

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 region 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.