rekombinacji homologicznej, a tym samym ich dużą zdolność do ominięcia mutacji podczas rekombinacji homologicznej. Skutkuje to wprowadzeniem kasety oporności bez wprowadzenia mutacji i powstaniem licznych fałszywie pozytywnych klonów, czyli klonów opornych na antybiotyki selekcyjne, ale niezmutowanych w zaplanowanym miejscu. Dlatego do analizy wpływu mutacji *dnaAK178I*, *dnaAR285A* oraz *dnaAR334A* na wzrost *H. pylori* wybrano dwuetapową strategię mutagenezy polegającą na wprowadzeniu zmutowanego genu *dnaA* na plazmidzie z późniejszym usunięciem dzikiego genu *dnaA* z natywnego locus (Zawilak-Pawlik et al. 2007). Zaletą tej strategii była też możliwość indukowanej ekspresji genu, a zastosowanie dwóch dostępnych plazmidów ekspresyjnych, pILL2150strep i pILL2157strep, pochodnych plazmidów pILL2150 i pILL2157, umożliwiło syntezowanie białek na dwóch poziomach, odpowiednio: niskim, porównywalnym z natywnym, oraz wysokim, wyższym od natywnego (Boneca et al. 2008, Zawilak-Pawlik, dane nieopublikowane, załącznik nr 7).

Przygotowano plazmidy ekspresyjne, zawierające zmutowane geny *dnaA*, kodujące białka DnaA zmutowane w obrębie motywu AAA+ oraz białko dzikiego typu z metką Strep-Tag na C-końcu białka DnaA (rozdział 3.6.2.1, tabela nr 5). W pierwszym etapie mutagenezy do komórek *H. pylori* szczepu N6 wprowadzono przygotowane plazmidy serii pILL2150strep oraz pILL2157strep. Jako kontrolę, czy obecność plazmidu nie zakłóca wzrostu bakterii, przygotowano szczepy N6 z wprowadzonymi pustymi plazmidami pILL2150strep oraz pILL2157strep (tabela nr 16). Do transformacji (rozdział 3.4.3.2.1) wykorzystano naturalną zdolność *H. pylori* do przyjmowania obcego DNA (ang. *natural uptake*). Komórki transformowano plazmidami izolowanymi z *E. coli* MC1061.

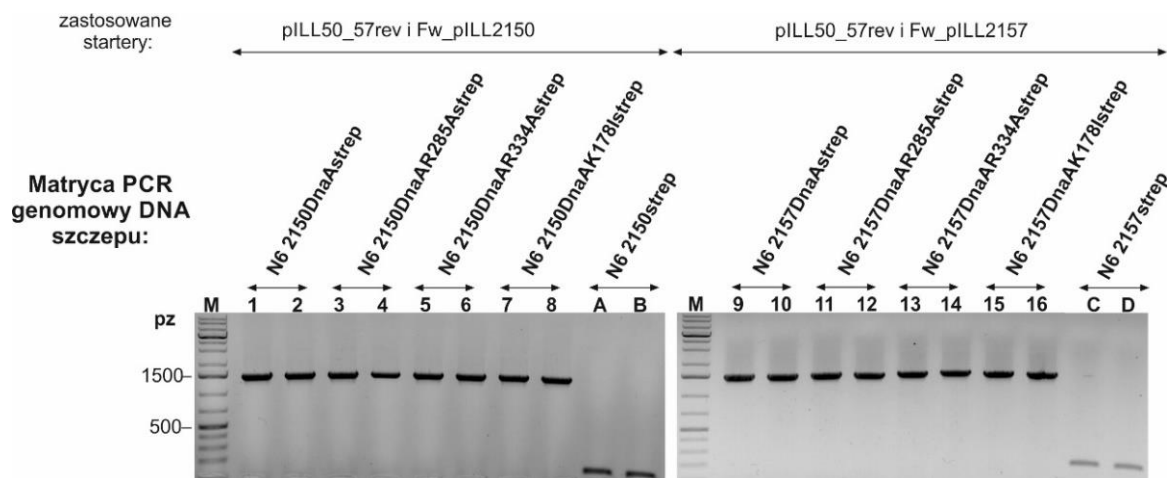
Tabela 16 Plazmidy użyte do transformacji szczepu N6 oraz powstałe szczepy *H. pylori*.

NAZWA PLAZMIDU ZASTOSOWANEGO DO TRANSFORMACJI	NAZWA SZCZEPU POWSTAŁEGO PO TRANSFORMACJI
pILL2150strep	N6 2150strep
pILL2150HpDnaAstrep	N6 2150DnaAstrep
pILL2150HpDnaAK178Istrep	N6 2150DnaAK178Istrep
pILL2150HpDnaAR285Astrep	N6 2150DnaAR285Astrep
pILL2150HpDnaAR334Astrep	N6 2150DnaAR334Astrep
pILL2157strep	N6 2157strep
pILL2157HpDnaAstrep	N6 2157DnaAstrep
pILL2157HpDnaAK178Istrep	N6 2157DnaAK178Istrep
pILL2157HpDnaAR285Astrep	N6 2157DnaAR285Astrep
pILL2157HpDnaAR334Astrep	N6 2157DnaAR334Astrep

Po transformacji *H. pylori* plazmidami niosącymi dodatkowe kopie genu *dnaA* i wektorami kontrolnymi uzyskano kolonie odporne na chloramfenikol. Sprawdzone, czy wprowadzono do komórek odpowiednie wersje genu. W tym celu z poszczególnych kolonii izolowano genomowy DNA, przeprowadzono reakcję PCR ze starterami: pILL50_57rev i Fw_pILL2150 dla matryc pochodnych pILL2150strep, pILL50_57rev i Fw_pILL2157 dla matryc pochodnych pILL2157strep (rysunek nr 32). Uzyskano produkty PCR o spodziewanych wielkościach zgodnie z danymi w tabeli nr 17.

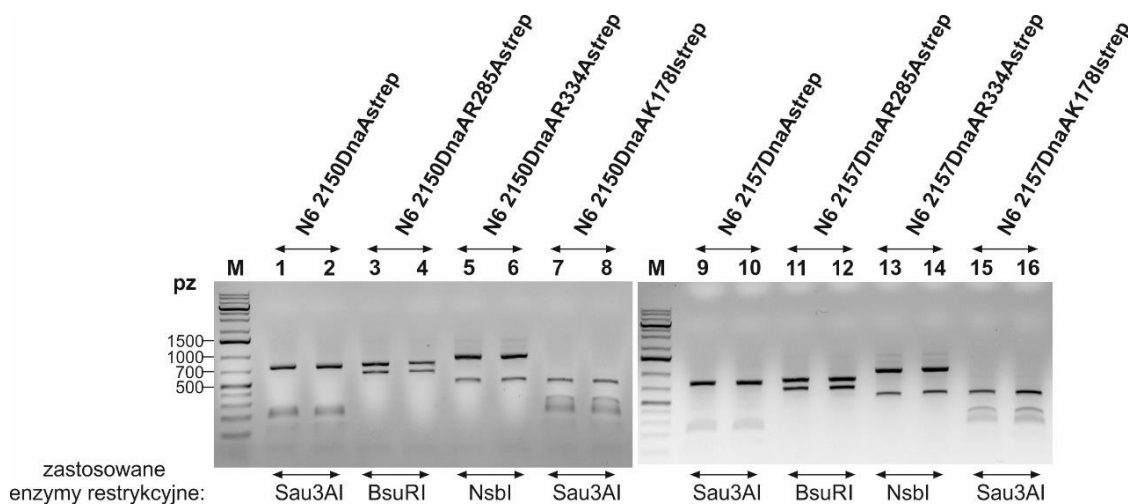
Tabela 17 Oczekiwane wielkości produktów reakcji PCR przeprowadzanych w celu weryfikacji poprawności otrzymanych szczepów i przebiegu procesu delekcji genu *dnaA* z chromosomu.

ZASTOSOWANE STARTERY	MATRYCA GENOMOWEGO DNA UŻYTEGO DO REAKCJI PCR	SPODZIEWANA WIELKOŚĆ PRODUKTU PCR
pILL50_57rev Fw_pILL2150	N6 2150DnaAstrep N6 2150DnaAK178Istrep N6 2150DnaAR285Astrep N6 2150DnaAR334Astrep	1486 pz
	N6 2150strep	121 pz
pILL50_57rev Fw_pILL2157	N6 2157DnaAstrep N6 2157DnaAK178Istrep N6 2157DnaAR285Astrep N6 2157DnaAR334Astrep	1499 pz
	N6 2157strep	134 pz
Hp1529rev_dstop_XhoI HP1529BamHI	Wszystkie matryce	1371 pz
1527_Rv 1530_Fw	Wszystkie matryce	Jeżeli nie zaszła delekcja <i>dnaA</i> z locus na chromosomie: 2282 pz
		Jeżeli zaszła delekcja <i>dnaA</i> z locus na chromosomie: 1679 pz



Rysunek 32 Wyniki reakcji PCR sprawdzających obecność wprowadzanych plazmidów serii pILL2150strep oraz pILL2157strep w komórkach *H. pylori*. Nad zdjęciem żelu zaznaczono pary starterów wykorzystane do powielenia fragmentu DNA. M - wzorec mas DNA GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, liczby lub litery nad ścieżkami żelu oznaczają niezależne klony.

Produkty reakcji PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi (rysunek nr 33), które różnie trawią gen *dnaA* w zależności od wprowadzonej mutacji (rysunek nr 14).

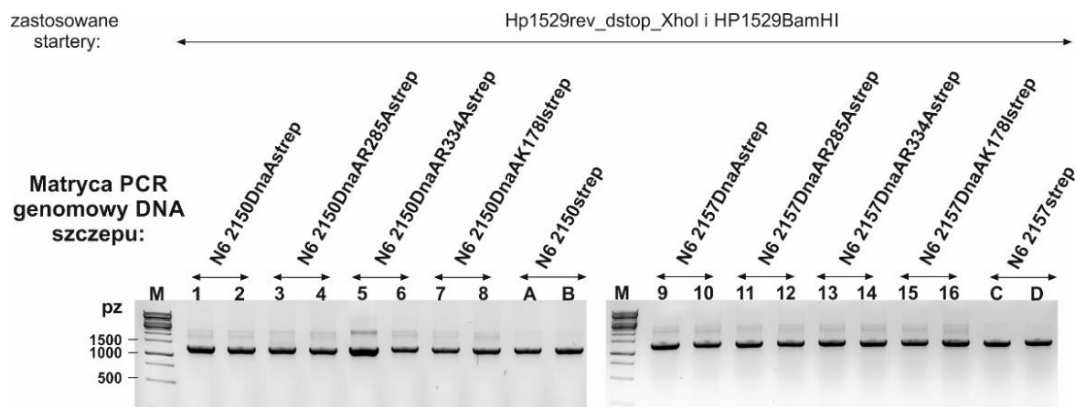


Rysunek 33 Wyniki trawienia produktów PCR (produkty reakcji przedstawiono na rysunku nr 32). Poniżej zdjęcia żelu zaznaczono zastosowane enzymy restrykcyjne. M - wzorec mas DNA GeneRuler 1kb Plus Ladder.

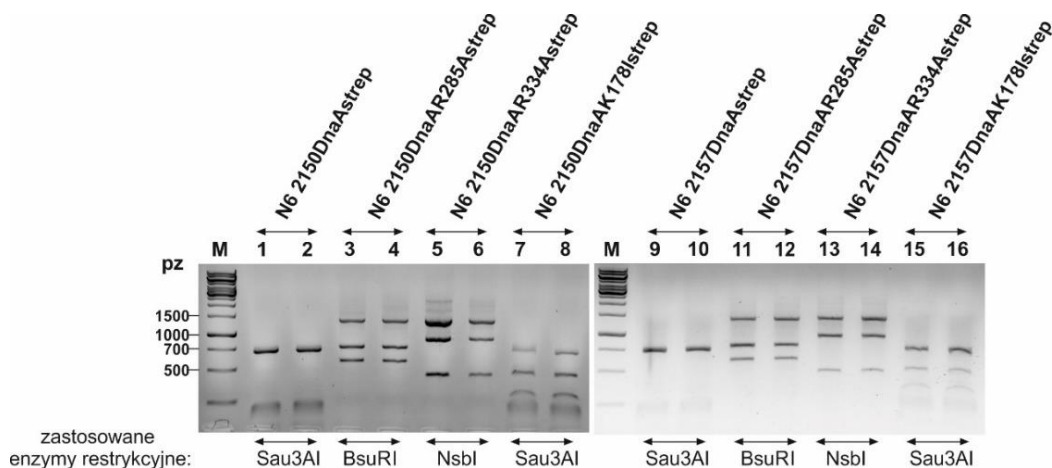
Analiza wielkości otrzymanych prążków potwierdziła obecność przygotowanych plazmidów oraz otrzymanie zmutowanych szczepów N6 zgodnie z tabelą nr 16.

Dodatkowo sprawdzono, czy w komórkach uzyskanych szczepów znajdują się dwie wersje genu *dnaA*: kodowany na chromosomie oraz na plazmidzie. W tym celu na wyizolowanym genomowym DNA przeprowadzono reakcję PCR ze starterami Hp1529rev_dstop_XhoI oraz HP1529BamHI hybrydującymi odpowiednio do 3' i 5' końca genu *dnaA*, niezależnie, od tego

czy gen znajdował się na chromosomie czy plazmidzie (rysunek nr 34). Następnie produkty PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi różniącymi zmodyfikowane wersje genu *dnaA* (rysunek nr 35).



Rysunek 34 Wyniki reakcji PCR powielających wszystkie kopie genu *dnaA* obecne na chromosomie oraz wprowadzonym plazmidzie. Nad zdjęciem żelu zaznaczono pary starterów wykorzystane do powielenia fragmentu DNA. M - wzorzec mas DNA GeneRuler 1kb DNA Ladder.



Rysunek 35 Wyniki trawienia produktów reakcji PCR (przedstawionych na rysunku nr 34). Pod zdjęciem żelu zaznaczono zastosowane enzymy restrykcyjne. M - wzorzec mas DNA GeneRuler 1kb DNA Ladder.

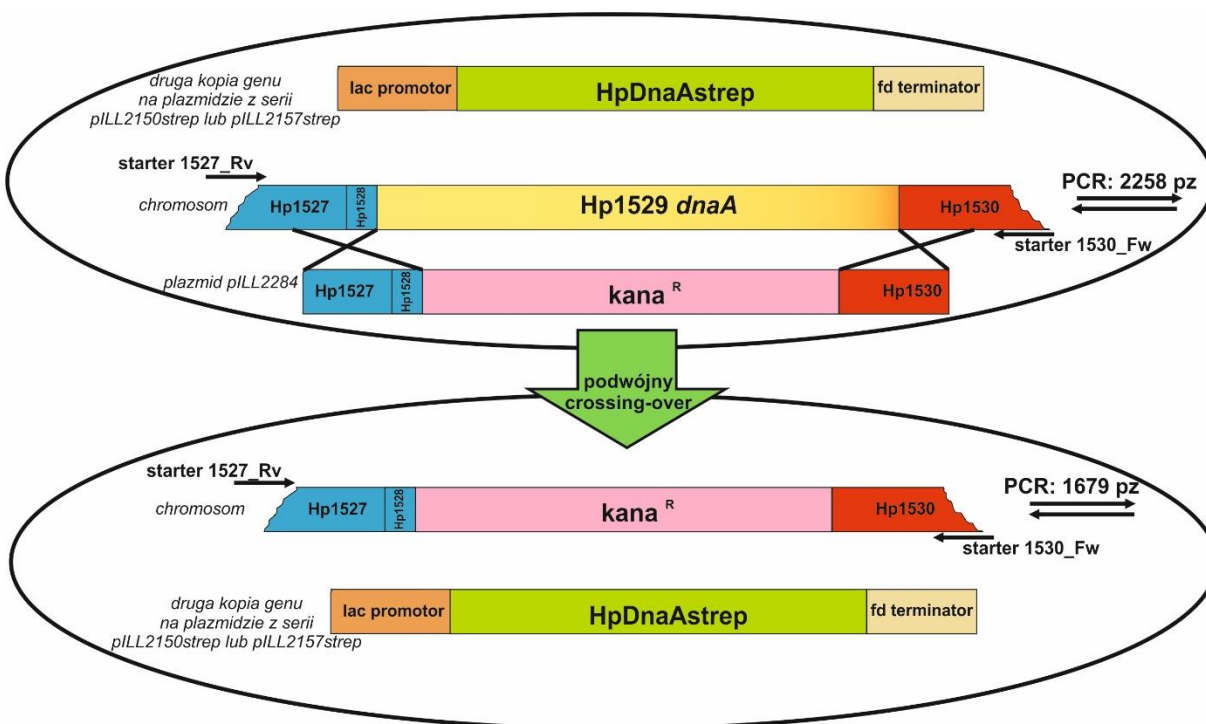
W reakcji PCR uzyskano fragmenty DNA o spodziewanej wielkości 1371 pz. Analiza wielkości prążków uzyskanych po trawieniu produktów PCR wykazała, że otrzymano mieszaninę produktów. Oprócz charakterystycznych dla analizy restrykcyjnej prążków uzyskiwanych w przypadku trawienia powielonego genu zmutowanego, widać sygnały odpowiadające wielkością niestrawionemu dzikiemu genowi *dnaA* (dzika wersja genu nie posiada miejsc trawienia BsuRI i NsbI oraz charakteryzuje się inną lokalizacją miejsc Sau3AI).

Uzyskane szczepy *H. pylori* wykorzystano w dalszych etapach analizy, w których podjęto próbę usunięcia genu *dnaA* z dzikiego locus na chromosomie (rozdział nr 4.1.2). Zastosowano metodę

rekombinacji homologicznej typu podwójnego crossing over, wymieniając gen *dnaA* na kasetę oporności na kanamycynę, przy równoczesnej syntezie białka DnaA na matrycy genu *dnaA* wprowadzonego na plazmidach (rysunek nr 36). W tym celu do już zmodyfikowanych szczepów wprowadzono wektor samobójczy pILL2284 (tabela nr 18)

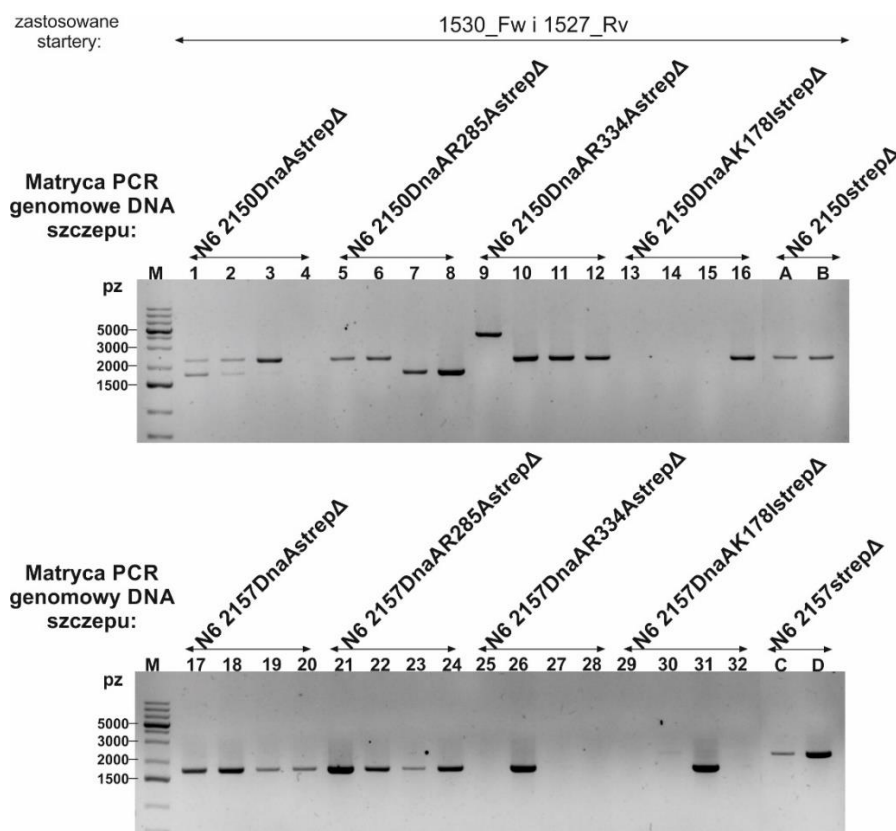
Tabela 18 Nazwy szczepów N6 *H. pylori* otrzymanych po próbie delecji genu *dnaA*

NAZWA SZCZEPU PRZED DELECJĄ GENU <i>dnaA</i>	NAZWA SZCZEPU PO DELECJI GENU <i>dnaA</i>
N6 2150strep	N6 2150strepΔ
N6 2150DnaAstrep	N6 2150DnaAstrepΔ
N6 2150DnaAK178Istrep	N6 2150DnaAK178IstrepΔ
N6 2150DnaAR285Astrep	N6 2150DnaAR285AstrepΔ
N6 2150DnaAR334Astrep	N6 2150DnaAR334AstrepΔ
N6 2157strep	N6 2157strepΔ
N6 2157DnaAstrep	N6 2157DnaAstrepΔ
N6 2157DnaAK178Istrep	N6 2157DnaAK178IstrepΔ
N6 2157DnaAR285Astrep	N6 2157DnaAR285AstrepΔ
N6 2157DnaAR334Astrep	N6 2157DnaAR334AstrepΔ



Rysunek 36 Schemat wymiany genu *dnaA* na chromosomie na kasetę kanamycynową metodą podwójnego crossing over. Na schemacie oprócz układu genów na chromosomie oraz plasmidzie pILL2284, zaznaczono startery stosowane do sprawdzenia wydajności wymiany. Na schemacie zaznaczono miejsca hybrydyzacji starterów stosowanych do kontroli delecji genu *dnaA* z dzikiego locus.

Z otrzymanych transformantów (tabela nr 18) opornych na kanamycynę i chloramfenikol izolowano genomowy DNA i w reakcji PCR, z zastosowaniem starterów 1527_Rv oraz 1530_Fw sprawdzano, czy zaszła wymiana genów w obrębie dzikiego locus *dnaA* na chromosomie. Wymianę można stwierdzić, gdy w wyniku reakcji PCR powstaje produkt PCR o wielkości 1679 pz zamiast produktu wielkości 2258 pz powstającego na matrycy dzikiego locus *dnaA*. Różnica w wielkości produktu PCR wynika z różnic wielkości genu *dnaA* (1371 pz) i kasety oporności na kanamycynę (795 pz).

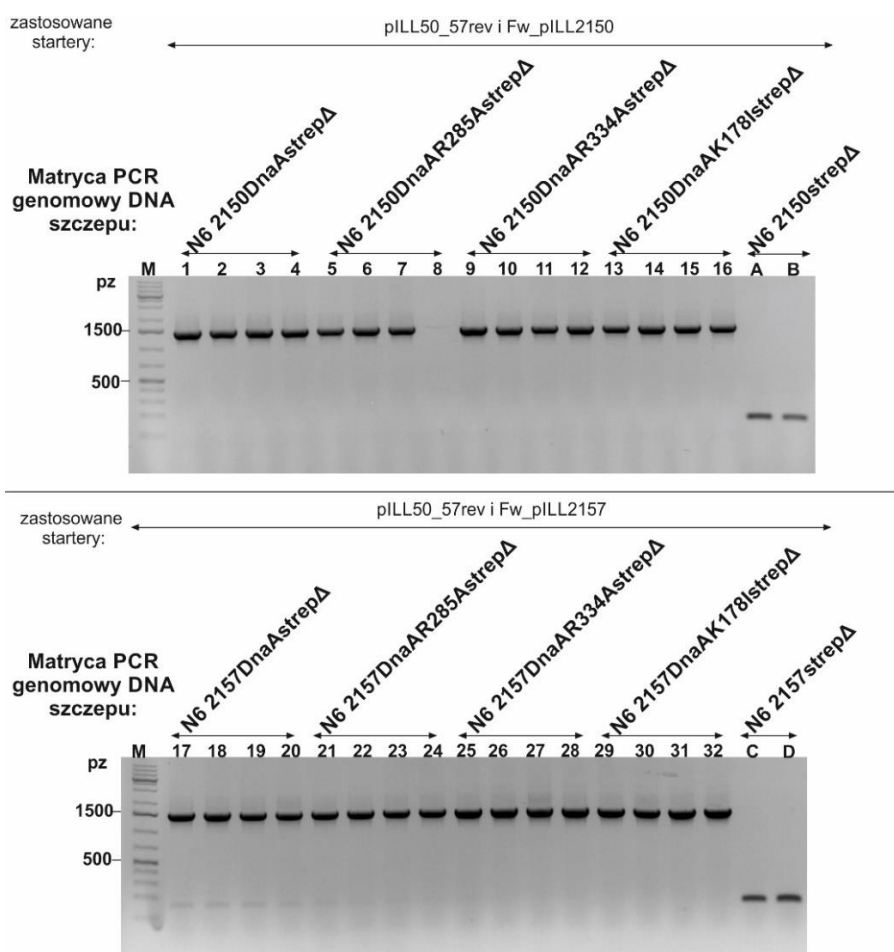


Rysunek 37 Wyniki reakcji PCR sprawdzającej, czy w dzikim locus na chromosomie zaszła wymiana genu *dnaA* na kasetę kanamycynową. Nad zdjęciami żeli zaznaczono parę starterów wykorzystaną do powielenia fragmentu DNA. M - wzorzec mas DNA GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, liczby lub litery nad ścieżkami żelu oznaczają niezależne klon.

Analiza wielkości otrzymanych produktów PCR (rysunek nr 37) wykazała, że dziką wersję genu *dnaA* z chromosomu udało się usunąć w niektórych klonach szczepów N6 2150DnaAR285Astrep (klony 7,8) N6 2157DnaAstrep (klony 17, 18, 19, 20), N6 2157DnaAR285Astrep (klony 21, 22, 23, 24), N6 2157DnaAR334Astrep (klon 26) N6 2157DnaAK178Istrep (klon 31). W przypadku szczepu N6 2150DnaAstrep otrzymano mieszaną populację bakterii, z których część przeprowadziła proces podwójnego *crossing over* – otrzymano produkty PCR wielkości 2258 pz (odpowiadające

obecności genu *dnaA* w dzikim locus) oraz 1679 pz (odpowiadające obecności kasety kanamycynowej w locus *dnaA* na chromosomie). Ponadto, dla kilku klonów w reakcji PCR nie otrzymano produktów - być może zbyt duży insert znajdował się pomiędzy stosowanymi starterami. Może to wskazywać na zajście pojedynczego *crossing over*, czyli wbudowaniu w dzikie locus całego plazmidu pILL2284, który miał usunąć dziką wersję genu.

Na matrycy wyizolowanego genomowego DNA z każdego klonu przeprowadzono również reakcję PCR mającą na celu potwierdzenie obecności wprowadzonych wcześniej plazmidów serii pILL2150strep i pILL2157strep ze zmodyfikowanymi wersjami genu *dnaA* oraz kontrolnymi pustymi wektorami (rysunek nr 38).

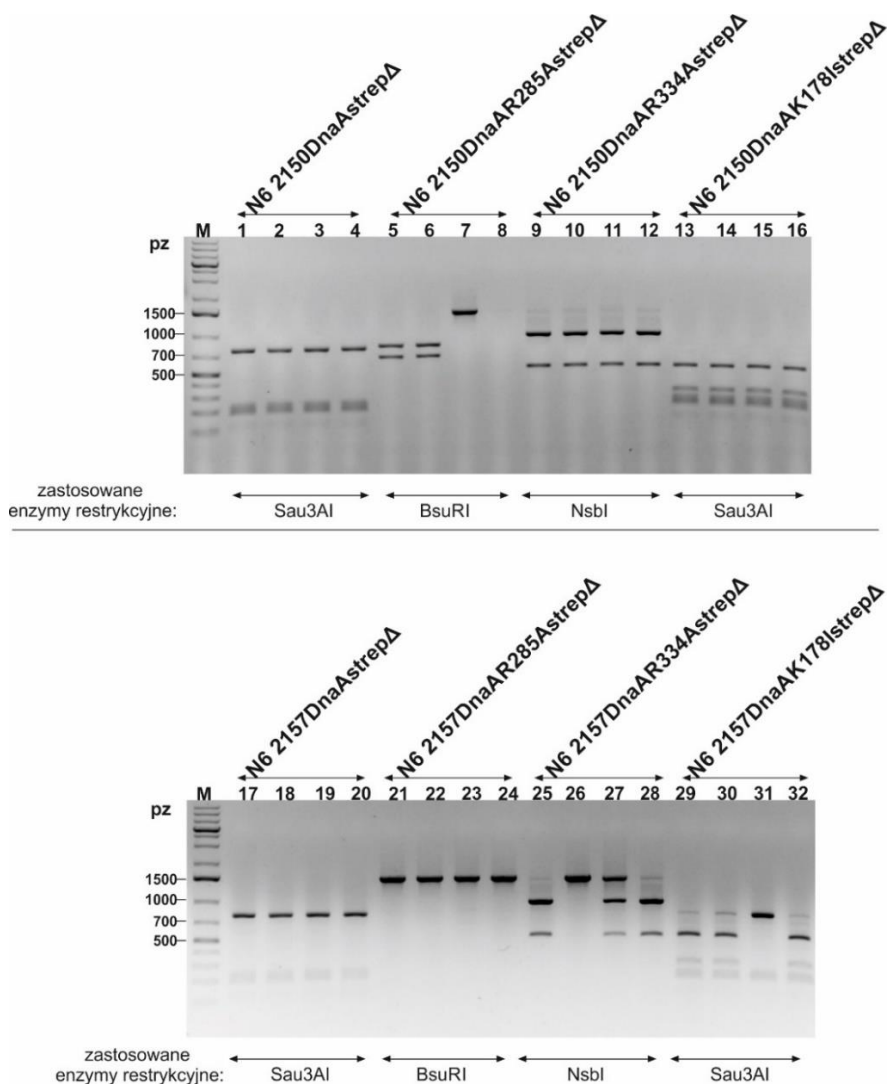


Rysunek 38 Wyniki reakcji PCR sprawdzających obecność wprowadzonych plazmidów serii pILL2150strep oraz pILL2157strep w transformantach po próbie delekcji genu *dnaA* z dzikiego locus na chromosomie. Nad zdjęciem żelu zaznaczono pary starterów wykorzystane do powielenia fragmentu DNA. M - wzorzec mas DNA GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, liczby lub litery nad ścieżkami żelu oznaczają niezależne klony

Z analizy produktów PCR wynika, że prawie we wszystkich klonach znajdują się wektory serii pILL2150strep lub pILL2157strep, ponieważ uzyskano produkty o spodziewanych masach

cząsteczkowych (tabela nr 17). Na matrycy genomowego DNA wyizolowanego z klonu nr 8 szczepu N6 2150DnaAR285Astrep nie uzyskano produktu PCR stosując startery pILL50_57rev i Fw_pILL2150. Reakcję PCR na matrycy genomowego DNA klonu nr 8 powtórzono kilkakrotnie, za każdym razem nie uzyskując produktu PCR. Prawdopodobnie wersja genu *dnaA* kodowana przez plazmid pILL2150DnaAR285Astrep uległa trudnej do określenia modyfikacji (np. wbudowaniu w nieznane miejsce na chromosomie) uniemożliwiającej otrzymanie produktu PCR z zastosowaniem starterów pILL50_57rev i Fw_pILL2150.

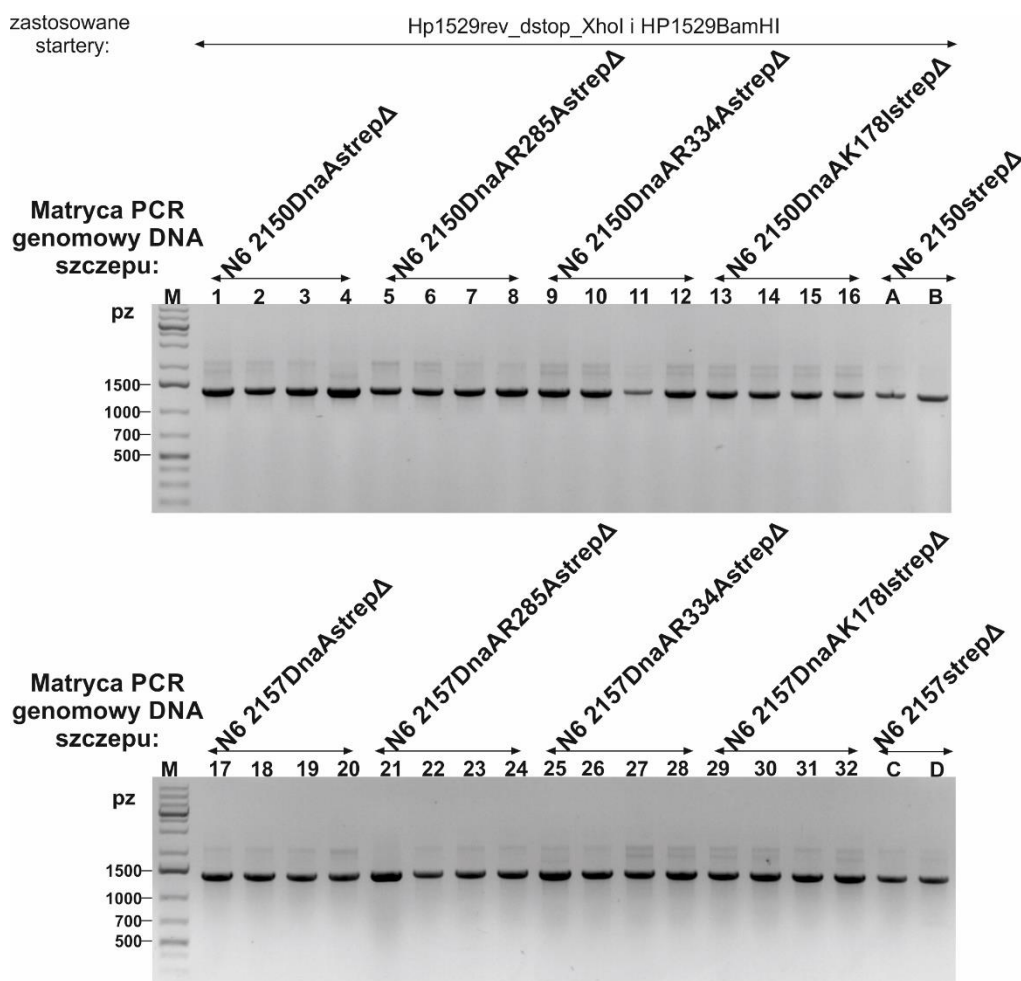
Trawiąc produkty reakcji PCR uzyskane starterami pILL50_57rev i Fw_pILL2150/Fw_pILL2157 zweryfikowano, czy wprowadzone wektory posiadają odpowiednie wersje genu *dnaA* (rysunek nr 39).



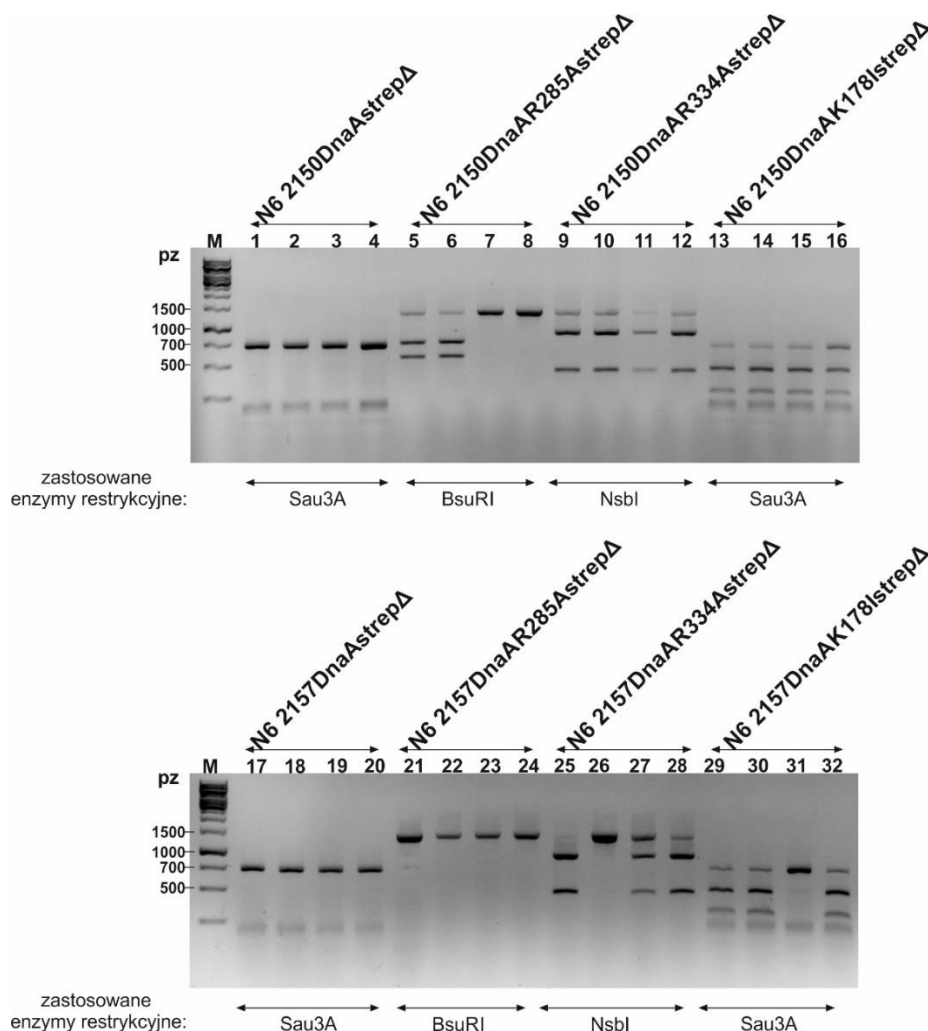
Rysunek 39 Wyniki trawień restrykcyjnych produktów reakcji PCR (rysunek nr 38) sprawdzających poprawność wprowadzonych plazmidów serii pILL2150strep oraz pILL2157strep w transformantach po próbie delekcji genu *dnaA* z dzikiego locus na chromosomie. M - wzorzec mas DNA GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder

Analiza trawień restrykcyjnych wykazała, że szczepy N6 2150DnaAR285Astrep (klon 7), N6 2157DnaAR285Astrep (klony 21, 22, 23, 24), N6 2157DnaAR334A (klony 26, 27) oraz N6 2157DnaAK178Istrep (klon 31) zawierają dzikie wersje genu *dnaA*. Prawdopodobnie doszło w tych klonach do wymiany wariantu zmutowanego genu *dnaA* na wersję dziką genu, bądź doszło do naprawy zmodyfikowanej wersji genu.

Następnie, podobnie jak przed próbą delekcji genu *dnaA* wektorem samobójczym (strona nr 94), po delekcji genu *dnaA*, sprawdzono czy w komórkach znajdują się dwie wersje genu *dnaA*. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR ze starterami Hp1529rev_dstop_XhoI oraz HP1529BamHI, a otrzymane produkty strawiono odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (rysunki nr 40 i 41).



Rysunek 40 Wyniki reakcji PCR powielających wszystkie kopie genu *dnaA* obecne na chromosomie oraz wprowadzonym plazmidzie w transformantach po próbie delekcji genu *dnaA* z dzikiego locus na chromosomie. Nad zdjęciami żeli zaznaczono parę starterów wykorzystaną do powielenia fragmentu DNA. M- wzorec mas DNA GeneRuler 1kb DNA Ladder.



Rysunek 41 Wyniki trawień restrykcyjnych produktów reakcji PCR przedstawionych na rysunku nr 40. M - wzorec mas DNA GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Z analizy restrykcyjnej oraz wcześniejszych wyników poszczególnych reakcji PCR wynika, że otrzymano tylko jeden szczep, który zamiast genu *dnaA* w dzikim locus chromosomalnym miałby kasetę oporności na kanamycynę i syntezował białko DnaA zmutowane w obrębie motywu AAA⁺ z genu wprowadzonego na plazmidzie pILL2150strep lub pILL2157strep. Świadczy o tym obecność prążków DNA odpowiadających wielkością produktom PCR dzikiego genu *dnaA*:

- Szczepy z rekombinowanym genem *dnaAstrep* (N6 pILL2150DnaAstrep i N6 pILL2157DnaAstrep): analizą restrykcyjną nie można rozróżnić genu rekombinowanego od natywnego. Wyniki reakcji PCR z zastosowaniem starterów na chromosomalne locus *dnaA* wykazały, że dla klonów 1-3 (seria pILL2150strep) otrzymano mieszaną populację bakterii, w której część miała usunięty gen *dnaA* z natywnego locus, a część nie uległa

rekombinacji (rysunek nr 37). W klonach 17-20 (seria pILL2157strep) zaszła wymiana genu *dnaA* na kasetę kanamycynową.

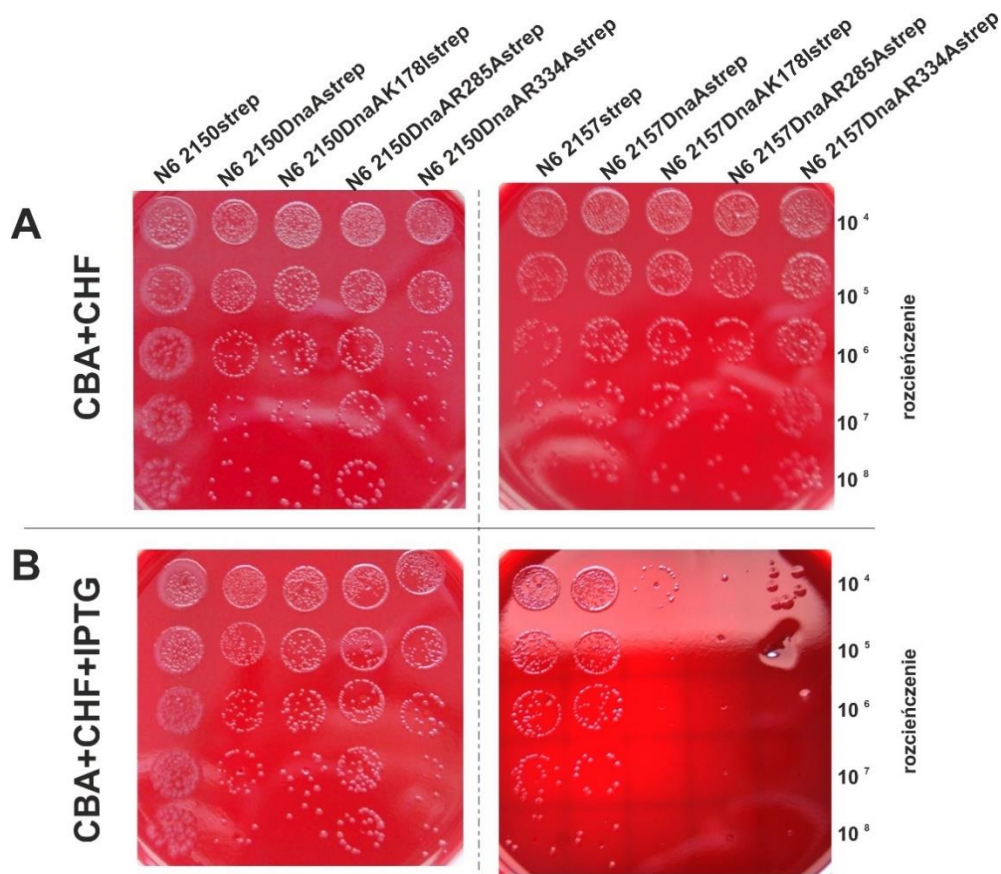
- Szczepy z mutacją R285A (N6 pILL2150DnaAR285Astrep i N6 pILL2157DnaAR285Astrep): dla klonów 5 i 6 (seria pILL2150strep) otrzymano mieszaną populację, gdyż oprócz prążków charakterystycznych dla trawienia zmutowanego genu przez BsuRI widać prążek od dzikiego, niezmutowanego genu *dnaA* (ok 1500 pz) (rysunek nr 41), w pozostałych klonach 7 -8 (seria pILL2150strep), 21-24 (seria pILL2157strep) otrzymano prążki DNA nie ulegające strawieniu, co świadczy o braku zmutowanej wersji genu, pomimo tego, że dla tych klonów gen *dnaA* w chromosomalnym locus został zastąpiony kasetą kanamycynową (rysunek nr 37). Zmutowana wersja genu *dnaA* kodowana na plazmidzie najprawdopodobniej została naprawiona.
- Szczepy z mutacją R334A (N6 pILL2150DnaAR334Astrep i N6 pILL2157DnaAR334Astrep): wszystkie klony z wyjątkiem 25 kodują dziką wersję genu *dnaA*, gdyż po trawieniu NsbI wciąż widoczny jest prążek ok 1500 pz – typowy dla dzikiej wersji genu; w klonie 25 brak dzikiej wersji genu, ponieważ otrzymano wzór trawienia typowy dla zmutowanego genu. Z wyników PCR z zastosowaniem starterów na chromosomalne locus *dnaA*, wynika, że w okolicy locus *dnaA* zaszły nieokreślone rearanżacje DNA (rysunek nr 37) – w reakcji PCR nie otrzymano żadnego fragmentu DNA. Pomimo niewyjaśnionych zmian w dzikim locus, powielenie jednej, zmutowanej wersji genu *dnaA* na matrycy genomowego DNA świadczy o tym, że gen *dnaAR334A* jest jedyną kopią genu w klonie 25. Klon ten jednocześnie jest jedynym, w którym kopia dzika genu została zastąpiona zmutowaną wersją genu.
- Szczepy z mutacją K178I (N6 pILL2150DnaAK178Istrep i N6 pILL2157DnaAK178IAstrep): we wszystkich klonach widoczny jest prążek ok 700 pz typowy dla trawienia dzikiego typu genu *dnaA* enzymem SauA3I, co świadczy o występowaniu dwóch alleli genu *dnaA* w analizowanych szczepach. Wyjątek stanowi klon 31, gdzie widoczny jest jedynie prążek ok 700 pz, co świadczy o obecności jedynie dzikiej wersji genu *dnaA*.

4.5.2 Wzrost bakterii *Helicobacter pylori* w zależności od mutacji w obrębie motywu AAA+

W związku z niemożliwością usunięcia genu *dnaA* z dzikiego locus z jednoczesnym zastąpieniem go wersją zmutowaną kodowaną na plazmidzie (jedynie w klonie 25 prawdopodobnie zaszły pożądane zmiany), postanowiono zbadać wpływ obecności dodatkowych cząsteczek białka DnaA o zmienionej charakterystyce oddziaływania z ATP na wzrost *H. pylori*.

W tym celu przeprowadzono hodowle szczepów *H. pylori* N6 2150strep, N6 2150DnaAstrep, N6 2150DnaAK178Istrep, N6 2150DnaAR285Astrep, N6 2150DnaAR334Astrep, N6 2157strep, N6 2157DnaAstrep, N6 2157DnaAK178Istrep, N6 2157DnaAR285Astrep oraz N6 2157DnaAR334Astrep z wprowadzonymi plazmidami niosącymi zmienione wersje genu *dnaA* oraz wektory kontrolne (pILL2150strep i pILL2157strep). Na stałym podłożu poprowadzono hodowle w postaci niewielkich muraw. Płynne hodowle szczepów *H. pylori* (OD₆₀₀ około 0,6) najpierw rozcieńczono do OD₆₀₀=0,01 (ok 1,4·10⁷ komórek/ml, (własna standaryzacja CFU, dane niepokazane)). Z otrzymanej zawiesiny wykonano serię rozcieńczeń od 10² do 10⁸ razy. Na płytce z podłożem CBA z chloramfenikolem z dodatkiem IPTG i bez IPTG naniesiono po 10 μl zawiesin rozcieńczonych 10⁴ - 10⁸ razy, otrzymując minihodowle o teoretycznej liczbie komórek odpowiednio 1400, 140, 14 oraz 1,4.

H. pylori hodowano zgodnie z procedurą (rozdział 3.4.3.2). Wyniki minihodowli zamieszczono na rysunku nr 42.



Rysunek 42 Minihodowle szczepów N6 *H. pylori* z wprowadzonymi plazmidami pILL2150strep oraz pILL2157strep niosącymi zmutowane wersje genu *dnaA* oraz dzikiej *dnaA* i pustego plazmidu jako kontrolę. Część lewa: minihodowle szczepów z wektorami serii pILL2150strep. Część prawa: minihodowle szczepów z wprowadzonymi wektorami serii pILL2157strep. **A:** Podłoże bez induktora IPTG, **B:** Podłoże z 0,1 mM IPTG. Pokazano reprezentatywne wyniki.

W przypadku szczepów, w których synteza zmodyfikowanych białek zachodzi z plazmidów serii pILL2150strep zaobserwowano intensywniejszy wzrost komórek szczepów N6 2150strep oraz N6 2150DnaAR285Astrep. W trakcie hodowli zaobserwowano, że szczepy N6 2157DnaAK178Istrep oraz N6 2157DnaAR285Astrep na podłożu bez induktora rosną w zbliżony sposób do szczepów kontrolnych N6 2157strep oraz N6 2157DnaAstrep. Szczep N6 2157DnaAR334Astrep w tych warunkach rośnie nieznacznie lepiej. Natomiast po dodaniu do podłoża induktora IPTG szczepy z dodatkowymi zmodyfikowanymi białkami syntezowanymi z plazmidów serii pILL2157strep nie wzrastały, poza kilkoma koloniami szczepu N6 2157DnaAR334Astrep. Wskazuje to, że synteza zmutowanych form białka DnaA, pomimo obecności dzikiej wersji białka DnaA, jest letalna. Rodzaj wprowadzonej mutacji, czyli mutacje miejsc kluczowych dla wiązania/hydrolizy/oddziaływania z ATP, sugeruje że za efekt letalności odpowiada zaburzona regulacja aktywności białka zależna od ATP/ADP.

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

Celem niniejszej pracy była charakterystyka białka DnaA *H. pylori*, ze szczególnym naciskiem na poznanie roli domen I i III w oddziaływaniach międzybiałkowych zachodzących podczas tworzenia kompleksu inicjującego replikację chromosomu bakteryjnego. Problem podjęto, ponieważ dotychczas prowadzone badania nad inicjacją replikacji chromosomu *H. pylori* skupiały się przede wszystkim na chromosomalnym regionie *oriC*, a większość danych dotyczących białka DnaA odnosiła się do jego C-końcowej domeny IV odpowiedzialnej za wiązanie DNA (Zawilak et al. 2001; Zawilak-Pawlik et al. 2005; Donczew et al. 2012). Dotychczas otrzymano jedynie kryształ domeny I DnaA *H. pylori* w kompleksie z białkiem HobA (Natrajan et al. 2009). Mimo znaczących różnic w sekwencji aminokwasowej białka DnaA *H. pylori* a jego homologami z *E. coli*, *B. subtilis* i *M. genitalium*, dla których również rozwiązano struktury krystaliczne domeny I, struktura przestrzenna jest wysoce zbliżona (rysunek nr 7). Podobieństwo strukturalne, przy jednoczesnej różnicy sekwencji aminokwasowej, może świadczyć o molekularnych różnicach oddziaływania białek DnaA *H. pylori* ze sobą w porównaniu do dobrze scharakteryzowanego białka DnaA *E. coli*.

Duża homologia sekwencji aminokwasowej domeny III białek DnaA wielu gatunków bakterii sugeruje równie dużą homologię funkcjonalną domeny, w tym również podobne oddziaływania międzycząsteczkowe. Jednak brak u *H. pylori* wielu genów homologicznych do genów kodujących białka *E. coli* oddziałujących z domeną III, może wskazywać na znaczące różnice w sposobie regulacji aktywności białka DnaA *H. pylori*.

Określenie oddziaływań zachodzących z udziałem domen I i III pozwoli na lepsze zrozumienie podstawowych procesów komórkowych *H. pylori*, szczególnie procesu inicjacji replikacji.

5.1 Oczyszczanie rekombinowanych białek DnaA

Oczyszczenie rekombinowanych wariantów białka DnaA *H. pylori* było niezbędne do przeprowadzenia szeregu analiz mających doprowadzić do określenia ról domen I i III w procesie tworzenia kompleksu inicjującego replikację chromosomu *H. pylori*. Kluczowe dla powodzenia projektu było otrzymanie preparatów białkowych o wysokim stopniu czystości oraz w ilości wystarczającej do przeprowadzenia wielu analiz *in vitro*. Ponieważ preparaty białka

uzyskiwane były w buforach o dużym stężeniu glutaminianu potasu, który zapewniał im stabilność i rozpuszczalność w trakcie procesu izolacji oraz przechowywania, istotne było oczyszczenie białek w stosunkowo wysokim zakresie stężeń: 1 – 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Kluczowe było dobranie odpowiednich warunków ekspresji oraz oczyszczania. Zastosowano system ekspresyjny pET w komórkach BL21, a oczyszczanie przeprowadzano za pomocą chromatografii powinowactwa do złoża Strep-Tactin (rozdział 3.6.2.2). Podczas prób oczyszczenia rekombinowanych białek zauważono, że synteza ich w temperaturze ok 10°C znacząco zwiększa ich rozpuszczalność, a co za tym idzie, ułatwia ich izolację. Podczas oczyszczania bardzo ważnym etapem okazało się rozcieńczenie supernatantu nakładanego na złożo – pozwalało to uniknąć agregowania białek i wytrącania ich podczas wiązania. Agregacja i wytrącenie białek podczas procedury oczyszczania ma też aspekt ekonomiczny, w przypadku wszystkich wariantów białka DnaA agregaty białkowe są niemożliwe do usunięcia ze złoża podczas standardowej procedury regeneracji złoża, co uniemożliwia jego ponowne wykorzystanie. Dodatkowo istotny wpływ na zwiększenie wydajności izolacji białek miał dobór odpowiedniego stężenia glutaminianu potasu oraz ustawianie pH stosowanych buforów o 1 mniejszego lub większego od pI białka, ale mieszczącego się w zakresie 7,5-8,5 (wartości pH polecane przez producenta złoża) (tabele nr 9 i 10).

Należy zauważyć, że do różnych wariantów białka DnaA należało dobrać stężenie czynnika zmniejszającego agregację, czyli glutaminianu potasu. Dla białka HpDnaAIII-IVstrep stężenie wynosiło aż 400mM, ponieważ przy niższych stężeniach prawie cała ilość białka agregowała tworząc nierozpuszczalne kompleksy. Najmniejszych stężeń glutaminianu sodu używano dla wariantów HpDnaAIVstrep oraz HpDnaAI-II-IVstrep (150mM). Dla białek pełnej długości oraz domen I-II zastosowane stężenie glutaminianu potasu było nieznacznie wyższe – 200mM. Te różnice sugerują, że skład domenowy białka DnaA jest istotny dla zachodzących oddziaływań.

Należy zauważyć, że punktowa mutacja w białku HpDnaAK178Istrep spowodowała spadek rozpuszczalności białka, co w konsekwencji uniemożliwiło izolację tego wariantu oraz przeprowadzenie analiz *in vitro*. Potwierdzono syntezę i rozpuszczalność białka w komórkach w warunkach testowych (hodowla 50 ml) jak i preparatywnych (hodowla 1l) (rysunek nr 17). Problemów nastręczało agregowanie białka podczas izolacji z hodowli o preparatywnej (rozdział 4.2). Próbę izolacji białka podejmowano wielokrotnie zmieniając warunki izolacji m.in. poprzez zwiększenie stężenia stosowanego glutaminianu (do 400 mM), zwiększenie stężenia NaCl

w buforze, zastąpienie NaCl solą KCl w różnych stężeniach. Sprawdzono również kilka innych warunków syntezy białka, m. in. syntezę indukowaną różnymi stężeniami IPTG, hodowlę bakterii po indukcji w temperaturach 30°C oraz 37°C. Niestety we wszystkich testowanych warunkach izolacja nie przebiegła pomyślnie. Nie podjęto prób izolacji białka w warunkach denaturujących, aby móc później porównać między sobą wyniki analiz otrzymanych dla innych wariantów białka DnaA *H. pylori* wyizolowanych w warunkach natywnych. Być może zastosowanie substytucji lizyny 156 na inny aminokwas niż izoleucyna pozwoliłoby na izolację białka.

5.2 Charakterystyka domeny I białka DnaA *H. pylori*

Dotychczasowe dane literaturowe dotyczące domeny I białka DnaA *H. pylori* odnosiły się do jej oddziaływań z białkiem HobA oraz do struktury krystalicznej. W artykule (Natrajan et al. 2009) badacze stwierdzili, że domena I-II nie jest zdolna do oddziaływań z inną domeną I-II. Stało to w sprzeczności z wynikami testów BTH (bakteryjny system dwuhybrydowy) przeprowadzonymi w naszym laboratorium (Zawilak-Pawlik, dane nieopublikowane), z których wynikało, że N-koniec białka DnaA oddziałuje ze sobą. Stało się to punktem wyjścia do badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

Test sieciowania białek (rozdział 4.3.1), w którym użyto również oczyszczonej domeny I-II, potwierdził oligomeryzację N-końców białek DnaA *H. pylori*. Białko HpDnaAIII-IVstrep tworzy tylko dimer natomiast HpDnaAstrep dimer i kompleksy wyższych rzędów (w związku z ograniczeniami rozdzielczości żelu trudno określić z pewnością czy to trimery, tetrametry czy inne) podczas gdy HpDnaAI-IIstrep tworzy dimery, trimery, tetrametry, pentamery i wyższe oligomery. Jak widać, większa zdolność do oligomeryzacji białka HpDnaAstrep wynika z połączenia oligomeryzacji poprzez domeny III-IV oraz I-II.

Dalszym etapem badań było wyjaśnienie roli oligomeryzacji domeny I w tworzeniu kompleksu inicjującego eplikację chromosomu *H. pylori*.

Donczew et al. 2012 wykazali, że oddziaływania pomiędzy cząsteczkami białka DnaA prowadzą do utworzenia kompleksu nukleoproteinowego pomiędzy podregionami *oriC1* i *oriC2*, czego widocznym efektem jest utworzenie pętli DNA z genu *dnaA* znajdującego się pomiędzy regionami *oriC*. Nie było jednak wiadomo, które domeny pośredniczą w oddziaływaniach

między subkompleksami DnaA-*oriC1* i DnaA-*oriC2*. Z przeprowadzonych analiz (rozdział 4.3.4) wynika, że za oddziaływania dalekiego zasięgu, jakie zachodzą pomiędzy oligomerami DnaA utworzonymi na podregionach *oriC*, odpowiedzialne są domeny I-II. Porównując białka HpDnaAstrep i HpDnaAIII-IVstrep zauważono ponad trzykrotny spadek częstości tworzenia pętli przez białko bez N-końca. Dodatkowo zestawiając z opisanymi analizami wyniki otrzymane dla białka HpDnaAI-II-IVstrep należy zauważyć, że częstość pojawiania się pętli wzrasta odpowiednio 1,5x oraz 4x w stosunku do białek HpDnaAstrep i HpDnaAIII-IVstrep. Co istotne, specyficzność powstających pętli zapewniana jest przez obecność domeny III - w przypadku białka pełnej długości 5,6%, białka HpDnaAIII-IVstrep 6,6% a białka HpDnaAI-II-IVstrep 61,7% pętli tworzy się w sposób niespecyficzny, czyli wypętla DNA po związaniu się do innych miejsc niż boksy DnaA w regionie *oriC*.

Tworzenie oligomerów przez domenę I-II wykazane w sieciowaniu oraz zmiana częstości powstawania pętli w zależności od obecności N-końca, potwierdzają wcześniej otrzymane pozytywne wyniki analizy oddziaływań w systemie BTH. Pozytywne wyniki tych trzech analiz pokazują, że domena I DnaA *H. pylori* homooligomeryzuje podobnie jak domena I DnaA *E. coli* i domena I DnaA *S. coelicolor* (Majka, Zakrzewska-Czerwińska, and Messer 2001; Weigel et al. 1999).

O istotności oddziaływań zachodzących pomiędzy domenami I-II białek DnaA *H. pylori* świadczą również wyniki analiz SPR i EMSA. Analiza SPR (rozdział 4.3.2) wykazała, że wiązanie domeny IV DnaA z DNA jest wzmacniane przez obecność oligomeryzującego N-końca białka. Ma to szczególne znaczenie dla wiązania domeny IV do regionu *oriC1* - oddziaływania międzybiałkowe zachodzące poprzez domeny I-II zapewniają interakcję pomiędzy cząsteczkami białka w tworzącym się oligomerze, co skutkuje związaniem się większej liczby cząsteczek białka do DNA. Wskazuje to na kooperatywność oddziaływań DnaA-DnaA. Bardzo duże różnice w liczbie wiązanych cząsteczek są widoczne przede wszystkim dla niskich stężeń stosowanych białek. Prawdopodobnie odpowiada to wczesnym etapom tworzenia się kompleksu, gdy ilość dostępnego do związania białka ATP-DnaA wzrasta. Wyniki analizy SPR pokazują też, że oddziaływania zachodzące przy udziale N-końca białka mają wpływ na stabilność kompleksu DnaA-DNA. Taki wniosek można wysnuć z przebiegu krzywych otrzymanych dla poszczególnych wariantów białka DnaA. Dla białka HpDnaAstrep w fazie dysocjacji sygnał otrzymywany z oddziaływań DnaA-DNA nie wraca na poziom wyjściowego 0 RU, w zależności

od zastosowanego stężenia białka końcowy sygnał mieści się w przedziale 8 – 25 RU (dla *Bio-oriC1*) lub 21 – 50 RU (Bio-boksy2+3). W przypadku białka HpDnaAIII-IVstrep sygnał końcowy w fazie dysocjacji dla obu wiązanych fragmentów oscyluje w okolicy 10 RU. Otrzymanie dużo niższego sygnału końcowego wskazuje na to, że większa część kompleksów utworzonych przez białko HpDnaAIII-IVstrep rozpadła się niż w przypadku białka HpDnaAstrep. Dla HpDnaAIVstrep wartość RU w końcowej fazie etapu dysocjacji dla obu wiązanych fragmentów jest bliska 0 RU. Analizując sensogramy otrzymane dla białek HpDnaAI-II-IVstrep oraz GST-HpDnaAIV należy zauważyć, że te białka, podobnie jak białko dzikiego typu, w fazie dysocjacji nie osiąga sygnału wyjściowego 0 RU. Dla wiązania fragmentu *Bio-oriC1* końcowy sygnał wraz ze wzrastającym stężeniem białek wynosi 4,2, 18,5, i 39,8 RU dla HpDnaAI-II-IVstrep oraz 21,5, 27,1 i 34,4 RU dla GST-HpDnaAIV. Dla fragmentu Bio-boksy 2+3 sygnały wynoszą kolejno 17,8, 38,3 i 38,4 RU dla HpDnaAI-II-IVstrep oraz 69,2, 79,3 i 79,3 RU dla GST-HpDnaAIV. Potwierdza to wcześniejszą obserwację, że oligomeryzujący N-końiec białka DnaA zapewnia stabilizację utworzonych kompleksów DnaA-DNA.

Analiza migracji kompleksów nukleoproteinowych w żelu poliakrylamidowym (rozdział 4.3.3) pokazała, że oddziaływania DnaA-DNA są wypadkową dwóch rodzajów interakcji białko-białko. W przypadku oddziaływań HpDnaAIII-IVstrep oraz HpDnaAIVstrep widać, że tworzone kompleksy białko-FAM-*oriC1*, widoczne jako rozmyte sygnały, nie są tak stabilne i/lub uporządkowane, jak kompleksy otrzymywane dla HpDnaAI-II-IVstrep i GST-HpDnaAIV widoczne jako ostre prążki sygnałów. Natomiast w przypadku białka HpDnaAstrep migracja kompleksów to połączenie obu sposobów migracji – na tle rozmytych sygnałów widać również ostre prążki. Sugeruje to, że domena I zapewnia oddziaływania stabilizujące tworzone kompleksy oraz prawdopodobnie porządkuje powstający oligomer w sposób dotychczas nie zbadany.

Testem rozplatania plazmidu *pori1ori2* z natywnym miejscem *oriC* *H. pylori* (rozdział 4.3.5) wykazano, że oddziaływania zachodzące za pośrednictwem domeny I nie mają bezpośredniego wpływu na zdolność białka DnaA do otwierania helisy DNA. W przeprowadzanych testach porównywano wydajność rozplatania DNA białek HpDnaAstrep, HpDnaAIII-IVstrep oraz HpDnaAI-II-IVstrep. Z analizy otrzymanych wyników można wnioskować, że brak N-końca nie wpływa znacząco na otwieranie regionu DUE, ale że to oddziaływania zachodzące za pomocą

domeny III zapewniają białku DnaA jego zdolność do rozplatania. Również w tym aspekcie białko DnaA *H. pylori* podobne jest do homologu z *E. coli* (Sutton et al. 1998).

5.2.1 Oddziaływania HobA-DnaA

Białko HobA to dotychczas jedyne zidentyfikowane białko oddziałujące z DnaA *H. pylori*. Interakcje pomiędzy nimi zachodzą poprzez domenę I DnaA (Natrajan et al. 2009; Zawilak-Pawlik et al. 2007). W analizach SPR wykazano, że oddziaływanie HobA z DnaA stymuluje wiązanie białka inicjatorowego do regionu *oriC1* (Zawilak-Pawlik et al. 2011). Dodatkowe analizy oddziaływań HobA-DnaA przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pokazały, że interakcje zachodzące pomiędzy białkami skutkują zwiększoną częstością wiązania DnaA do DNA oraz tworzenia pętli DNA (rozdział 4.3.6). Należy zauważyć, że wzrósł nie tylko ogólny odsetek tworzonych pętli, lecz również zwiększył się procent niespecyficzných wypętleń. Zwiększenie ilości niepoprawnych pętli może wynikać z ograniczeń zastosowanej metody – kompleksy HobA-DnaA-DNA w mikroskopii elektronowej widoczne są jako znacznie większe kompleksy niż DnaA-DNA, mogące powodować dodatkowe zakrzywienie DNA, trudne do określenia i zmierzenia. Dodatkowo tworzące się pętle mają bardziej złożoną strukturę niż te w kompleksach DnaA-HobA, co również powoduje trudności w poprawnym zmierzeniu ich długości oraz długości pozostałych fragmentów plazmidu, potrzebnych do określenia miejsc utworzenia się oligomerów.

Testy rozplatania plazmidu *por1ori2* przez białko DnaA koinkubowane z HobA (rozdział 4.3.6.2) pokazały, że zachodzące oddziaływania hamują otwieranie regionu DUE, w przeciwieństwie do interakcji DnaA-DiaA u *E. coli* stymulującej rozplatanie DNA (Keyamura et al. 2007). Być może zmiany konformacyjne w postaci większych oligomerów i/lub bardziej złożonych pętli uniemożliwiają białku DnaA otwarcie helisy. Taki efekt oddziaływań DnaA-HobA może być sposobem na regulację inicjacji replikacji. Jak dotąd nie udało się znaleźć w dotychczas zsekwencjonowanych genomach szczepów *H. pylori* homologów innych białek odpowiedzialnych za regulację inicjacji u *E. coli*.

5.3 Charakterystyka domeny III DnaA *H. pylori*

Dotychczas nie badano czy domena III białka DnaA *H. pylori* charakteryzuje się podobnymi cechami strukturalno-funkcjonalnymi jak homolog *E. coli*. W związku z wysoką homologią

sekwencji aminokwasowej domeny III *H. pylori* do homologicznej domeny DnaA *E. coli* przypuszcza się, że poszczególne aminokwasy istotne dla funkcji domeny III u *E. coli* pełnią te same funkcje u *H. pylori* (rozdział 1.3.1, tabela 3).

Zbadano wpływ mutacji wybranych aminokwasów na aktywność białka DnaA. Wybrano 3 aminokwasy i poddano je mutagenezie (tabela 19).

Tabela 19 Aminokwasy wybrane do mutagenezy

Aminokwas u <i>E. coli</i>	Funkcja w <i>E. coli</i> DnaA	Aminokwas w <i>H. pylori</i> DnaA	Zmieniony aminokwas
Lizyna 178	Bierze udział w wiązaniu nukleotydów ATP lub ADP przez białko	156	Izoleucyna
Arginina 285	Palec argininowy AAA+, rozpoznaje ATP, uczestniczy w oddziaływaniach domena III-domena III	261	Alanina
Arginina 334	Sensor II AAA+, bierze udział w hydrolizie ATP w systemach RIDA i DDAH	310	Alanina

5.3.1 Wpływ oddziaływania białka DnaA z nukleotydami ATP/ADP na jego aktywność

Białka DnaA należą do rodziny białek AAA+ - do swojej aktywności potrzebują związania i hydrolizy ATP jako czynnika definiującego konformację białka. ATP-DnaA jest formą aktywną, tzn. że związanie tego nukleotydu pozwala białku na rozpoczęcie inicjacji replikacji (*E. coli*) (Erzberger et al. 2002). Ponadto hydroliza ATP nie dostarcza energii, ale pełni funkcję regulatora aktywności: zmiana ATP na ADP powoduje zmiany konformacyjne białka. Hydroliza ATP również nie jest niezbędna do otwierania helisy DNA (Messer 2002).

Analiza SPR wykazała, że białko HpDnaAstrep związane z ATP oddziałuje z Bio-oriC1 nawet 5 razy silniej niż gdy jest związane z ADP (rozdział 4.4.1). W przypadku wiązania do Bio-boksy2+3 różnica pomiędzy formami ATP-HpDnaAstrep a ADP-HpDnaAstrep jest trzykrotna. Zaobserwowane różnice są zbieżne z wynikami analiz przeprowadzonych przez (Speck and Messer 2001), którzy wykazali znaczne różnice pomiędzy wiązaniem DNA przez białka ATP-DnaA i ADP-DnaA *E. coli*. W najwyższym analizowanym stężeniu białek DnaA stosunek wiązania najsilniejszego boku R1 przez ATP-DnaA/ADP-DnaA wynosi 2. Również test rozplatania helisy DNA potwierdził, że stanem aktywnym białka DnaA *H. pylori* jest forma związana z ATP (rysunek nr 30). Analiza wyników pokazała, że białko związane z ADP nie jest

w stanie otworzyć regionu DUE - wydajność rozplatania jest na poziomie natywnej niestabilności helikalnej regionu bogatego w pary AT (rozdział 4.4.4). W tym aspekcie białka DnaA *H. pylori* wykazuje podobieństwo do białka DnaA *E. coli*, które rozplata dwuniciowy DNA w formie związanej z ATP a nie z ADP (Kaguni 2011) (dyskusja na temat roli ATP/ADP w rozplataniu DNA przez DnaA poniżej). Interesujące są obserwacje dotyczące tworzenia kompleksów nukleoproteinowych (rozdział 4.4.3). Białko związane z ADP charakteryzuje się obniżonym wiązaniem do plazmidu por1ori2 o 18 punktów procentowych, przy czym preferencja dotycząca regionu wiązania, *oriC1* i/lub *oriC2* pozostaje taka sama. HpDnaAstrep związane zarówno z ATP i ADP preferencyjnie oddziałuje z *oriC2* (odpowiednio 37,4% i 37,6% kompleksów). Natomiast różnica pomiędzy tymi stanami jest istotna dla tworzenia pętli DNA. ADP-HpDnaAstrep ponad dwukrotnie rzadziej tworzy poprawne pętle w porównaniu do białka ATP-HpDnaAstrep. Poczynione obserwacje pozwalają wnioskować, że aktywność rozplatania białka DnaA *H. pylori* jest zależna od ATP oraz że na jego zdolność do kooperatywnych oddziaływań również wpływa wiązanie z odpowiednim nukleotydem. Mimo tego, że w analizie mikroskopowej ATP-HpDnaAstrep dwukrotnie rzadziej wiąże *oriC1* niż ADP-HpDnaAstrep (odpowiednio 5,0% i 11,2% kompleksów), to w analizie SPR wykazuje dużo silniejsze oddziaływanie (rozdział 4.4.1). Jak wspomniano w rozdziale 4.3.3 domena I zapewnia kooperatywność oddziaływań DnaA-DnaA u *H. pylori*, ale najprawdopodobniej te oddziaływania wymagają odpowiedniego ułożenia w przestrzeni N-końców białek, co prawdopodobnie zapewniają zmiany konformacyjne związane z oddziaływaniem z ATP/ADP. Zależność kooperatywnych oddziaływań od wiązania przez białko ATP jest typowa dla białek z rodziny AAA+, do której należy białko DnaA (Mott and Berger 2007). Nie można również wykluczyć innych czynników mogących mieć wpływ na kooperatywność. Nie wiadomo jak na wiązanie białek DnaA wpływa obecność *oriC2*, zwłaszcza jaki wpływ wywiera na cząsteczki białka związane do *oriC1*. W najnowszych badaniach (Grimwade et al. 2018a) wykazali, że u *E. coli* przy zmutowaniu boksów o niższym powinowactwie do DnaA w regionie *oriC* na boksy o wysokim powinowactwie, aktywność białka DnaA nie zależy od rodzaju związanego przez nie nukleotydu (zmutowano boksy I i τ , preferencyjnie wiązane przez ATP-DnaA, tworząc region *oriC*^{allADP} zawierający boksy wiązane przez DnaA niezależnie od ATP). W swoich analizach autorzy wykazują, że dla zmutowanego regionu *oriC* nie ma znaczenia, która forma białka DnaA (ATP-DnaA czy ADP-DnaA) oddziałuje z DNA, ponieważ obie są zdolne do wiązania

wszystkich boksów DnaA oraz rozplecenia regionu DUE. Co więcej, mutanty białka DnaA niezdolne do wiązania ATP są zdolne do inicjowania replikacji w mutancie *E. coli* posiadającym zmodyfikowany region *oriC^{allADP}*. Sprawdzono również jak przebiega inicjacja replikacji chromosomu, jeżeli w komórkach znajduje się zmodyfikowany region *oriC* i dzika wersja białka DnaA. Analiza wykazała, że w takich komórkach inicjacja replikacji zachodzi wielokrotnie częściej niż w układzie dzikim. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazują, że zróżnicowanie powinowactwa boksów DnaA do białka ATP-DnaA jest kluczowym czynnikiem regulującym inicjację replikacji *E. coli*. W przypadku regionu *oriC H. pylori* również istnieje zróżnicowanie powinowactwa boksów DnaA do DnaA – część boksów jest wiązana jedynie przez białko ATP-DnaA (Jaworski, dane nieopublikowane, rysunek nr 9). Prawdopodobnie także u tej bakterii oddziaływania DnaA-DNA zależne od ATP są mechanizmem regulacji inicjacji replikacji.

5.3.2 Wpływ mutacji w obrębie motywu AAA+ na aktywność białka DnaA

Białka HpDnaAR285Astrep oraz HpDnaAR334Astrep poddano analizie SPR. W ten sposób zbadano wiązanie wspomnianych białek do DNA zawierającego *oriC1* oraz boksy2+3 (rozdział 4.4.2). Oba białka wykazały bardzo niskie powinowactwo zarówno do fragmentu Bio-*oriC1* jak i Bio-boksy2+3. 64 nM białko HpDnaAstrep dało odpowiedź RU_{max} ok 60 RU dla wiązania Bio-*oriC1* oraz 160 RU Bio-boksy2+3. Porównywalne wartości dla białek HpDnaAR285Astrep oraz HpDnaAR334Astrep otrzymano dopiero dla stężenia 1024 nM, czyli 16 razy wyższym niż dla dzikiego białka. Wyniki tej analizy pokazują, że zmienione oddziaływanie z ATP znacząco obniża zdolność DnaA do wiązania boksów DnaA w regionie *oriC1*.

Zbadano również zdolność wariantów białka DnaA do rozplatania DNA (rozdział 4.4.4). W teście rozplatania plazmidu *por1ori2* białko HpDnaAR334Astrep wykazało zbliżoną aktywność do białka dzikiego, natomiast wariant HpDnaAR285Astrep dla najwyższego analizowanego stężenia (200 nM) wykazał aktywność zbliżoną do HpDnaAstrep w najniższym stężeniu (25 nM). Pozwala to wnioskować, że dla zdolności do otwierania helisy DNA w regionie DUE, a co za tym idzie tworzenia oczka replikacyjnego, nie jest kluczowa zdolność do hydrolizy ATP, ale przede wszystkim zdolność do oddziaływań białko-białko zależnym od ATP.

Analiza mikroskopowa tworzenia kompleksów nukleoproteinowych (rozdział 4.4.3) pokazała, że częstość wiązania wariantu HpDnaAR334Astrep do DNA jest mniejsza niż białka dzikiego

(odpowiednio 42,9% i 58,7% związanych cząsteczek plazmidu), przy jednoczesnym wzroście powinowactwa do regionu *oriC2* – nastąpił wzrost częstości tworzenia kompleksu na regionie *oriC2* z 37,4 % dla dzikiej wersji DnaA do 47,7% dla białka zmutowanego. O blisko 15 punktów procentowych spadła częstość tworzenia poprawnych pętli DNA przez HpDnaAR334Astrep w stosunku do HpDnaAstrep. Prawdopodobnie jest to wynikiem zmiany powinowactwa białka do regionu *oriC1* – zaburzone wiązanie tego regionu w SPR oraz wzrost częstości tworzenia kompleksów na *oriC2* wskazuje na zaburzenia oddziaływań zachodzących pomiędzy subkompleksami DnaA-*oriC1* i DnaA-*oriC2* uniemożliwiających wypełnienie *dnaA*. W przypadku białka HpDnaAR285Astrep nie zaobserwowano tworzenia się kompleksów na żadnym z podregionów *oriC*, co nie jest jednoznaczne z brakiem oddziaływań białko-DNA. Najprawdopodobniej brak oligomeryzacji za pomocą oddziaływania ATP jednego białka DnaA z palcem argininowy drugiego białka (rysunek nr 29) nie pozwala na utworzenie trwałych i widocznych kompleksów nukleoproteinowych.

Zbadano również wpływ syntezy dodatkowych białek DnaA o zmienionym powinowactwie do ATP na wzrost *H. pylori* (rozdział 4.5.2). Analiza wykazała, że niskie stężenie dodatkowej populacji zmutowanych białek nie wpływa znacząco na wzrost bakterii – indukowana synteza wariantów DnaA z plazmidów serii pILL2150strep oraz synteza białek wynikająca z „cieknięcia” plazmidów serii pILL2157strep (rozdział nr 3.6.2.1) (synteza białek na niskim poziomie nawet bez dodatku induktora) nie zaburza wzrostu *H. pylori*. Natomiast wyższe końcowe stężenie zmodyfikowanych białek HpDnaAK178Istrep, HpDnaAR285Astrep oraz HpDnaAR334Astrep jest letalna dla bakterii.

Niezdolność do otwarcia helisy DNA przez wariant białka DnaA *H. pylori* z nieaktywnym palcem argininowym jest wspólna z białkiem DnaA *E. coli* (Kawakami et al. 2005). Oba białka w warunkach *in vivo* nie są zdolne do inicjacji replikacji. Udało się stworzyć szczep *E. coli* w którym bezpośrednio pokazano, że białko R285A nie może zastąpić dzikiego DnaA – taka substytucja w pozycji 285 jest letalna dla bakterii. W przypadku *H. pylori* jedynie w sposób pośredni udało się wykazać, że nadmiar białka z nieaktywnym palcem argininowym jest szkodliwy. Pomiedzy mutantami białka DnaAR285A *E. coli* i *H. pylori* występuje znacząca różnica: zmutowane białko *E. coli* z podobnym powinowactwem jak białko dzikie wiąże najsilniejszy boks DnaA. Białko *H. pylori* zdecydowanie słabiej oddziałuje z DNA. Różnice pomiędzy efektami homologicznych mutacji w białku DnaA mogą być gatunkowo specyficzne.

Białka DnaAR334A *E. coli* i *H. pylori* prezentują odmienne efekty przeprowadzonych mutacji. Zmutowane białko *E. coli* wykazuje zdolność do nadmiernej inicjacji replikacji (Nishida et al. 2002), podczas gdy zwiększona synteza jego homologu *H. pylori* powoduje śmierć bakterii (być może z powodu zaburzenia inicjacji replikacji). Różnica pomiędzy białkami może wynikać z faktu zaangażowania argininy 334 *E. coli* w hydrolizę ATP zależną od systemu RIDA. W tym procesie istotną rolę pełni białko Hda, którego odpowiednika brak u *H. pylori*. Dotychczas nie zbadano również, czy *H. pylori* przeprowadza analogiczny do RIDA proces oraz czy istnieją miejsca zbliżone do DARS *E. coli*. Wiadomo, że białko DnaA *H. pylori* oddziałuje z błoną komórkową, co sugeruje istnienie procesu regeneracji ATP-DnaA na zasadzie oddziaływania z kwaśnymi fosfolipidami wewnętrznej błony komórkowej (Zawilak et al. 2003).

Przedstawione wnioski i hipotezy dotyczące charakterystyki domeny I białka DnaA *H. pylori* uzupełniają dotychczas zgromadzone informacje, natomiast wyniki analiz i wnioski z nich płynące odnoszące się do domeny III białka DnaA *H. pylori* stanowią podstawę do dalszych badań.

6. WNIOSKI

1. Domeny I-II stanowiące N-koniec białka DnaA *H. pylori* są zdolne do homooligomeryzacji.
2. Oddziaływania między protomerami zachodzące za pośrednictwem domen I-II pełnią istotną rolę w stabilizacji tworzonych kompleksów nukleoproteinowych i są ważne do oddziaływań pomiędzy subkompleksami DnaA-*oriC1* i DnaA-*oriC2* tworzonymi na podregionach dwuczłonowego regionu *oriC*.
3. Oddziaływania zachodzące poprzez domeny I-II zapewniają kooperatywność wiązania DnaA z DNA.
4. Oddziaływania pomiędzy domenami I-II białek DnaA nie wpływają na zdolność białka DnaA do rozplatania *oriC* w regionie DUE. Zdolność białka do otwarcia helisy DNA zależna jest od oddziaływań pomiędzy domenami III tworzonych oligomeru.
5. Oddziaływanie DnaA-HobA powoduje wzrost częstości wiązania plazmidu posiadającego natywny region *oriC* przez DnaA oraz zwiększenie częstości powstawania pętli DNA.
6. Oddziaływanie DnaA-HobA zmniejsza wydajność rozplatania DNA przez białko DnaA *in vitro*.
7. Oddziaływanie DnaA z DNA jest zależne od związanego przez DnaA nukleotydu ATP lub ADP. Białko ADP-DnaA jest niezdolne do otwarcia helisy DNA *in vitro* w przeciwieństwie do ATP-DnaA. Ponadto forma związana z ADP mniej wydajnie wiąże DNA niż forma z ATP.
8. Nie jest możliwe uzyskanie szczepów N6 *H. pylori* na drodze dwuetapowej mutagenyzy poprzez wprowadzenie dodatkowej kopii zmutowanego genu *dnaA* (K178I, R285A), na plazmidzie pILL2150strep/pILL2157strep i zastąpienie dzikiej wersji *dnaA* na chromosomie kasetą oporności na kanamycynę. W przypadku genów białek zmutowanych w obrębie motywu AAA+ nie jest możliwe zastąpienie dzikiej wersji białka zmutowanym wariantem. Wyjątek stanowi szczep N6 2157DnaAR334Astrep, w którym zaszły pożądane zmiany.
9. Zwiększone stężenie białek DnaAK178I, DnaAR285A oraz DnaAR334A w komórkach *H. pylori* jest letalne dla bakterii. Wskazuje to na możliwość istnienia systemu regulacji aktywności DnaA i inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori* na drodze zależnej od ATP.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe, Yoshito, Takaaki Jo, Yusaku Matsuda, Chika Matsunaga, Tsutomu Katayama, and Tadashi Ueda. 2007. "Structure and Function of DnaA N-Terminal Domains: Specific Sites and Mechanisms in Inter-DnaA Interaction and in DnaB Helicase Loading on OriC." *The Journal of Biological Chemistry* 282(24):17816–27.
- Akman, Leyla, Atsushi Yamashita, Hidemi Watanabe, Kenshiro Oshima, Tadayoshi Shiba, Masahira Hattori, and Serap Aksoy. 2002. "Genome Sequence of the Endocellular Obligate Symbiont of Tsetse Flies, *Wigglesworthia Glossinidia*." *Nature Genetics* 32(3):402–7.
- Arora, Jasmine, Kasturi Goswami, and Swati Saha. 2014. "Characterization of the Replication Initiator Orc1/Cdc6 from the Archaeon *Picrophilus Torridus*." *Journal of Bacteriology* 196(2):276–86.
- Atherton, John C. 2006. "The Pathogenesis of *Helicobacter Pylori*-Induced Gastro-Duodenal Diseases." *Annual Review of Pathology* 1:63–96.
- Ausiannikava, Darya and Thorsten Allers. 2017. "Diversity of DNA Replication in the Archaea." *Genes* 8(2).
- Barry, E. R. and S. D. Bell. 2006. "DNA Replication in the Archaea." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(4):876–87.
- Bazin, Alexandre, Mickaël V Cherrier, Irina Gutsche, Joanna Timmins, and Laurent Terradot. 2015. "Structure and Primase-Mediated Activation of a Bacterial Dodecameric Replicative Helicase." *Nucleic Acids Research* 43(17):8564–76.
- Bell, Stephen P. and Anindya Dutta. 2002. "DNA Replication in Eukaryotic Cells." *Annual Review of Biochemistry* 71(1):333–74.
- Berg, Jeremy, John Tymoczko, and Lubert Stryer. 2008. *Biochemistry Stryer*.
- Blaesing, F., C. Weigel, M. Welzeck, and W. Messer. 2000. "Analysis of the DNA-Binding Domain of *Escherichia Coli* DnaA Protein." *Molecular Microbiology* 36(3):557–69.
- Boeneman, Kelly, Solveig Fossum, Yanhua Yang, Nicholas Fingland, Kirsten Skarstad, and Elliott

- Crooke. 2009. "Escherichia Coli DnaA Forms Helical Structures along the Longitudinal Cell Axis Distinct from MreB Filaments." *Molecular Microbiology* 72(3):645-57.
- Boneca, Ivo G., Chantal Ecobichon, Catherine Chaput, Aurélie Mathieu, Stéphanie Guadagnini, Marie-Christine Prévost, Frédéric Colland, Agnès Labigne, and Hilde de Reuse. 2008. "Development of Inducible Systems to Engineer Conditional Mutants of Essential Genes of Helicobacter Pylori." *Applied and Environmental Microbiology* 74(7):2095-2102.
- Brassinga, A. K. C., R. Siam, W. McSween, H. Winkler, D. Wood, and G. T. Marczyński. 2002. "Conserved Response Regulator CtrA and IHF Binding Sites in the γ -Proteobacteria Caulobacter Crescentus and Rickettsia Prowazekii Chromosomal Replication Origins." *Journal of Bacteriology* 184(20):5789-99.
- Brassinga, a K. and G. T. Marczyński. 2001. "Replication Intermediate Analysis Confirms That Chromosomal Replication Origin Initiates from an Unusual Intergenic Region in Caulobacter Crescentus." *Nucleic Acids Research* 29(21):4441-51.
- Brézellec, Pierre, Isabelle Vallet-Gely, Christophe Possoz, Sophie Quevillon-Cheruel, and Jean-Luc Ferat. 2016a. "DciA Is an Ancestral Replicative Helicase Operator Essential for Bacterial Replication Initiation." *Nature Communications* 7:13271.
- Brézellec, Pierre, Isabelle Vallet-Gely, Christophe Possoz, Sophie Quevillon-Cheruel, and Jean-Luc Ferat. 2016b. "DciA Is an Ancestral Replicative Helicase Operator Essential for Bacterial Replication Initiation." *Nature Communications* 7(1):13271.
- Capaldi, Stephanie A. and James M. Berger. 2004. "Biochemical Characterization of Cdc6/Orc1 Binding to the Replication Origin of the Euryarchaeon Methanothermobacter Thermoautotrophicus." *Nucleic Acids Research* 32(16):4821-32.
- Cayrou, Christelle, Philippe Coulombe, Aurore Puy, Stephanie Rialle, Noam Kaplan, Eran Segal, and Marcel Méchali. 2012. "New Insights into Replication Origin Characteristics in Metazoans." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11(4).
- Chase, Jillian, Andrew Catalano, Alex J. Noble, Edward T. Eng, Paul D. B. Olinares, Kelley Molloy, Danaya Pakotiprapha, Martin Samuels, Brian Chait, Amedee des Georges, and David Jeruzalmi. 2018. "Mechanisms of Opening and Closing of the Bacterial Replicative

Helicase." *ELife* 7.

Cordova, Caio M. M., Carole Lartigue, Pascal Sirand-Pugnet, Joël Renaudin, Regina A. F. Cunha, and A. Blanchard. 2002. "Identification of the Origin of Replication of the Mycoplasma Pulmonis Chromosome and Its Use in OriC Replicative Plasmids." *Journal of Bacteriology* 184(19):5426–35.

Costa, Alessandro, Iris V Hood, and James M. Berger. 2013. "Mechanisms for Initiating Cellular DNA Replication." *Annual Review of Biochemistry* 82:25–54.

Deegan, Tom D. and John F. X. Diffley. 2016. "MCM: One Ring to Rule Them All." *Current Opinion in Structural Biology* 37:145–51.

Dhar, Manoj K., Shelly Sehgal, and Sanjana Kaul. 2012. "Structure, Replication Efficiency and Fragility of Yeast ARS Elements." *Research in Microbiology* 163(4):243–53.

Donczew, Rafał, Łukasz Makowski, Jaworski Paweł, Martyna Bezulska, Małgorzata Nowaczyk, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, and Anna Zawilak-Pawlik. 2015. "The Atypical Response Regulator HP1021 Controls Formation of the Helicobacter Pylori Replication Initiation Complex." *Molecular Microbiology* 95(2):297–312.

Donczew, Rafał, Thorsten Mielke, Jaworski Paweł, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, and Anna Zawilak-Pawlik. 2014. "Assembly of Helicobacter Pylori Initiation Complex Is Determined by Sequence-Specific and Topology-Sensitive DnaA-OriC Interactions." *Journal of Molecular Biology* 426(15):2769–82.

Donczew, Rafał, Christoph Weigel, Lurz Rudi, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, and Anna Zawilak-Pawlik. 2012. "Helicobacter Pylori OriC – the First Bipartite Origin of Chromosome Replication in Gram-Negative Bacteria." *Nucleic Acids Research* 40(19):9647–60.

Donczew, Rafał, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, and Anna Zawilak-Pawlik. 2014. "Beyond DnaA: The Role of DNA Topology and DNA Methylation in Bacterial Replication Initiation." *Journal of Molecular Biology* 426(12):2269–82.

Duderstadt, Karl E., Kevin Chuang, and James M. Berger. 2011. "DNA Stretching by Bacterial Initiators Promotes Replication Origin Opening." *Nature* 478(7368):209–13.

Dueber, Erin C., Alessandro Costa, Jacob E. Corn, Stephen D. Bell, and James M. Berger. 2011.

- "Molecular Determinants of Origin Discrimination by Orc1 Initiators in Archaea." *Nucleic Acids Research* 39(9):3621-31.
- Dueber, Erin L. Cunningham, Jacob E. Corn, Stephen D. Bell, and James M. Berger. 2007. "Replication Origin Recognition and Deformation by a Heterodimeric Archaeal Orc1 Complex." *Science (New York, N.Y.)* 317(5842):1210-13.
- Duncker, Bernard P., Igor N. Chesnokov, and Brendan J. McConkey. 2009. "The Origin Recognition Complex Protein Family." *Genome Biology* 10(3):214.
- Erzberger, Jan P., Michelle M. Pirruccello, and James M. Berger. 2002. "The Structure of Bacterial DnaA: Implications for General Mechanisms Underlying DNA Replication Initiation." *The EMBO Journal* 21(18):4763-73.
- Evrin, Cecile, Pippa Clarke, Juergen Zech, Rudi Lurz, Jingchuan Sun, Stefan Uhle, Huilin Li, Bruce Stillman, and Christian Speck. 2009. "A Double-Hexameric MCM2-7 Complex Is Loaded onto Origin DNA during Licensing of Eukaryotic DNA Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(48):20240-45.
- Felczak, Magdalena M. and Jon M. Kaguni. 2004. "The Box VII Motif of Escherichia Coli DnaA Protein Is Required for DnaA Oligomerization at the E. Coli Replication Origin." *The Journal of Biological Chemistry* 279(49):51156-62.
- Felczak, Magdalena M., Lyle A. Simmons, and Jon M. Kaguni. 2005. "An Essential Tryptophan of Escherichia Coli DnaA Protein Functions in Oligomerization at the E. Coli Replication Origin." *The Journal of Biological Chemistry* 280(26):24627-33.
- Ferrero, R. L., V. Cussac, P. Courcoux, and A. Labigne. 1992. "Construction of Isogenic Urease-Negative Mutants of Helicobacter Pylori by Allelic Exchange." *Journal of Bacteriology* 174(13):4212-17.
- Fujikawa, Norie, Hitoshi Kurumizaka, Osamu Nureki, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Tsutomu Katayama, and Shigeyuki Yokoyama. 2003a. "Structural Basis of Replication Origin Recognition by the DnaA Protein." *Nucleic Acids Research* 31(8):2077-86.
- Fujikawa, Norie, Hitoshi Kurumizaka, Osamu Nureki, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Tsutomu Katayama, and Shigeyuki Yokoyama. 2003b. "Structural Basis of Replication

- Origin Recognition by the DnaA Protein." *Nucleic Acids Research* 31(8):2077–86.
- Gajiwala, Ketan S. and Stephen K. Burley. 2000. "Winged Helix Proteins." 110–16.
- Gao, Feng and Chun Ting Zhang. 2007. "DoriC: A Database of OriC Regions in Bacterial Genomes." *Bioinformatics* 23(14):1866–67.
- Gil, Rosario, Francisco J. Silva, Evelyn Zientz, François Delmotte, Fernando González-Candelas, Amparo Latorre, Carolina Rausell, Judith Kamerbeek, Jürgen Gadau, Bert Hölldobler, Roeland C. H. J. van Ham, Roy Gross, and Andrés Moya. 2003. "The Genome Sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative Analysis of Reduced Genomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16):9388–93.
- Grimwade, J. E., V. T. Ryan, and A. C. Leonard. 2000. "IHF Redistributes Bound Initiator Protein, DnaA, on Supercoiled OriC of *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* 35(4):835–44.
- Grimwade, Julia E., Tania A. Rozgaja, Rajat Gupta, Kyle Dyson, Prassanna Rao, and Alan C. Leonard. 2018a. "Origin Recognition Is the Predominant Role for DnaA-ATP in Initiation of Chromosome Replication." *Nucleic Acids Research* 46(12):6140–51.
- Grimwade, Julia E., Tania A. Rozgaja, Rajat Gupta, Kyle Dyson, Prassanna Rao, and Alan C. Leonard. 2018b. "Origin Recognition Is the Predominant Role for DnaA-ATP in Initiation of Chromosome Replication." *Nucleic Acids Research* 46(12):6140–51.
- György, H., K. József, K. Mihály, and E. Al. 2013. *Introduction to Practical Biochemistry*.
- Hunt, R. H. 1996. "The Role of *Helicobacter pylori* in Pathogenesis: The Spectrum of Clinical Outcomes." *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement* 220:3–9.
- Hwang, D. S. and A. Kornberg. 1992. "Opening of the Replication Origin of *Escherichia coli* by DnaA Protein with Protein HU or IHF." *The Journal of Biological Chemistry* 267(32):23083–86.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 1994. "Infections with *Helicobacter pylori*." Pp. 177–240 in *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori*. Lyon: World Health Organization.
- Ishida, Takuma, Nobuyoshi Akimitsu, Tamami Kashioka, Masakazu Hatano, Toshio Kubota, Yasuyuki Ogata, Kazuhisa Sekimizu, and Tsutomu Katayama. 2004. "DiaA, a Novel DnaA-

- Binding Protein, Ensures the Timely Initiation of Escherichia Coli Chromosome Replication." *The Journal of Biological Chemistry* 279(44):45546-55.
- Jacob, François, Sydney Brenner, and François Cuzin. 1963. "On the Regulation of DNA Replication in Bacteria." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 28:329-48.
- Jameson, Katie H., Nadia Rostami, Mark J. Fogg, Johan P. Turkenburg, Anne Grahl, Heath Murray, and Anthony J. Wilkinson. 2014. "Structure and Interactions of the Bacillus Subtilis Sporulation Inhibitor of DNA Replication, SirA, with Domain I of DnaA." *Molecular Microbiology* 93(5):975-91.
- Jaworski, Pawel, Rafal Donczew, Thorsten Mielke, Marcel Thiel, Stanislaw Oldziej, Christoph Weigel, and Anna Magdalena Pawlik. 2016. "Unique and Universal Features of Epsilonproteobacterial Origins of Chromosome Replication and DnaA-DnaA Box Interactions." *Evolutionary and Genomic Microbiology* 7:1555.
- Jaworski, Pawel, Rafal Donczew, Thorsten Mielke, Christoph Weigel, Kerstin Stingl, and Anna Zawilak-Pawlik. 2018. "Structure and Function of the Campylobacter Jejuni Chromosome Replication Origin." *Frontiers in Microbiology* 9:1533.
- Jaworski, Pawel, Małgorzata Nowaczyk, Rafal Donczew, Thorsten Mielke, Christoph Weigel, and Anna Zawilak-Pawlik. 2019. "Helicobacter Pylori Replication Initiation Complex Formation Is Stabilized by Cooperative ATP-DnaA Binding to DnaA Boxes and DnaA-Trio Motif. Stabilization of Helicobacter Pylori Replication Initiation Complex by Cooperative ATP-DnaA Binding to Ss- and Ds."
- Kaguni, Jon M. 2011. "Replication Initiation at the Escherichia Coli Chromosomal Origin." *Current Opinion in Chemical Biology* 15(5):606-13.
- Katayama, Tsutomu. 2017. "Initiation of DNA Replication at the Chromosomal Origin of E. Coli, OriC." Pp. 79-98 in *DNA Replication: From Old Principles to New Discoveries*, edited by H. Masai and M. Foiani. Singapore: Springer Singapore.
- Katayama, Tsutomu, Kazutoshi Kasho, and Hironori Kawakami. 2017. "The DnaA Cycle in Escherichia Coli: Activation, Function and Inactivation of the Initiator Protein." *Frontiers in Microbiology* 8(DEC):1-15.

- Katayama, Tsutomu, Shogo Ozaki, Kenji Keyamura, and Kazuyuki Fujimitsu. 2010. "Regulation of the Replication Cycle: Conserved and Diverse Regulatory Systems for DnaA and OriC." *Nature Reviews. Microbiology* 8(3):163–70.
- Kawakami, Hironori and Tsutomu Katayama. 2010. "DnaA, ORC, and Cdc6: Similarity beyond the Domains of Life and Diversity." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 88(1):49–62.
- Kawakami, Hironori, Kenji Keyamura, and Tsutomu Katayama. 2005. "Formation of an ATP-DnaA-Specific Initiation Complex Requires DnaA Arginine 285, a Conserved Motif in the AAA+ Protein Family." *The Journal of Biological Chemistry* 280(29):27420–30.
- Kawakami, Hironori, Shogo Ozaki, Shigeo Suzuki, Kenta Nakamura, Takayuki Senriuchi, Masayuki Su'etsugu, Kazuyuki Fujimitsu, and Tsutomu Katayama. 2006. "The Exceptionally Tight Affinity of DnaA for ATP/ADP Requires a Unique Aspartic Acid Residue in the AAA+ Sensor 1 Motif." *Molecular Microbiology* 62(5):1310–24.
- Keyamura, Kenji, Yoshito Abe, Masahiro Higashi, Tadashi Ueda, and Tsutomu Katayama. 2009. "DiaA Dynamics Are Coupled with Changes in Initial Origin Complexes Leading to Helicase Loading." *The Journal of Biological Chemistry* 284(37):25038–50.
- Keyamura, Kenji, Norie Fujikawa, Takuma Ishida, Shogo Ozaki, Masayuki Su'etsugu, Kazuyuki Fujimitsu, Wataru Kagawa, Shigeyuki Yokoyama, Hitoshi Kurumizaka, and Tsutomu Katayama. 2007. "The Interaction of DiaA and DnaA Regulates the Replication Cycle in E. Coli by Directly Promoting ATP DnaA-Specific Initiation Complexes." *Genes & Development* 21(16):2083–99.
- Keyamura, Kenji and Tsutomu Katayama. 2011. "DnaA Protein DNA-Binding Domain Binds to Hda Protein to Promote Inter-AAA+ Domain Interaction Involved in Regulatory Inactivation of DnaA." *The Journal of Biological Chemistry* 286(33):29336–46.
- Ladner, Carol L., Jing Yang, Raymond J. Turner, and Robert A. Edwards. 2004. "Visible Fluorescent Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels without Staining." 326:13–20.
- Leonard, Alan C. and Marcel Méchali. 2013. "DNA Replication Origins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(10):a010116.

- Lu, M., J. L. Campbell, E. Boye, and N. Kleckner. 1994. "SeqA: A Negative Modulator of Replication Initiation in *E. Coli*." *Cell* 77(3):413–26.
- Lundgren, M., A. Andersson, L. Chen, P. Nilsson, and R. Bernander. 2004. "Three Replication Origins in *Sulfolobus* Species: Synchronous Initiation of Chromosome Replication and Asynchronous Termination." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(18):7046–51.
- Majka, J., J. Zakrzewska-Czerwińska, and W. Messer. 2001. "Sequence Recognition, Cooperative Interaction, and Dimerization of the Initiator Protein DnaA of *Streptomyces*." *The Journal of Biological Chemistry* 276(9):6243–52.
- Malaty, Hoda M. 2007. "Epidemiology of *Helicobacter Pylori* Infection." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 21(2):205–14.
- Martin, Eleya, Matthaios Pitoulias, Daniel Stevens, Mark S. Searle, Heath Murray, Timothy D. Craggs, Eleya Martin, Charles Winterhalter, Panos Soultanas, and Huw E. L. Williams. 2018. "DNA Replication Initiation in *Bacillus Subtilis*: Structural and Functional Characterization of the Essential DnaA–DnaD Interaction." *Nucleic Acids Research* 1–12.
- Maru, Y., D. E. Afar, O. N. Witte, and M. Shibuya. 1996. "The Dimerization Property of Glutathione S-Transferase Partially Reactivates Bcr-Abl Lacking the Oligomerization Domain." *The Journal of Biological Chemistry* 271(26):15353–57.
- Matsunaga, Fujihiko, Cédric Norais, Patrick Forterre, and Hannu Myllykallio. 2003. "Identification of Short 'eukaryotic' Okazaki Fragments Synthesized from a Prokaryotic Replication Origin." *EMBO Reports* 4(2):154–58.
- Matsunaga, Fujihiko, Kie Takemura, Masaki Akita, Akinori Adachi, Takeshi Yamagami, and Yoshizumi Ishino. 2009. "Localized Melting of Duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA Replication Origin in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*." *Extremophiles* 14(1):21–31.
- Matthews, Lindsay A. and Lyle A. Simmons. 2018. "Cryptic Protein Interactions Regulate DNA Replication Initiation." *Molecular Microbiology*.
- McGee, D. J. and H. L. Mobley. 2000. "Pathogenesis of *Helicobacter Pylori* Infection." *Current Opinion in Gastroenterology* 16(1):24–31.

- Méchalí, Marcel. 2010. "Eukaryotic DNA Replication Origins: Many Choices for Appropriate Answers." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11(10):728–38.
- Messer, W., F. Blaesing, J. Majka, J. Nardmann, S. Schaper, A. Schmidt, H. Seitz, C. Speck, D. Tüngler, G. Wegrzyn, C. Weigel, M. Welzeck, and J. Zakrzewska-Czerwinska. 1999. "Functional Domains of DnaA Proteins." *Biochimie* 81(8–9):819–25.
- Messer, Walter. 2002. "The Bacterial Replication Initiator DnaA. DnaA and OriC, the Bacterial Mode to Initiate DNA Replication." *FEMS Microbiology Reviews* 26(4):355–74.
- Messer, Walter and Christoph Weigel. 2003. "DnaA as a Transcription Regulator." *Methods in Enzymology* 370:338–49.
- Mizushima, Tohru, Tohru Takaki, Toshio Kubota, Tomofusa Tsuchiya, Takeyoshi Miki, Tsutomu Katayama, and Kazuhisa Sekimizu. 1998. "Site-Directed Mutational Analysis for the ATP Binding Of." 273(33):20847–51.
- Molt, Kathryn L., Vincent A. Suter, Kathryn K. Moore, and Susan T. Lovett. 2009. "A Role for Nonessential Domain II of Initiator Protein, DnaA, in Replication Control." *Genetics* 183(1):39–49.
- Moriya, S., Y. Imai, A. K. Hassan, and N. Ogasawara. 1999. "Regulation of Initiation of *Bacillus Subtilis* Chromosome Replication." *Plasmid* 41(1):17–29.
- Moss, Steven F. and Peter Malfertheiner. 2007. "Helicobacter and Gastric Malignancies." *Helicobacter* 12(s1):23–30.
- Mott, Melissa L. and James M. Berger. 2007. "DNA Replication Initiation: Mechanisms and Regulation in Bacteria." *Nature Reviews. Microbiology* 5(5):343–54.
- Natrajan, Ganesh, Marie Françoise Noirot-Gros, Anna Zawilak-Pawlik, Ulrike Kapp, and Laurent Terradot. 2009. "The Structure of a DnaA/HobA Complex from *Helicobacter Pylori* Provides Insight into Regulation of DNA Replication in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(50):21115–20.
- Nieduszynski, Conrad A., Yvonne Knox, and Anne D. Donaldson. 2006. "Genome-Wide Identification of Replication Origins in Yeast by Comparative Genomics." *Genes and Development* 20(14):1874–79.

- Nishida, Satoshi, Kazuyuki Fujimitsu, Kazuhisa Sekimizu, Tadahiro Ohmura, Tadashi Ueda, and Tsutomu Katayama. 2002. "A Nucleotide Switch in the Escherichia Coli DnaA Protein Initiates Chromosomal Replication. Evidence from a Mutant DnaA Protein Defective in Regulatory ATP Hydrolysis in Vitro and in Vivo." *Journal of Biological Chemistry* 277(17):14986-95.
- Norais, Cédric, Michelle Hawkins, Amber L. Hartman, Jonathan A. Eisen, Hannu Myllykallio, and Thorsten Allers. 2007. "Genetic and Physical Mapping of DNA Replication Origins in *Haloferax Volcanii*." *PLoS Genetics* 3(5):729-43.
- Nozaki, Shingo and Tohru Ogawa. 2008. "Determination of the Minimum Domain II Size of Escherichia Coli DnaA Protein Essential for Cell Viability." *Microbiology (Reading, England)* 154(Pt 11):3379-84.
- Obita, Takayuki, Yoshitsugu Tanaka, Yoichiro Yoshida, Masayuki Su'etsugu, Taiji Imoto, Takafumi Iwura, Tadashi Ueda, and Tsutomu Katayama. 2002. "Determination of the Secondary Structure in Solution of the Escherichia Coli DnaA DNA-Binding Domain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299(1):42-48.
- Ozaki, Shogo and Tsutomu Katayama. 2009. "DnaA Structure, Function, and Dynamics in the Initiation at the Chromosomal Origin." *Plasmid* 62(2):71-82.
- Ozaki, Shogo and Tsutomu Katayama. 2012. "Highly Organized DnaA-OriC Complexes Recruit the Single-Stranded DNA for Replication Initiation." *Nucleic Acids Research* 40(4):1648-65.
- Ozaki, Shogo, Hironori Kawakami, Kenta Nakamura, Norie Fujikawa, Wataru Kagawa, Sam-Yong Park, Shigeyuki Yokoyama, Hitoshi Kurumizaka, and Tsutomu Katayama. 2008. "A Common Mechanism for the ATP-DnaA-Dependent Formation of Open Complexes at the Replication Origin." *The Journal of Biological Chemistry* 283(13):8351-62.
- Ozaki, Shogo, Yasunori Noguchi, Yasuhisa Hayashi, Erika Miyazaki, and Tsutomu Katayama. 2012. "Differentiation of the DnaA-OriC Subcomplex for DNA Unwinding in a Replication Initiation Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 287(44):37458-71.
- Pawlik, Andrzej and Alina Grzanka. 2010. "MOLEKULARNE PODŁOŻE REPLIKACJI I ENDOREDUPLIKACJI." 1:363-80.

- Rahn-Lee, Lilah, Boris Gorbatyuk, Ole Skovgaard, and Richard Losick. 2009. "The Conserved Sporulation Protein YneE Inhibits DNA Replication in *Bacillus Subtilis*." *Journal of Bacteriology* 191(11):3736–39.
- Ran, Liang, John Larsson, Theoden Vigil-Stenman, Johan A. A. Nylander, Karolina Ininbergs, Wei-Wen Zheng, Alla Lapidus, Stephen Lowry, Robert Haselkorn, and Birgitta Bergman. 2010. "Genome Erosion in a Nitrogen-Fixing Vertically Transmitted Endosymbiotic Multicellular Cyanobacterium." *PLOS ONE* 5(7):e11486.
- Rao, Prassanna, Tania A. Rozgaja, Abdulaziz Alqahtani, Julia E. Grimwade, and Alan C. Leonard. 2018. "Low Affinity DnaA-ATP Recognition Sites in *E. Coli* OriC Make Non-Equivalent and Growth Rate-Dependent Contributions to the Regulated Timing of Chromosome Replication." *Frontiers in Microbiology* 9:1673.
- Richardson, Tomas T., Omar Harran, and Heath Murray. 2016. "The Bacterial DnaA-Trio Replication Origin Element Specifies Single-Stranded DNA Initiator Binding." *Nature* 534(7607):412–16.
- Robinson, N. P. and S. D. Bell. 2007. "Extrachromosomal Element Capture and the Evolution of Multiple Replication Origins in Archaeal Chromosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(14):5806–11.
- Robinson, Nicholas P., Isabelle Dionne, Magnus Lundgren, Victoria L. Marsh, Rolf Bernander, and Stephen D. Bell. 2004. "Identification of Two Origins of Replication in the Single Chromosome of the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *Cell* 116(1):25–38.
- Salih, BarikA. 2009. "*Helicobacter Pylori* Infection in Developing Countries: The Burden for How Long?" *Saudi Journal of Gastroenterology* 15(3):201.
- Saxena, Rahul, Tania Rozgaja, Julia Grimwade, and Elliott Crooke. 2011. "Remodeling of Nucleoprotein Complexes Is Independent of the Nucleotide State of a Mutant AAA+ Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 286(39):33770–77.
- Schaper, S. and W. Messer. 1995. "Interaction of the Initiator Protein DnaA of *Escherichia Coli* with Its DNA Target." *The Journal of Biological Chemistry* 270(29):17622–26.
- Schaper, S., J. Nardmann, G. Lüder, R. Lurz, C. Speck, and W. Messer. 2000. "Identification of the

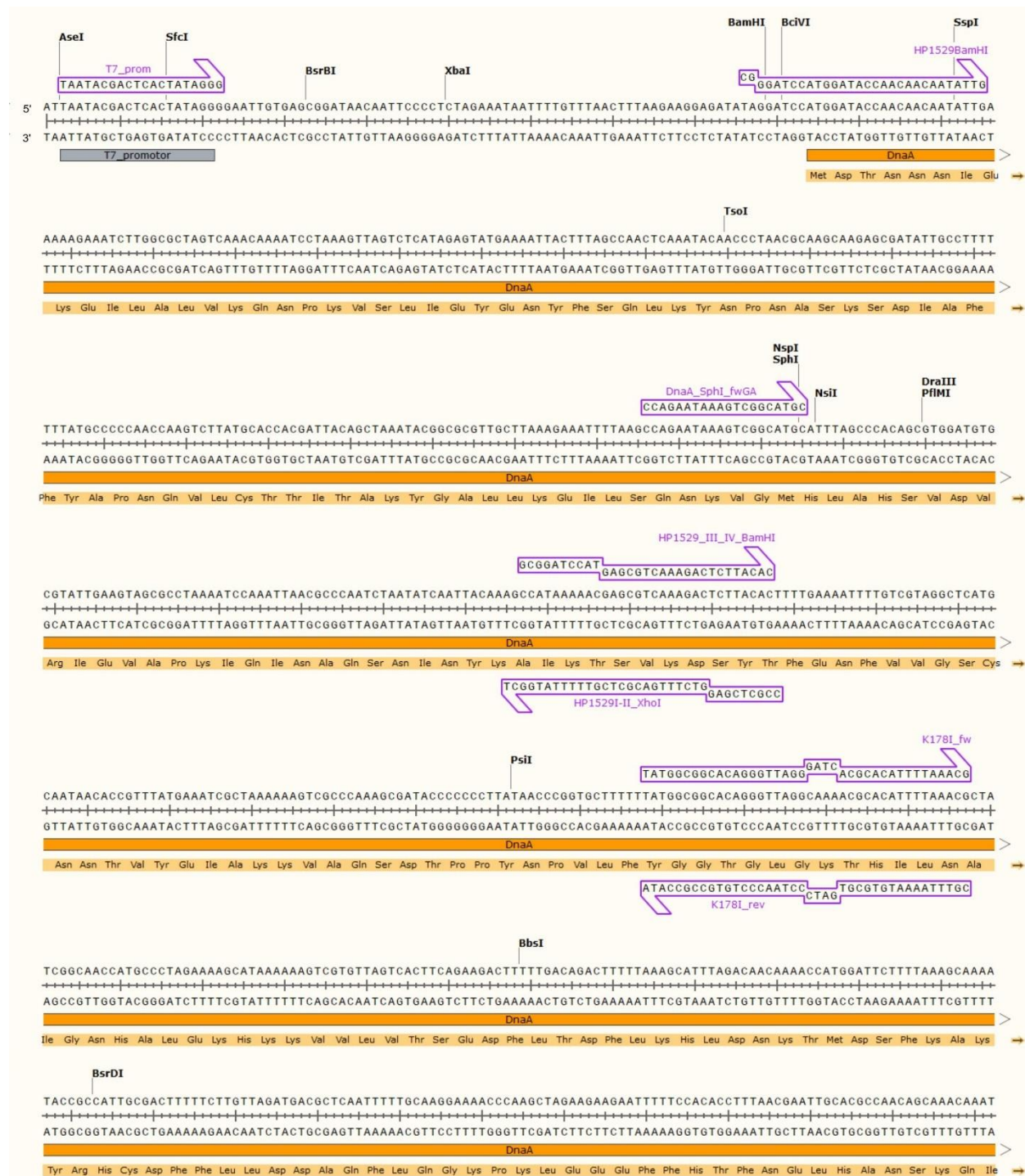
- Chromosomal Replication Origin from *Thermus Thermophilus* and Its Interaction with the Replication Initiator DnaA." *Journal of Molecular Biology* 299(3):655–65.
- Schmidt, Thomas G. M. and Arne Skerra. 2007. "The Strep-Tag System for One-Step Purification and High-Affinity Detection or Capturing of Proteins." *Nature Protocols* 2(6):1528–35.
- Shimizu, Masahiro, Yasunori Noguchi, Yukari Sakiyama, Hironori Kawakami, Tsutomu Katayama, and Shoji Takada. 2016. "Near-Atomic Structural Model for Bacterial DNA Replication Initiation Complex and Its Functional Insights." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(50):E8021--E8030.
- Simmons, Lyle A., Magdalena Felczak, and Jon M. Kaguni. 2003. "DnaA Protein of *Escherichia Coli*: Oligomerization at the *E. Coli* Chromosomal Origin Is Required for Initiation and Involves Specific N-Terminal Amino Acids." *Molecular Microbiology* 49(3):849–58.
- Smith, Janet L. and Alan D. Grossman. 2015. "In Vitro Whole Genome DNA Binding Analysis of the Bacterial Replication Initiator and Transcription Factor DnaA." *PLoS Genetics* 11(5):e1005258.
- Smith, R. W. P., Sean McAteer, and Millicent Masters. 1997. "Autoregulation of the *Escherichia Coli* Replication Initiator Protein, DnaA, Is Indirect." *Molecular Microbiology* 23(6):1303–15.
- Speck, C. and W. Messer. 2001. "Mechanism of Origin Unwinding: Sequential Binding of DnaA to Double- and Single-Stranded DNA." *The EMBO Journal* 20(6):1469–76.
- Su'etsugu, Masayuki, Yuji Harada, Kenji Keyamura, Chika Matsunaga, Kazutoshi Kasho, Yoshito Abe, Tadashi Ueda, and Tsutomu Katayama. 2013. "The DnaA N-Terminal Domain Interacts with Hda to Facilitate Replicase Clamp-Mediated Inactivation of DnaA." *Environmental Microbiology* 15(12):3183–95.
- Sutton, M. D., K. M. Carr, M. Vicente, and J. M. Kaguni. 1998. "*Escherichia Coli* DnaA Protein. The N-Terminal Domain and Loading of DnaB Helicase at the *E. Coli* Chromosomal Origin." *The Journal of Biological Chemistry* 273(51):34255–62.
- Sutton, M D and J. M. Kaguni. 1997. "The *Escherichia Coli* DnaA Gene: Four Functional Domains." *Journal of Molecular Biology* 274(4):546–61.
- Sutton, Mark D. and Jon M. Kaguni. 1997. "Threonine 435 of *Escherichia Coli* DnaA Protein

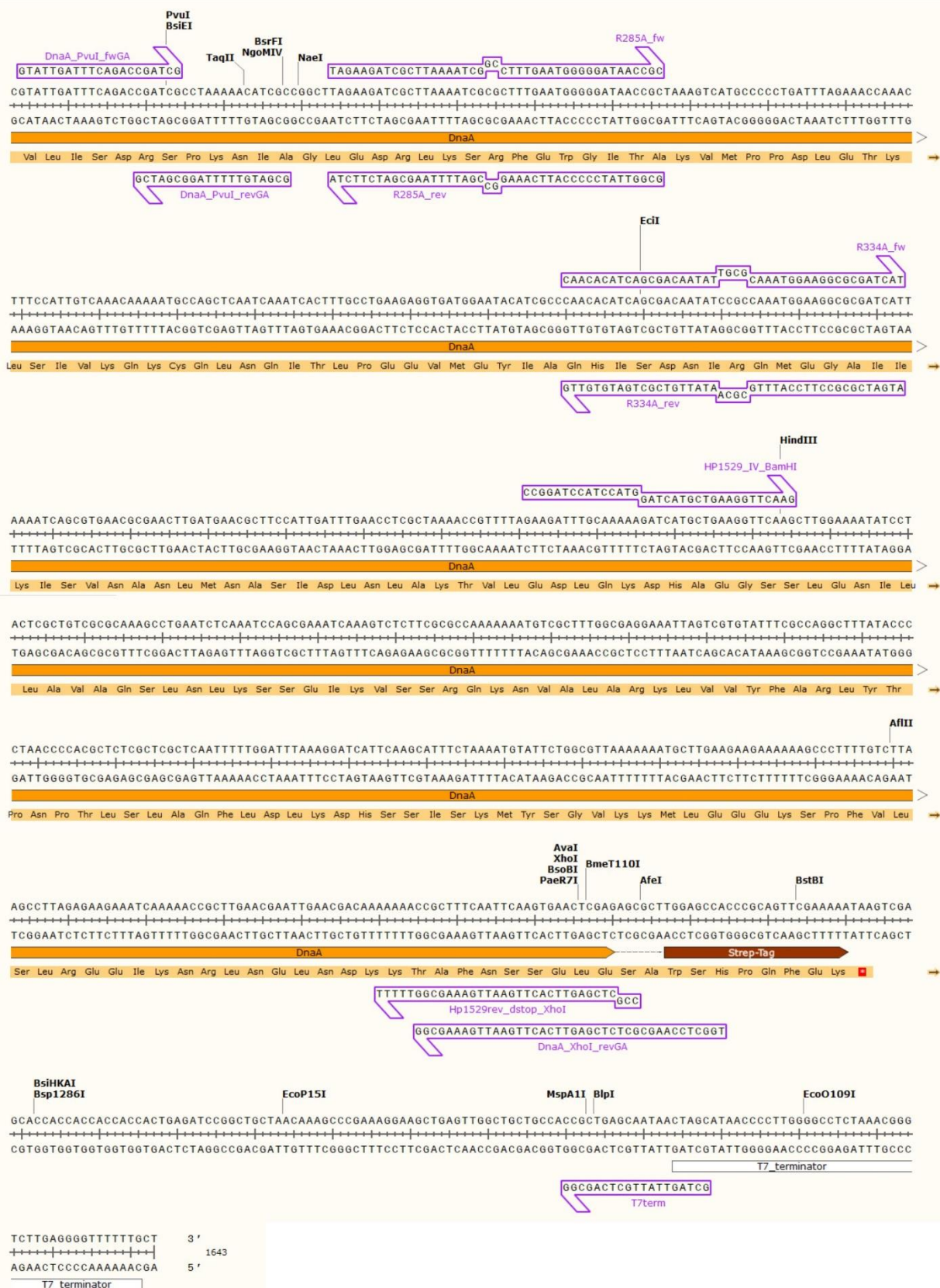
- Confers Sequence-Specific DNA Binding Activity." *Journal of Biological Chemistry* 272(37):23017-24.
- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1997. "The Complete Genome Sequence of the Gastric Pathogen *Helicobacter Pylori*." *Nature* 388(6642):539-47.
- Velten, Marion, Stephen McGovern, Stéphanie Marsin, S. Dusko Ehrlich, Philippe Noirot, and Patrice Polard. 2003. "A Two-Protein Strategy for the Functional Loading of a Cellular Replicative DNA Helicase." *Molecular Cell* 11(4):1009-20.
- Weigel, C., A. Schmidt, B. Rückert, R. Lurz, and W. Messer. 1997. "DnaA Protein Binding to Individual DnaA Boxes in the Escherichia Coli Replication Origin, OriC." *The EMBO Journal* 16(21):6574-83.
- Weigel, C., A. Schmidt, H. Seitz, D. Tüngler, M. Welzeck, and W. Messer. 1999. "The N-Terminus Promotes Oligomerization of the Escherichia Coli Initiator Protein DnaA." *Molecular Microbiology* 34(1):53-66.
- Wolański, Marcin, Rafał Donczew, Anna Zawilak-Pawlik, and Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. 2014. "OriC-Encoded Instructions for the Initiation of Bacterial Chromosome Replication." *Frontiers in Microbiology* 5:735.
- Zakrzewska-Czerwińska, J., D. Jakimowicz, J. Majka, W. Messer, and H. Schrempf. 2000. "Initiation of the Streptomyces Chromosome Replication." *Antonie Van Leeuwenhoek* 78(3-4):211-21.
- Zawilak-Pawlik, Anna, Szymon Donczew Rafałand Szafranski, Laurent Mackiewicz Pawełand Terradot, and Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. 2011. "DiaA/HobA and DnaA: A Pair of Proteins Co-Evolved to Cooperate during Bacterial Orisome Assembly." *Journal of Molecular Biology* 408(2):238-51.

- Zawilak-Pawlik, Anna, Agnieszka Kois, Jerzy Majka, Dagmara Jakimowicz, Aleksandra Smulczyk-Krawczynsyn, Walter Messer, and Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. 2005. "Architecture of Bacterial Replication Initiation Complexes: Orisomes from Four Unrelated Bacteria." *The Biochemical Journal* 389(Pt 2):471-81.
- Zawilak-Pawlik, Anna, Agnieszka Kois, Kerstin Stingl, Ivo G. Boneca, Paulina Skrobuk, Jakimowicz Piotr, Rudi Lurz, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska, and Agnès Labigne. 2007. "HobA--a Novel Protein Involved in Initiation of Chromosomal Replication in *Helicobacter Pylori*." *Molecular Microbiology* 65(4):979-94.
- Zawilak-Pawlik, Anna, Małgorzata Nowaczyk, and Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. 2017. "The Role of the N-Terminal Domains of Bacterial Initiator DnaA in the Assembly and Regulation of the Bacterial Replication Initiation Complex." *Genes* 8(5).
- Zawilak, A., S. Cebrat, P. Mackiewicz, A. Król-Hulewicz, D. Jakimowicz, W. Messer, G. Gosciniak, and J. Zakrzewska-Czerwinska. 2001. "Identification of a Putative Chromosomal Replication Origin from *Helicobacter Pylori* and Its Interaction with the Initiator Protein DnaA." *Nucleic Acids Research* 29(11):2251-59.
- Zawilak, Anna, Marcus C. Durrant, Piotr Jakimowicz, Steffen Backert, and Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. 2003. "DNA Binding Specificity of the Replication Initiator Protein, DnaA from *Helicobacter Pylori*." *Journal of Molecular Biology* 334(5):933-47.

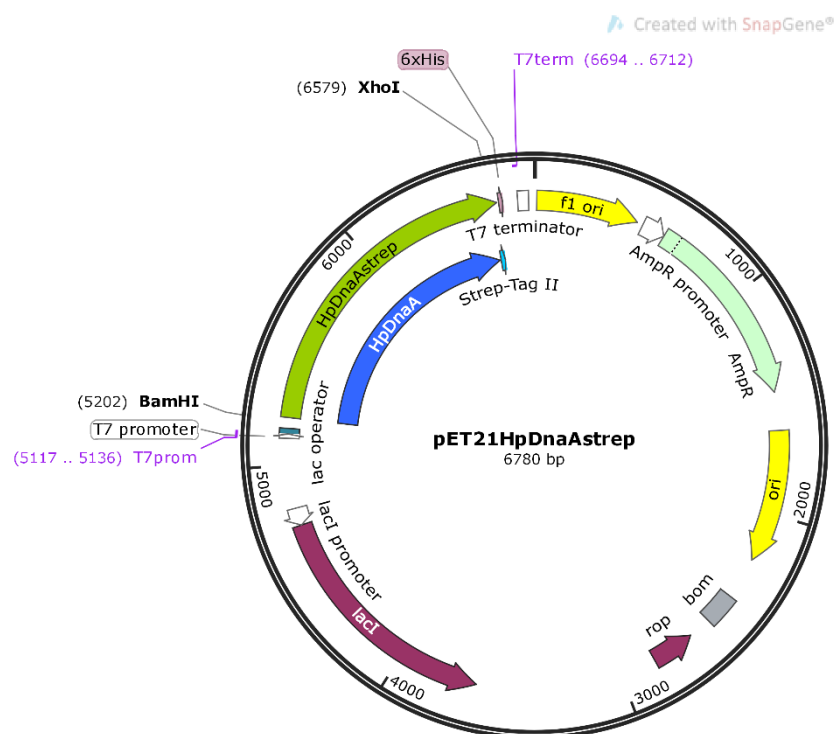
8. ZALĄCZNIKI

Załącznik 1 Schemat przedstawia fragment sekwencji plazmidu pET21HpDnaAstrep znajdujący się pomiędzy sekwencjami promotora i terminatora T7. Na sekwencji zaznaczono startery stosowane podczas konstruowania wersji genu *dnaA*

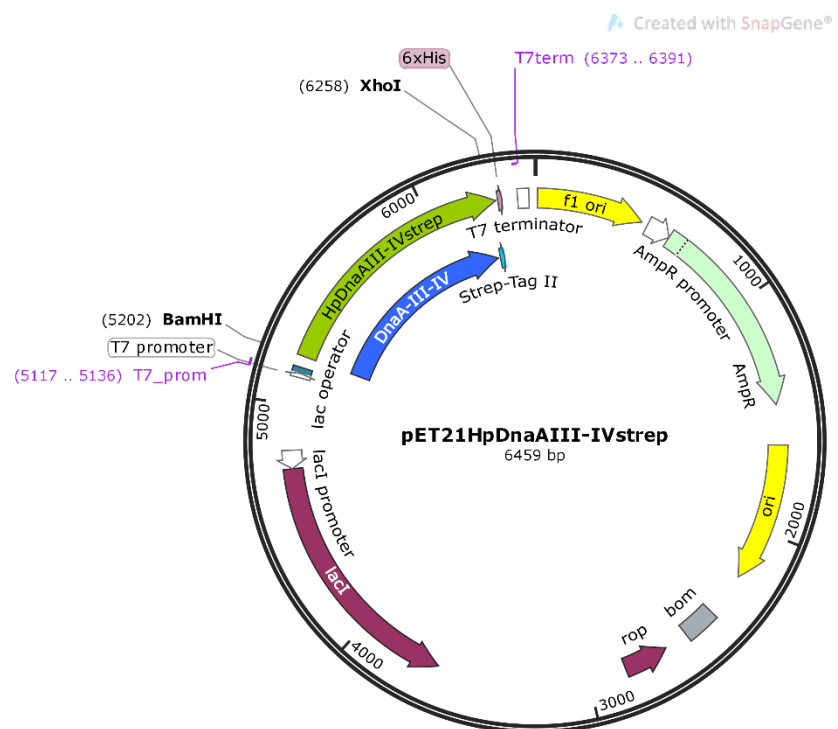




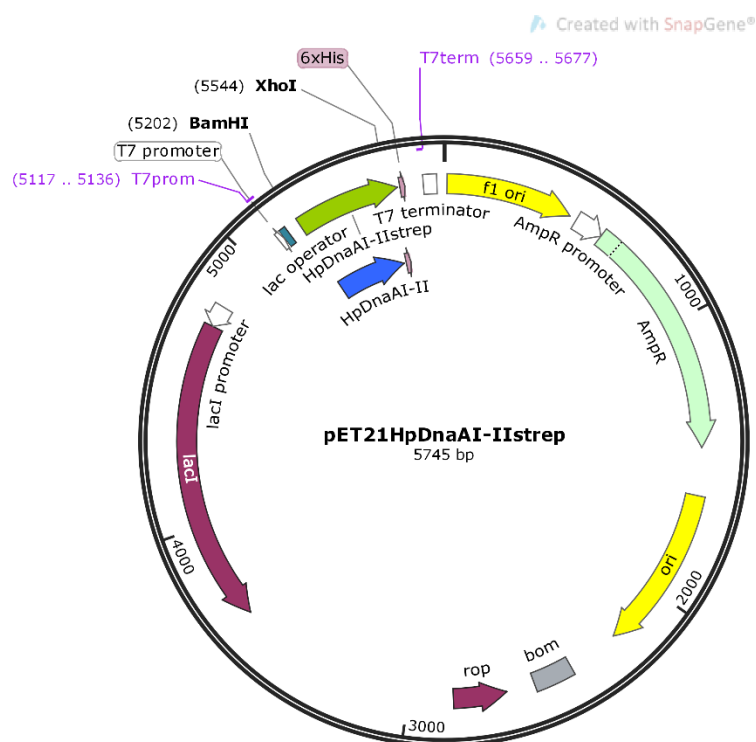
Załącznik 2 Mapa wektora pET21HpDnaAstrep



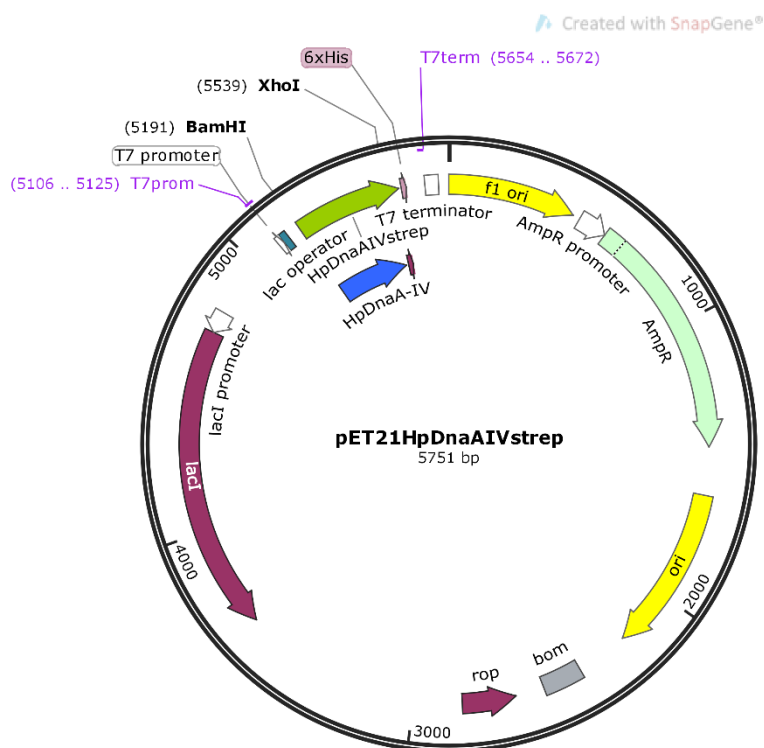
Załącznik 3 Mapa wektora pET21HpDnaAIII-IVstrep



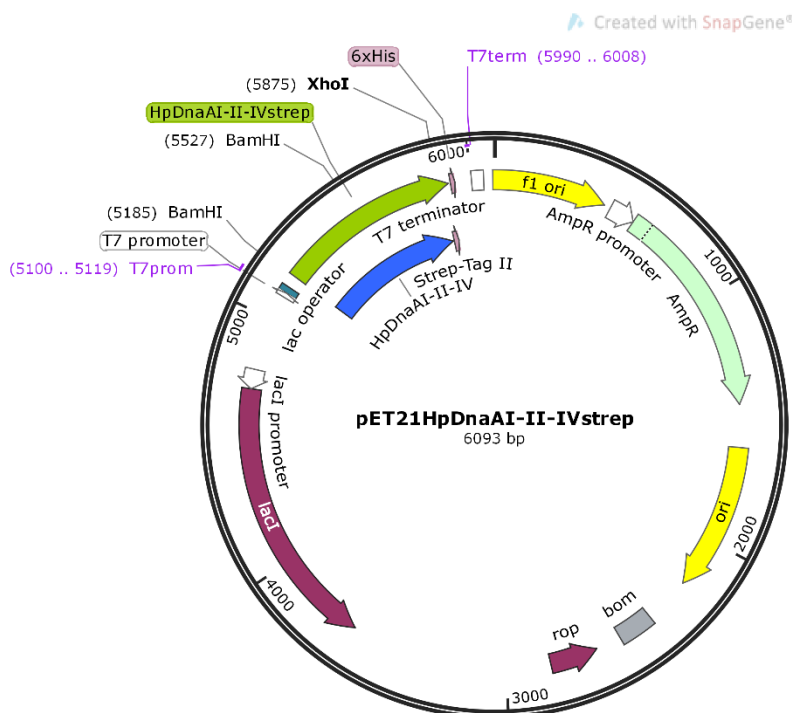
Załącznik 4 Mapa wektora pET21HpDnaAI-IIstrep



Załącznik 5 Mapa wektora pET21HpDnaAIVstrep



Załącznik 6 Mapa wektora pET21HpDnaAI-II-IVstrep



Załącznik 7 Wydajność indukcji syntezy białka DnaA w zależności od zastosowanego wektora. P1 *dnaA:dnaA-gfp* – szczep *H. pylori* w którym w dzikim locus na chromosomie znajduje się gen *dnaA-gfp* (Zawilak et al. 2003); N6 Δ *dnaA_L* – szczep *H. pylori* w którym w dzikim locus na chromosomie znajduje się kasetta kanamycynowa, a kopia genu *dnaA* znajduje się na wektorze pILL2150 (Zawilak-Pawlik et al. 2007); N6 Δ *dnaA_H* – szczep *H. pylori* w którym w dzikim locus na chromosomie znajduje się kasetta kanamycynowa, a kopia genu *dnaA* znajduje się na wektorze pILL2157; N6 szczep dziki – kontrolny szczep bez modyfikacji; N6 pILL2150 – szczep *H. pylori* z wprowadzonym pustym wektorem pILL2150. Detekcja: I-rzędowe: królicze poliklonalne anty-HpDnaA IgG, oczyszczone za pomocą chromatografii powinowactwa do białka 6HisDnaA *H. pylori*; II-rzędowe: ośle, anty-królicze przeciwciała, skoniugowane z peroksydazą chrzanową ((Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab) GE Healthcare, NA934-1ML). Reakcja wywołana chemiluminescencyjnie.

