

Piotr Szczepanowski

Charakterystyka sierocego regulatora odpowiedzi

HP1021 jako potencjalnego sensora redoks

Helicobacter pylori

(Rozprawa doktorska)

Promotor: dr hab. Anna Pawlik

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Wrocław 2021

*Praca doktorska wykonana w ramach Studium Doktoranckiego Instytutu Immunologii
i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk.*

*Praca finansowana ze środków w ramach grantu SONATA BIS3 Narodowego Centrum Nauki
(DEC-2013/10/E/NZ1/00718).*

*Praca doktorska została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej i Mikrobiologii
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.*

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani dr hab. Annie Pawlik za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej, cierpliwość oraz wyrozumiałość.

Niniejszą pracę pragnę dedykować mojej Córcie, Żonie oraz Rodzicom.

Spis treści

Streszczenie	8
Abstract	9
1 Wstęp.....	10
1.1 <i>Helicobacter pylori</i>	10
1.2 Warunki bytowania <i>H. pylori</i>	10
1.3 Wybrane systemy regulatorowe <i>H. pylori</i>	12
1.3.1 Systemy dwuskładnikowe i sieroce regulatory odpowiedzi <i>H. pylori</i>	12
1.3.2 Geny <i>nikR</i> oraz <i>fur</i> w odpowiedzi na stres kwasowy <i>H. pylori</i>	14
1.4 Wybrane mechanizmy odpowiedzi <i>H. pylori</i> na stres oksydacyjny	15
1.5 Sensory redoks <i>Escherichia coli</i>	18
2 Cel pracy.....	22
3 Materiały i metody	23
3.1 Plazmidy i szczepy bakteryjne	23
3.1.1 Szczepy <i>E. coli</i>	23
3.1.2 Szczepy <i>H. pylori</i>	23
3.1.3 Plazmidy.....	24
3.2 Oligonukleotydy.....	26
3.3 Odczynniki i enzymy	28
3.4 Bufory i roztwory	28
3.5 Podłoża mikrobiologiczne.....	29
3.6 Hodowle mikroorganizmów	30
3.6.1 Hodowle <i>E. coli</i>	30
3.6.2 Hodowle <i>H. pylori</i>	30
3.7 Techniki wykorzystywane w pracy z DNA.....	31
3.7.1 Mini-izolacja plazmidów z komórek <i>E. coli</i> (tzw. miniprep).....	31
3.7.2 Izolacja plazmidów z komórek <i>E. coli</i> na średnią skalę (tzw. midiprep).....	31
3.7.3 Izolacja genomowego DNA z komórek <i>H. pylori</i>	32
3.7.4 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	32
3.7.5 Wzorzec mas cząsteczkowych DNA.....	32
3.7.6 Oczyszczanie DNA	32
3.7.7 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi.....	33
3.7.8 Defosforylacja 5' końców DNA	33
3.7.9 Ligacja.....	33
3.7.10 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	34
3.7.11 Reakcja PCR wydłużania nakładających się odcinków (OE-PCR)	35

3.7.12	Transformacja komórek <i>E. coli</i>	35
3.7.13	Transformacja komórek <i>H. pylori</i>	36
3.8	Techniki wykorzystywane w pracy z RNA	37
3.8.1	Izolacja całkowitego RNA z komórek <i>H. pylori</i>	37
3.8.2	Odwrotna transkrypcja RNA	37
3.8.3	Ilościowa reakcja PCR (qPCR)	38
3.9	Techniki wykorzystywane do pracy z białkami.....	38
3.9.1	Oznaczanie stężenia białka.....	38
3.9.2	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE)	39
3.9.3	Immunoblotting (Western Blotting)	40
3.10	Izolacja rekombinowanych białek HP1021, HP1021NDC, HP1021CDC, HP1021DC.....	42
3.11	Badanie oddziaływań białek z DNA.....	43
3.11.1	Opóźniona migracja kompleksów nukleoproteinowych w żelu poliakrylamidowym	43
3.11.2	Analiza oddziaływań nukleoproteinowych metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR).....	44
3.12	Badanie wiązania jonów cynku przez białko	45
3.13	Analiza obecności wolnych grup tiolowych <i>in vivo</i>	46
4	Wyniki.....	47
4.1	Charakterystyka białka HP1021 na podstawie analizy sekwencji i przewidywanej struktury drugo- i trzeciorzędowej.....	47
4.2	Analiza obecności wolnych grup tiolowych <i>in vivo</i> w białku HP1021.....	49
4.3	Izolacja rekombinowanych białek: HP1021 oraz muteiny HP1021DC	50
4.3.1	Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021	51
4.3.2	Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021DC	52
4.4	Charakterystyka białka HP1021	55
4.4.1	Analiza stanu redoks białka HP1021	55
4.5	Oddziaływanie białek HP1021 i HP1021DC z DNA.....	56
4.5.1	Badanie oddziaływania białek HP1021 i HP1021DC z DNA metodą EMSA.....	57
4.5.2	Badanie oddziaływania białek HP1021 i HP1021DC z DNA metodą SPR	59
4.6	Izolacja rekombinowanych białek HP1021NDC i HP1021CDC.....	62
4.6.1	Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021NDC.....	63
4.6.2	Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021CDC	65
4.7	Oddziaływanie białka HP1021NDC i HP1021CDC z DNA	67
4.7.1	Badanie oddziaływania białek HP1021NDC i HP1021CDC z DNA metodą EMSA	67
4.7.2	Badanie oddziaływania białek HP1021NDC i HP1021CDC metodą SPR.....	69
4.8	Analiza wiązania jonów Zn ²⁺ przez białko HP1021 oraz jego warianty.....	71

4.9	Analiza wiązania regionu <i>oriC2</i> przez HP1021 i jego muteiny w obecności jonów Zn²⁺	73
4.9.1	Badanie oddziaływania HP1021 i jego mutein z DNA w obecności jonów Zn ²⁺ metodą EMSA	73
4.9.2	Badanie oddziaływania HP1021 i jego mutein z DNA w obecności jonów Zn ²⁺ metodą SPR	78
4.10	Przygotowanie zmutowanych szczepów <i>H. pylori</i> z upośredzonym szlakiem regulacji zależnym od białka HP1021	83
4.10.1	Przygotowanie zmutowanego szczepu N6 HP1021ΔCys	83
4.10.2	Konstrukcja wektora pGEM1021Δcysaph-3	84
4.10.3	Przygotowanie szczepu komplementacyjnego N6ΔHP1021com	86
4.11	Analiza wzrostu hodowli bakterii szczepu dzikiego <i>H. pylori</i> N6 oraz szczepów zmutowanych N6Δ1021, N61021Δcys oraz N6Δ1021com	89
4.12	Analiza wpływu szoku oksydacyjnego na przeżywalność szczepów N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com <i>H. pylori</i>	90
4.13	Analiza ekspresji wybranych genów w szczepach <i>H. pylori</i> N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com w warunkach stresu oksydacyjnego	91
5	Dyskusja wyników	98
6	Wnioski	108
7	Piśmiennictwo	109
8	Spis tabel	123
9	Spis Rysunków	124
10	Załączniki	128
10.1	Załącznik 1. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C27, C51, C56 z miejscami trawienia enzymów BamHI oraz MunI.	128
10.2	Załącznik 2. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C27, C51, C56 z miejscami trawienia enzymów BamHI oraz Ascl.	128
10.3	Załącznik 3. Schemat białka dzikiego HP1021 oraz jego mutein z zaznaczeniem obecności reszt cystein w strukturze białka.	129
10.4	Załącznik 4. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C231, C253, C285 z miejscami trawienia enzymu NaeI.	129
10.5	Załącznik 5. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C231, C253, C285 z miejscami trawienia enzymów MunI oraz NaeI.	130
10.6	Załącznik 6. A Sekwencja <i>oriC2</i> z zaznaczonymi miejscami wiązania białka HP1021 B Sekwencja fragmentu genu <i>HP0180</i> (B)	130

Streszczenie

Helicobacter pylori jest Gram-ujemną, mikroaerofilną bakterią zasiedlającą środowisko ludzkiego układu pokarmowego. *H. pylori* rozwinęła szereg mechanizmów obronnych pozwalających jej przetrwać w niesprzyjających warunkach niszy żołądka, w tym w narażeniu na stres oksydacyjny. Jednakże dotychczas nie wykazano obecności u *H. pylori* typowego białka będącego sensorem stresu oksydacyjnego.

W ramach pracy doktorskiej skupiono się na charakterystyce mechanizmu regulacji sierocego regulatora odpowiedzi HP1021. W badaniach, na podstawie modelowania struktury, wykazano, że białko składa się prawdopodobnie z dwóch domen, N- i C-końcowej, przy czym domena C-końcowa zawiera motyw wiążący DNA (HTH). Co istotne, w każdej z potencjalnych domen białko posiada 3 reszty cystein. Ponieważ obecność reszt cystein w białku jest konserwatywna, często charakterystyczna dla regulatorów redoks, postawiono hipotezę, że HP1021 jest sensorem redoks *H. pylori*.

W dalszych badaniach wykazano wpływ warunków redoks na powinowactwo HP1021 do DNA w warunkach *in vitro*. Ponadto, wykazano, że HP1021 wiąże jony Zn^{2+} , przy czym oddziaływanie to jest zależne od warunków redoks oraz wpływa na powinowactwo HP1021 do DNA. Badania mutein HP1021, w których reszty cystein zostały zamienione na reszty alanin, wskazały na to, że domena N-końcowa może pełnić rolę regulatorową oraz, że wzajemne oddziaływanie dwóch domen może być istotne dla regulacji aktywności HP1021 zależnej od warunków redoks i jonów Zn^{2+} .

Badania *in vivo* wykazały utlenianie reszt cysteinowych w białku HP1021 po poddaniu hodowli bakteryjnej działaniu tlenu atmosferycznego. Ponadto wykazano, że HP1021 wpływa na transkrypcję wybranych genów po poddaniu hodowli bakteryjnej *H. pylori* działaniu stresu oksydacyjnego.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej świadczą o tym, że białko HP1021 pełni rolę sensora stresu oksydacyjnego u bakterii *H. pylori*.

Abstract

Helicobacter pylori is a gram-negative, microaerophilic bacterium inhabiting the environment of the human digestive system. *H. pylori* has developed several defence mechanisms to survive in the human stomach unfavourable conditions, including exposure to oxidative stress. However, the presence of a typical oxidative stress sensor protein in *H. pylori* has not been demonstrated so far.

This work focused on the characteristics of the HP1021 orphan response regulator's regulation mechanism. It was shown that a protein probably consists of two domains, the N- and C-terminal domains. The C-terminal domain contains the HTH DNA binding motif. Notably, the HP1021 protein has 3 cysteine residues in each of the potential domains. Since cysteine residues in a protein are usually conservative, and often found in redox regulators, it was hypothesized that HP1021 is an *H. pylori* redox sensor.

In further studies, it was shown that redox conditions affect the affinity of binding HP1021 to DNA *in vitro*. Moreover, it was shown that HP1021 binds Zn²⁺ ions and that the interaction is dependent on the redox conditions and influences the affinity of HP1021 binding to DNA. Studies of the HP1021 muteins, in which cysteine residues were changed into alanine residues, indicated that the N-terminal domain may play a regulatory role and that the interaction of the two domains may be important for the regulation of HP1021 activity dependent on redox conditions and Zn²⁺ ions.

In vivo studies showed oxidation of cysteine residues in the HP1021 protein after exposure of the bacterial culture to atmospheric oxygen. Moreover, it was shown that HP1021 influences the transcription of selected genes after subjecting *H. pylori* bacteria to oxidative stress.

The obtained results indicated that the HP1021 protein acts as a sensor of oxidative stress in *H. pylori*.

1 Wstęp

1.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori jest Gram-ujemną, mikroaerofilną, ruchliwą bakterią mierzącą od 2 do 4 μm długości oraz 0,5-1 μm szerokości¹. Gatunek ten zasiedla środowisko ludzkiego układu pokarmowego, a zakażenie najprawdopodobniej szerzy się drogą fekalno-oralną oraz oralno-oralną². *H. pylori* jest uznawana za czynnik etiologiczny zapaleń żołądka i wrzodów żołądka. Ponadto jej występowanie wiąże się z czynnikiem ryzyka wystąpienia gruczolakoraka żołądka i chłoniaka tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową (MALT, ang. *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*)^{3,4}. Występowanie tych bakterii w żołądku człowieka potwierdziło i opisało ponad 35 lat temu dwóch lekarzy, Barry Marshall oraz Robin Warren. Dokonali oni z powodzeniem izolacji oraz hodowli spiralnego gatunku bakterii znanego później jako *H. pylori*⁵. Za odkrycie nowego gatunku bakterii i dowiedzenie jego chorobotwórczości zostali nagrodzeni Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2005 roku. Występowanie *H. pylori* w ludzkiej populacji, według badań, szacowane jest na około 60%⁶, pomimo tego, wiele osób dotkniętych zakażeniem tą bakterią nie wykazuje objawów klinicznych⁷.

Bakteria ta rozwinęła cechy pozwalające jej zasiedlać unikalną i nieprzyjazną niszę ludzkiego żołądka, gdzie przeżywa w bliskim kontakcie z komórkami nabłonkowymi żołądka (Rys. 1). Ze względu na narażenie na działanie szeregu czynników stresowych, bakteria wykształciła szereg mechanizmów obronnych.

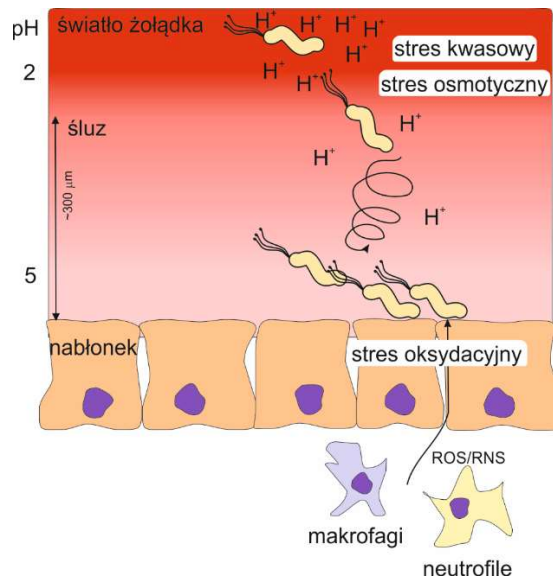
1.2 Warunki bytowania *H. pylori*

Środowisko bytowania powoduje narażenie bakterii *H. pylori* na niskie pH, stres oksydacyjny, jak również utrudnioną dostępność składników odżywczych, w tym jonów metali, oraz zmiany osmolarności^{8,9,10} (Rys. 1). W związku z tym przetrwanie *H. pylori* opiera się na działaniu szeregu systemów adaptacyjnych. Jak wspomniano, *H. pylori*, mikroaerofilna bakteria, żyje w środowisku żołądka, w którym okresowo poddawana jest działaniu bardzo niskiego pH ($\text{pH} \leq 2$)¹¹. Dlatego jednym z ważniejszych mechanizmów umożliwiających *H. pylori* zasiedlenie środowiska żołądka jest obecność ureazy (UreAB). Ureaza hydrolizuje mocznik do

amoniaku (NH_3) i dwutlenku węgla (CO_2). Powstające w komórce $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ i $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ są istotne w utrzymaniu homeostazy pH środowiska cytoplazmy i periplazmy^{12,13,11}. Ponadto, obecność bakterii powoduje pobudzenie komórek układu immunologicznego, które w odpowiedzi produkują toksyczne związki¹⁴. Aktywowane zostają makrofagi, neutrofile oraz monocyty w celu fagocytozy oraz poddania drobnoustrojów działaniu szkodliwych związków takich jak: reaktywne formy tlenu (ROS, *ang. reactive oxygen species*), czy reaktywne formy azotu (RNS, *ang. reactive nitrogen species*) (Tab. 1)^{14,15,16}. Ważną bronią, obecną w błonie plazmatycznej komórek układu immunologicznego, jak również w błonie fagolizosomu, skierowaną przeciwko bakteriom, jest kompleks oksydazy NADPH (NOX, *ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) redukujący tlen w celu wytworzenia anionorodników ponadtlenkowych (Tab. 1). W momencie gdy dochodzi do wykrycia zakażenia przez makrofagi, następuje zwiększone zużycie tlenu przez komórki i wytworzenie „wyrzutu” nadtlenków^{17,18}. Kolejne przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego skutkują powstaniem kolejnej reaktywnej formy tlenu, nadtlenku wodoru, posiadającego zdolność do swobodnej dyfuzji przez błony. Komórki odpornościowe produkują również drugi kluczowy enzym – syntazę tlenu azotu, produkującą tlenek azotu z L-argininy. Tlenek azotu reaguje z metalami, takimi jak Fe^{2+} w hemie, czy klastrami żelazowo-siarkowymi oraz, w połączeniu z nadtlenkiem, tworzy nadtlenoazotyn będący silnym utleniaczem. Wiele prac wskazuje na to, że ROS i RNS (*ang. reactive nitrogen species*), produkowane przez makrofagi aktywowane w przypadku zakażenia, przyczyniają się do śmierci bakterii na skutek uszkodzeń DNA, reszt aminokwasowych oraz centrów wiązania metali, prowadząc do ich inaktywacji^{19,20}.

Tab. 1. Reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNS).

Nazwa	Wzór chemiczny
Anionorodnik ponadtlenkowy	$\text{O}_2^{\bullet -}$
Nadtlenek wodoru	H_2O_2
Rodnik hydroksylowy	HO^{\bullet}
Rodnik wodoronadtlenkowy	HO_2^{\bullet}
Tlenek azotu	NO^{\bullet}
Dwutlenek azotu	NO_2^{\bullet}
Nadtlenoazotyn	OONO^-



Rys. 1. Schemat działania wybranych czynników stresowych na *H. pylori* w miejscu bytowania. Opis w tekście.

1.3 Wybrane systemy regulatorowe *H. pylori*

W genomie bakterii *H. pylori* występuje niewiele czynników związanych z funkcjami regulatorowymi w porównaniu do innych bakterii Gram-ujemnych. Dla przykładu, liczba regulatorowych systemów dwuskładnikowych, których zadaniem jest odpowiedź na zmiany środowiska na poziomie transkrypcyjnym, jest znacznie niższa niż u bakterii *E. coli*, u której wykazano obecność 24 kinaz histydynowych, 6 hybrydowych kinaz histydynowych oraz 31 regulatorów odpowiedzi. Dla porównania, u bakterii *H. pylori* wykazano obecność 3 kinaz histydynowych oraz 5 regulatorów odpowiedzi²¹.

1.3.1 Systemy dwuskładnikowe i sieroce regulatory odpowiedzi *H. pylori*

Systemy dwuskładnikowe odgrywają dużą rolę w adaptacji *H. pylori* w środowisku gospodarza oraz biorą udział w wielu mechanizmach m. in. w odpowiedzi na różne czynniki stresowe²². Systemy te składają się z kinazy będącej sensorem danego czynnika oraz regulatora odpowiedzi, będącego białkiem efektorowym²³.

W odpowiedzi na zmiany stężenia kobaltu, jak również na kwasowe środowisko i obecność tlenu azotu, uruchamiany jest system CrdRS²⁴. W odpowiedzi na pojawienie się reaktywnych form azotu aktywowany jest gen *crdS* kodujący kinazę. Wykazano, że delecja

jednego lub dwóch genów wchodzących w skład systemu CrdRS skutkuje zmniejszoną przeżywalnością w warunkach zwiększonego stężenia tlenu azotu²⁵. Wykazano również, iż system ten ułatwia bakterii *H. pylori* kolonizację żołądka myszy²⁶. FlgSR jest systemem regulującym aktywność genów związanych z syntezą rzęsek (ang. *flagella*)²⁷.

Systemem dwuskładnikowym, biorącym główny udział w odpowiedzi na kwasowe środowisko, jest ArsRS. Składa się on z kinazy ArsS, której jedna z domen zakotwiczona jest w periplazmie i prawdopodobnie odpowiada za wykrywanie niskiego pH, oraz z regulatora odpowiedzi ArsR. Dezaktywacja kinazy skutkuje brakiem zdolności do kolonizacji żołądka²⁶, podczas gdy regulator ArsR jest niezbędny do wzrostu bakterii *H. pylori* w warunkach *in vitro*²⁸. System ten reguluje między innymi transkrypcję genu ureazy (Rys. 2) poprzez związanie ufosforylowanego regulatora do promotora genów *ureAB* oraz operonu *ureIEFGH*²⁹. Wykazano również że system ten reguluje gen *rocF* kodujący arginazę³⁰. Arginaza produkuje mocznik i ornitynę poprzez hydrolizę argininy i sugeruje się, że enzym ten może przyczyniać się do ureazo-zależnej odporności na stres kwasowy w momencie, gdy występuje deficyt mocznika w środowisku³¹.

W regulacji homeostazy *H. pylori* biorą udział również dwa sieroce regulatory odpowiedzi, HP1043 i HP1021^{32,33}. Regulatory te należą do tzw. atypowych regulatorów odpowiedzi, których aktywność nie jest regulowana na drodze fosforylacji, jednak dotychczas nie zidentyfikowano czynników, które wpływałyby na aktywność HP1043 i HP1021. HP1043, znane również jako HsrA (ang. *homeostatic stress regulator*) jest niezbędne do przeżycia komórek *H. pylori*, a delecja genu jest letalna dla komórek *H. pylori*³⁴, o ile wcześniej nie wprowadzi się drugiej kopii genu do chromosomu^{33,34}. HP1043 jest regulatorem plejotropowym, uczestniczącym w regulacji wielu procesów. Wskazywano, że HP1043 może kontrolować ekspresję genów zależnie od fazy wzrostu hodowli lub cyklu komórkowego^{35,36}, a także w odpowiedzi na stres oksydacyjny³⁷. Dokładna liczba genów należących do regulonu HP1043 nie jest znana, jednak sugeruje się, że może to być nawet kilkadziesiąt genów kodujących białka uczestniczące w wielu procesach komórkowych (np. syntezie białek, transkrypcji, metabolizmie energetycznym komórki, ruchliwości, chemotaksji)^{34,35,38}. HP1021, podobnie jak HP1043, jest prawdopodobnie regulatorem plejotropowym, ale w przeciwieństwie do HP1043, delecja genu HP1021 nie jest letalna dla komórek *H. pylori*. Mutanty delecyjne HP1021 charakteryzują się znacznie opóźnionym wzrostem w stosunku do szczepów dzikich^{39,40}. Dotychczas wykazano, że usunięcie HP021 wpływa na transkrypcję 79

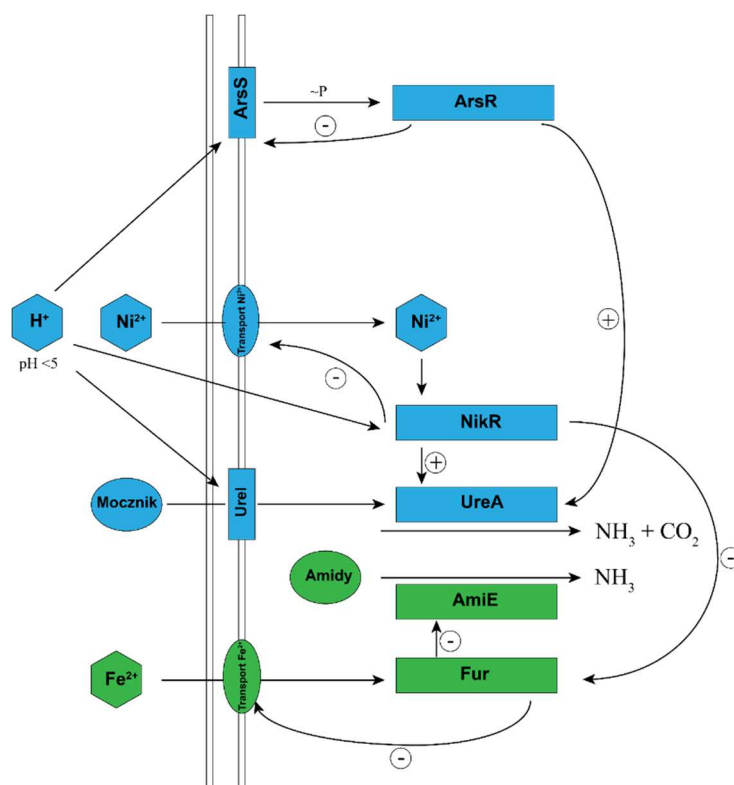
genów, w tym 51 genów podlega aktywacji, a 28 genów hamowaniu⁴¹ w komórkach pozbawionych białka HP1021. Regulowane geny kodują białka uczestniczące w wielu procesach komórkowych, w tym np. białka uczestniczące w procesach metabolizmu, transkrypcji i translacji, białka transportujące, białka biosyntezy kofaktorów i aminokwasów. HP1021 uczestniczy także prawdopodobnie w kontroli częstości inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori*⁴⁰. Jak wykazano, HP1021 oddziałuje z regionem *oriC2*, konkurując o miejsca wiązania z inicjatorowym białkiem DnaA i hamuje rozplatanie DNA *in vitro*⁴⁰.

1.3.2 Geny *nikR* oraz *fur* w odpowiedzi na stres kwasowy *H. pylori*

Jak wspomniano wcześniej, podczas obniżenia pH środowiska dochodzi do aktywacji systemów dwuskładnikowych, w tym systemu ArsRS. Wykazano, że niektóre geny będące pod kontrolą systemu ArsRS pozostają również pod kontrolą genów *nikR* oraz *fur*, co wskazuje na złożoną zależność regulacyjną w odpowiedzi na stres kwasowy⁴² (Rys. 2).

NikR i Fur są białkami, których aktywność zależy od jonów metali. NikR jest homologiem białka regulatorowego *E. coli* NikR zależnego od jonów niklu, które w obecności nadmiaru jonów niklu w cytoplazmie hamuje ekspresję operonu *nikABCDE* kodującego białka systemu odpowiedzialnego za pobieranie jonów niklu ze środowiska⁴³. Dla porównania, białko NikR *H. pylori* jest regulatorem plejotropowym działającym zarówno jako aktywator jak i represor transkrypcji genów, który w zależności od obecności jonów niklu reguluje geny *ureAB*, jak również geny kodujące białka zaangażowane w pobieranie i magazynowanie jonów niklu i żelaza oraz bierze udział w mechanizmach odpowiedzi na stres wywołany obecnością metali w środowisku⁴⁴. Ponadto wykazano, że NikR negatywnie reguluje swoją własną ekspresję⁴⁵.

W przypadku bakterii *H. pylori* białko Fur jest niezwykle ważne dla regulacji homeostazy jonów żelaza poprzez wpływ na białka odpowiedzialne za pobieranie i magazynowanie tego metalu. Związanie żelaza reguluje powinowactwo białka Fur do wiązania z promotorami. W przypadku obecności nadmiaru jonów żelaza, Fur staje się negatywnym autoregulatorem⁴⁶, natomiast jego transkrypcja jest hamowana w obecności niskiego pH, a w przypadku delecji genu *fur*, przeżywalność bakterii w kwasowym środowisku jest upośledzona⁴⁷.



Rys. 2. Wybrane mechanizmy regulacji ArsRS/NikR/Fur w odpowiedzi na niskie pH. Opis schematu znajduje się w rozdziałach 1.4.1 i 1.4.2.^{48,49}

1.4 Wybrane mechanizmy odpowiedzi *H. pylori* na stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest podstawowym, obok kwaśnego pH, czynnikiem działającym na *H. pylori* w miejscu jego bytowania. Jak już wspomniano (Rozdział. 1.2), infekcja prowadzi do aktywacji szeregu reakcji zapalnych oraz aktywacji układu odpornościowego, co powoduje uwolnienie reaktywnych form tlenu, takich jak nadtlenek wodoru czy anionorodnik ponadtlenkowy. Nadmierne wytwarzanie ROS i RNS wywołuje również stres oksydacyjny, powodujący uszkodzenie błony śluzowej żołądka gospodarza⁵⁰. W celu przeżycia w warunkach generowanych przez komórki gospodarza, *H. pylori* wykształciło szereg mechanizmów obronnych przed związkami ROS.

Jednym z podstawowych mechanizmów obronnych jest obecność dysmutazy ponadtlenkowej SodB, enzymu przekształcającego anionorodnik ponadtlenkowy w tlen oraz nadtlenek wodoru. SodB *H. pylori* wykazuje 53% podobieństwa sekwencji do dysmutazy występującej w *Escherichia coli*⁵¹. Dodatkowo enzym *H. pylori* posiada, podobnie jak SodB *Campylobacter jejuni*, przedłużony C-końcowy region, nieobecny w SodB *E. coli*. Sugeruje się, że region ten, odgrywa rolę w lokalizacji enzymu na powierzchni komórki^{52,53}. Jak wspomniano

wcześniej (Rozdział 1.2), przekształcenie anionorodnika ponadtlenkowego prowadzi do powstania nadtlenu wodoru, który musi zostać usunięty przez kolejne enzymy, aby chronić komórkę przed uszkodzeniami. Enzymami chroniącym przed letalnym stężeniem nadtlenu wodoru w komórce są katalaza oraz peroksyredoksyny.

Katalaza odgrywa kluczową rolę w przeżywalności organizmów narażonych na działanie nadtlenu wodoru. W przypadku bakterii Gram-ujemnych enzym ten jest zazwyczaj transportowany do periplazmy⁵⁴, przy czym część enzymu pozostaje w cytoplazmie. Genom *H. pylori* zawiera gen *katA* kodujący białko KatA, składające się z czterech identycznych podjednostek, z których każda posiada grupę prostetyczną hemu. Hem katalizuje dwustopniową reakcję utleniania-redukcji przekształcającą dwie cząsteczki nadtlenu wodoru w cząsteczkę tlenu i dwie cząsteczki wody⁵⁵. KatA w *H. pylori* pozostaje aktywne zarówno w cytoplazmie jak i przestrzeni periplazmatycznej⁵⁴. Delecja genu *katA* skutkuje wystąpieniem nadwrażliwości w przypadku ekspozycji na działanie nadtlenu wodoru⁵⁶. Dodatkowo *H. pylori* posiada związane z działaniem katalazy białko KapA. Białko to nie wpływa na aktywność samej katalazy, natomiast sugeruje się, że może być związane z mechanizmem przemieszczania KatA do przestrzeni periplazmatycznej i w ten sposób odgrywać rolę w mechanizmie obrony przed nadtlaniem wodoru^{54,57}. Ponadto wykazano również obecność katalazy w pęcherzykach błony zewnętrznej⁵⁸.

Pomimo tego, iż bakterie głównie wykorzystują katalazę do inaktywacji nadtlenu wodoru, również inne enzymy przyczyniają się do ograniczenia uszkodzeń powstałych na skutek występowania stresu oksydacyjnego. Do enzymów tych, zaliczyć można hydroperoksyreduktazę alkilową (AhpC) czy peroksydazę tioredoksyny (Tpx). Enzymy te można podzielić w zależności od mechanizmu na 1-Cys oraz 2-Cys peroksyredoksyny, posiadające odpowiednio jedną lub dwie konserwatywne reszty cystein⁵⁹. Obie klasy biorą udział w przekształcaniu nadtlenu wodoru w wodę poprzez miejsce aktywne reszty cysteiny, w którym dochodzi do utleniania do kwasu sulfenowego. W podtypie 2-Cys reszta pierwszej cysteiny jest utleniana przez nadtlenek wodoru do kwasu sulfenowego a następnie tworzy mostek disiarczkowy z drugą resztą cysteiny. Oba typy peroksyreduktaz ulegają ponownemu przekształceniu w formę zredukowaną z wykorzystaniem oksydoreduktaz zależnych od NAD(P)H^{60,61,62}.

Oprócz głównych bezpośrednich mechanizmów odpowiedzi na stres oksydacyjny, bakterie *H. pylori* posiadają również inne białka które, jak wykazano, spełniają ważną rolę

w obronie przed stresem oksydacyjnym. Białko HP-NapA z rodziny białek Dps wiążących DNA (*ang. DNA-binding proteins from starved cells*), należące do podgrupy z rodziny ferrytyn, posiada 12 identycznych podjednostek tworzących strukturę dodekameryczną, która ma zdolność wiązania do 500 atomów żelaza. Związanie wolnych jonów Fe^{2+} przez HP-NapA pomaga przeciwdziałać tworzeniu się rodników hydroksylowych⁶³. Dodatkowo białko to wiąże się z DNA w celu ochrony DNA przed uszkodzeniem tlenowym. Hp-NapA, co niespotykane u innych białek Dps, posiada dodatni ładunek na swojej powierzchni. Hp-NapA wydaje się posiadać dwie dodatkowe funkcje: wiąże się do zewnętrznej błony komórkowej oraz powoduje aktywację neutrofilii. Spekuluje się że obecność wspomnianego dodatniego ładunku odgrywa rolę w wiązaniu i aktywacji neutrofilii⁶⁴. Ponadto wykazano, że jest niezbędne w patogenezie *H. pylori*⁶⁵.

W czasie działania stresu oksydacyjnego, bakterie dążą do aktywacji enzymów naprawiających DNA. Niektóre bakterie posiadają szereg białek MutSHL służących do naprawy DNA. *H. pylori* nie posiada klasycznego systemu naprawy, występującego u innych bakterii, posiada natomiast homolog białka MutS⁶⁶ które jest bezpośrednio zaangażowane w naprawę DNA. Wykazano natomiast, że mutant delecyjny genu *mutS* posiada zwiększoną wrażliwość na tlen, nadtlenek wodoru oraz parakwat⁶⁶. Ponadto, wykazano, że mutant ten po poddaniu stresowi oksydacyjnemu wykazywał zwiększoną ilość 8-hydroksyguaniny (8-oxoG) w porównaniu ze szczepem dzikim (8-oxoG jest mutacją występującą w przypadku ekspozycji na czynnik utleniający)^{66,67}. Ostatnie badania strukturalne wykazały że MutS jest białkiem dwufunkcyjnym nacinającym DNA oraz posiadającym aktywność nukleazy RNA. Niestety nadal nie udało się określić jak białko MutS rozpoznaje mutację⁶⁹. Dodatkowo *H. pylori* produkuje endonukleazę III (HpNth), enzym naprawiający DNA, który usuwa utlenione pirymidyny i przyczynia się do zwiększonej odporności na stres oksydacyjny. W przypadku usunięcia genu endonukleazy III, *H. pylori* charakteryzuje się zwiększonym poziomem spontanicznych i indukowanych mutacji oraz zwiększoną wrażliwością na działanie związków utleniających czy makrofagów⁷⁰. Dodatkowo charakteryzuje się obniżoną zdolnością kolonizacji myszy.

Podczas kolonizacji żołądka, w komórkach *H. pylori* uruchamia się szereg procesów pozwalających na detoksykację komórki, jak również mechanizmy modyfikacji peptydoglikanu pozwalające jej przetrwać w środowisku gospodarza⁷¹. Za modyfikację peptydoglikanu odpowiedzialny jest enzym deacetylaza peptydoglikanu PdgA (*ang. peptidoglycan deacetylase*). Białko modyfikuje peptydoglikan w regionie trawienia lizozymu, przez co

komórki stają się bardziej odporne na działanie tego enzymu. Jak wykazują badania, *pdgA* podlega silnej ekspresji w momencie wystąpienia szoku tlenowego. Co ciekawe, mutant delecyjny genu *pdgA* posiada mniejszą zdolność do kolonizacji, jak również silniej uruchamia odpowiedź immunologiczną gospodarza⁷². Sugeruje się, że akonitaza odgrywa kluczową rolę w regulacji potranskrypcyjnej ekspresji genu *pdgA* w odpowiedzi na stres tlenowy. Akonitaza jest białkiem posiadającym klaster żelazowo-siarkowy katalizujący odwracalną izomeryzację cytrynianu do izocytrynianu w cyklu kwasu cytrynowego. Klaster ten ulega utlenianiu w warunkach stresu tlenowego. Utlenienie klastra powoduje jego oddysocjowanie od białka, co prowadzi do aktywacji białka apo-AcnB w wiązaniu do mRNA *pdgA* i prawdopodobnie stabilizacji transkryptu tego genu, a w konsekwencji zwiększonej syntezy białka PdgA⁷³. Ponadto wykazano, że szczepy pozbawione *acnB* wykazują znacznie mniejszą ekspresję genów odpowiedzialnych za odporność na stres tlenowy (*sodB*, *ahpC*, *kata*, *trxR*)⁷³. U bakterii *E. coli* również wykazano obecność systemu AcnA/AcnB aktywującego lub hamującego ekspresję dysmutazy ponadtlenkowej⁷⁴ podobnie jak ma to miejsce u *H. pylori*.

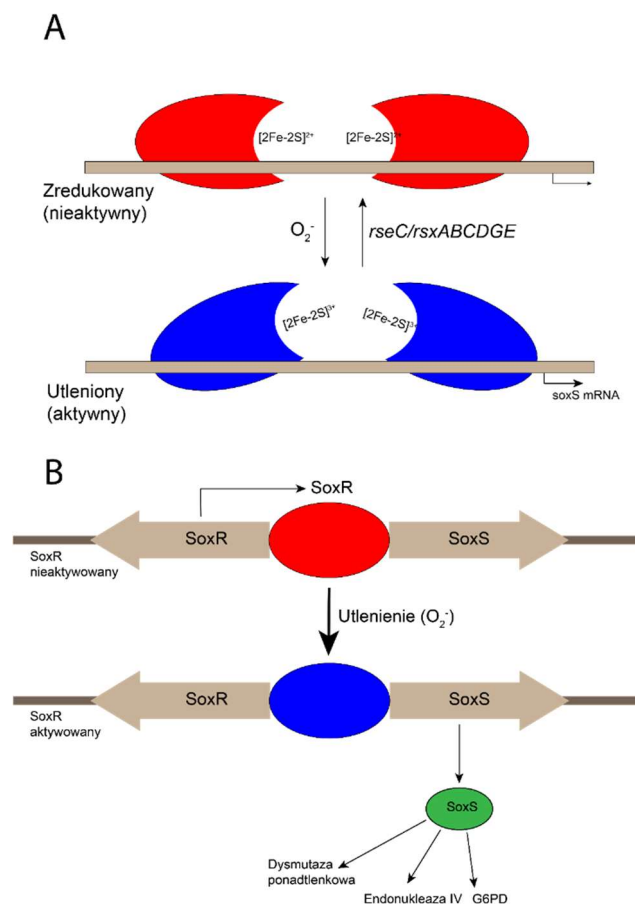
1.5 Sensory redoks *Escherichia coli*

W przypadku bakterii *H. pylori* nie zidentyfikowano dotychczas typowego sensora redoks występującego u innych gatunków bakterii¹⁴. Bakterie wykształciły molekularne mechanizmy kontrolujące stan redoks i aktywujące, w miarę potrzeby, geny odpowiedzialne za obronę przed reaktywnymi formami tlenu⁷⁵. Bardzo dobrym tego przykładem jest bakteria *E. coli* posiadająca rozbudowany system regulacji genów w odpowiedzi na stres tlenowy.

Narażenie bakterii *E. coli* na subletalne dawki anionorodnika ponadtlenkowego czyni je odpornymi na wyższe stężenia tych związków⁷⁶. Indukowana odporność na te czynniki, związana jest z obecnością genów *soxR* oraz *soxS* (Rys. 3). Geny te kodują dwa regulatory transkrypcji uczestniczące w dwustopniowym mechanizmie regulacji około 45 innych genów⁷⁷. Białko SoxR, będące również autorepresorem⁷⁸, produkowane jest w sposób konstytutywny w komórce w niskim stężeniu i aktywuje ekspresję genu *soxS* w odpowiedzi na stres tlenowy. Białko SoxS wiąże regiony promotorowe regulowanych przez siebie genów, a jego aktywność jest autoregulowana wewnątrzkomórkowo przy pomocy proteazy Lon^{79,80,81}. SoxS reguluje ekspresję takich genów jak: *sodA* (dysmutaza ponadtlenkowa),

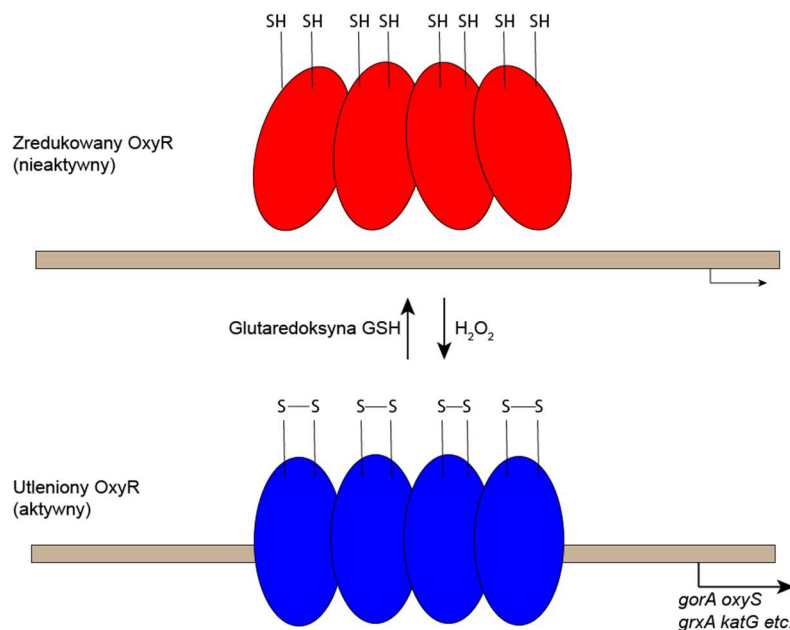
zwf (dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu), fur (gen regulatorowy zaangażowany w metabolizm żelaza), nfo (endonukleaza IV naprawiająca DNA)⁸².

Białko SoxR należy do rodziny aktywatorów transkrypcji MerR⁸³. Jego struktura pierwszorzędowa posiada motyw helisa-skręt-helisa (HTH, ang. *helix-turn-helix*) wiążący DNA. Białko to tworzy dimer, w którym każdy z monomerów posiada miejsce wiązania dla klastra żelazowo-siarkowego⁸⁴. Klaster ten wiąże się z białkiem z wykorzystaniem czterech reszt cysteinowych. Wszystkie formy białka posiadają zdolność do wiązania z DNA, natomiast tylko forma posiadająca utleniony klaster jest zdolna do aktywacji transkrypcji. Klaster żelazowo-siarkowy obecny w białku SoxR podlega jednoelektronowej odwracalnej reakcji utleniania i redukcji⁸⁵. W normalnych warunkach klaster pozostaje w formie zredukowanej. W momencie narażenia komórki na działanie nadtlenu dochodzi do utlenienia klastra i zwiększenia zdolności aktywacji transkrypcji (ponad 100-krotnie) specyficznej dla regionu promotorowego genu *soxS*.



Rys. 3. (A) Mechanizm aktywacji białka SoxR i SoxS. Utlenienie białka SoxR powoduje zmianę jego konformacji. Tylko utlenione białko SoxR aktywują transkrypcję genu *soxS*. (B) Aktywacja genu *soxS* poprzez białko SoxR. Aktywacja transkrypcji przez utlenione białko SoxR prowadzi do aktywacji transkrypcji kolejnych genów. Na podstawie: ⁸²

Aktywacja transkrypcji nie działa na drodze aktywacji polimerazy RNA⁸⁵, a więc zwiększenie transkrypcji tego genu spowodowane jest prawdopodobnie przez zmianę konformacji promotora, gdyż w momencie braku stresu oksydacyjnego białko SoxR nadal silnie wiąże ten region, natomiast nie aktywuje przez to transkrypcji genu⁸⁶. Ponadto, SoxR bezpośrednio reguluje transkrypcję 8 innych genów (*lpxC*, *ahpF*, *yrbL*, *yhcC*, *sodA*, *yjcB*, *mgtA*, *aroF-tyrA*)⁷⁷. Równoległe z efektami wywołanymi przez ponadtlenki, niski poziom nadtlenu wodoru powoduje wywołanie odporności na ten czynnik u *E. coli*. Odpowiedź ta zależy od genu *oxyR*. Białko OxyR należy do rodziny czynników transkrypcyjnych LysR. W odpowiedzi na stres oksydacyjny aktywuje białka kodowane przez geny jak: *dps* (białko wiążące żelazo i DNA), *gorA* (reduktaza GSH), *grxA* (glutaredoksyna), *katG* (peroksydaza) oraz *fur* (represor transportu żelaza)^{87,77}. Białko OxyR tworzy tetramer, a jego aktywacja opiera się na dwóch resztach cysteinowych (Rys. 4). W badaniach wykazano tworzenie się mostka disiarczkowego między cysteinami Cys199 oraz Cys208⁸⁸ w odpowiedzi na czynnik utleniający, natomiast wykazano również, że białko nie tworzy kowalencyjnie połączonych multimetrów⁸⁹ co świadczy o tworzeniu się mostków disiarczkowych wewnątrz każdego z monomerów białka.



Rys. 4. Mechanizm aktywacji białka OxyR. Obecność nadtlenu wodoru powoduje utworzenie mostków disiarczkowych prowadząc do związania białka OxyR do regionów promotorowych docelowych genów i aktywację transkrypcji. Na podstawie: ⁸²

Do aktywacji białka *in vivo* dochodzi niezwykle szybko, bo już po około 30 sekundach od narażenia/poddania hodowli na działanie perhydrolu, a do jego redukcji po około 5 minutach po usunięciu czynnika utleniającego⁸².

Białko Hsp33, będące białkiem opiekuńczym (*ang. chaperone*), wykazuje właściwości chroniące białka przed rozfałdowywaniem i agregacją powstałymi na drodze utleniania^{90,91}. Należy ono do typu białek, których aktywność jest regulowana poprzez ich status redoks. Hsp33 zlokalizowane jest w wysoce redukującym środowisku cytozolu, gdzie pozostaje w formie monomeru i nie wykazuje funkcji chaperonu. Podczas działania stresu oksydacyjnego, Hsp33 jest szybko aktywowane jako silny chaperon. Przełącznikiem regulującym aktywność białka jest motyw wiążący cynk o wysokim powinowactwie (CXCX²⁷⁻³²CXXC), który jest zlokalizowany w C-końcowej domenie białka. Cztery reszty cystein, determinujące opisywany przełącznik redoks, pozostają w stanie zredukowanym i razem koordynują jeden jon cynku. Podczas działania stresu oksydacyjnego, cysteiny uwalniają cynk i szybko tworzą dwa wewnątrzcząsteczkowe mostki disiarczkowe, łącząc dwie sąsiadujące reszty cystein Cys²³² z Cys²³⁴ oraz Cys²⁶⁵ z Cys²⁶⁸. Utworzenie mostków disiarczkowych i towarzyszące zmianie uwolnienie jonu cynku indukuje dimeryzację dwóch monomerów białka Hsp33. Po aktywacji białko Hsp33 jest w stanie zapobiec agregacji wielu niesfałdowanych białek poprzez ich wiązanie. Do uwalniania związanych białek wymagane jest przywrócenie warunków redukujących. Powoduje to przejście białka Hsp33 w stan zredukowanego dimeru, który pozostaje aktywny oraz nabiera zdolności do przeniesienia związanych białek do systemu fałdowania białek DnaK/DnaJ/GrpE^{90,92}.

2 Cel pracy

Dotychczas prowadzone badania nad stresem oksydacyjnym występującym u bakterii *H. pylori* obejmowały znane z innych gatunków białka biorące udział w detoksykacji komórki, takie jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa czy peroksydaza¹⁴. Białka te zostały stosunkowo dobrze scharakteryzowane. Co ciekawe, pomimo wielu lat badań nie zidentyfikowano białka będącego typowym sensorem redoks. Pomimo tego, że obecność takiego sensora u *H. pylori* wydaje się być bardzo prawdopodobna i ważna dla przeżywalności tej bakterii w środowisku swojego bytowania, w publikowanych pracach sugerowano, że *H. pylori* takiego sensora nie posiada^{37,93}.

Badania nad charakterystyką białka HP1021 w zespole dr Anny Pawlik prowadzono w związku z prawdopodobnym zaangażowaniem HP1021 w regulację częstości inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori*⁴⁰ (Rozdział 1.4.1.). Kluczowe dla dalszych badań zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu regulacji procesu replikacji przez HP1021 było wyjaśnienie mechanizmu regulacji białka HP1021. Dlatego celem pracy było zidentyfikowanie czynnika kontrolującego aktywność sierocego regulatora odpowiedzi HP1021, a następnie wstępne scharakteryzowanie mechanizmu regulacji aktywności HP1021 przez ten czynnik zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

3 Materiały i metody

3.1 Plazmidy i szczepy bakteryjne

3.1.1 Szczepy *E. coli*

Tab. 2. Szczepy *E. coli* wykorzystywane w pracy doktorskiej

Nazwa szczepu	Genotyp	Źródło
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k⁻</i> , <i>mk⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169	⁹⁴
<i>E. coli</i> BL21 DE3	<i>B</i> , F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B(<i>r_B⁻m_B⁻)</i>, λ(<i>DE3</i> [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]), [<i>malB⁺</i>]_{K-12}(λ<i>S</i>)</i>	⁹⁵
<i>E. coli</i> MC1061	F ⁻ , <i>hsdR2</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>araA-leu</i>), <i>galK16</i> , <i>galE15</i> (GalS), λ, <i>e14⁻</i> , <i>mcrA0</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> (str ^R), <i>spoT1</i> , <i>mcrB1</i>	⁹⁶

3.1.2 Szczepy *H. pylori*

Tab. 3. Szczepy *H. pylori* wykorzystywane w pracy doktorskiej

Nazwa szczepu	Opis/Genotyp	Źródło
N6	Szczep dziki <i>H. pylori</i>	⁹⁷
N6 ΔHP1021	Szczep N6, w którym gen <i>HP1021</i> zastąpiono kasetą oporności na kanamycynę <i>ΔHP1021::aphA-3</i>	Otrzymano od dr Kerstin Stingl, National Reference Laboratory for Campylobacter, Department of Biological Safety, Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Niemcy
N6 HP1021Δcys	Szczep, w którym w genie <i>HP1021</i> wprowadzono mutacje kodonów cysteinowych na kodony alaninowe <i>ΔHP1021::HP1021(27GCT>TGC, 51GGC>TTG, 56CGC>TTG 238GCC>TGC, 270GCG>TGC)- aphA-3</i>	Uzyskano w tej pracy doktorskiej
N6 ΔHP1021com	Szczep komplementacyjny <i>HP1021</i> <i>(ΔHP1021::aphA-3)::(HP1021-cat)</i>	Uzyskano w tej pracy doktorskiej
26695	Szczep dziki <i>H. pylori</i>	⁹⁸

3.1.3 Plazmidy

Tab. 4. Wektory wykorzystywane w pracy doktorskiej

Nazwa wektora	Opis i zastosowanie	Źródło
pGEM-T Easy	Wektor do klonowania produktów reakcji PCR, Amp ^R .	Promega
pTZ57R/T	Wektor do klonowania produktów reakcji PCR, Amp ^R .	Thermo Fisher Scientific
pET-28a(+) <i>Nstrep</i>	Wektor ekspresyjny zmodyfikowany, zawiera sekwencję kodującą <i>Strep-TagII</i> (WSHPQFEK) na N-końcu syntezowanego białka rekombinowanego, Kan ^R .	Zawilak-Pawlik, dane nieopublikowane *
pTZ57R/TΔHP1021	Pochodna pTZ57R/T wykorzystana do konstrukcji szczepu N6Δ1021 na drodze rekombinacji homologicznej .	⁹⁹
pGEM1021Δcys-aphA3	Pochodna pGEM -T Easy, wykorzystany do konstrukcji szczepu N6 1021Δcys na drodze rekombinacji homologicznej, zawierający sekwencję genu w której zmutowano kodony reszt cysteinowych na alaninowe (27GCT>TGC, 51GGC>TTG, 56CGC>TTG, 216GCA>TGC, 238GCC>TGC, 270GCG>TGC), lewe ramię homologii (fragment genu HP1020) oraz prawe ramię homologii (fragment genu HP1022).	Uzyskano w tej pracy doktorskiej
Wektory zastosowane do nadprodukcji i oczyszczania białek rekombinowanych		
Nazwa	Opis	
pET-28a(+) <i>Nstrep</i> HP1021	pET-28a(+) <i>Nstrep</i> zawierający gen <i>HP1021</i> wykorzystywany do produkcji białka rekombinowanego HP1021 z metką <i>Strep-tag II</i> na N-końcu białka HP1021.	Uzyskano w tej pracy doktorskiej
pET-28a(+) <i>Nstrep</i> HP1021NDC	pET-28a(+) <i>Nstrep</i> zawierający gen <i>HP1021</i> z mutacjami nukleotydowymi w kodonach: 27GCT>TGC, 51GGC>TTG, 56CGC>TTG. Mutacje skutkują zamianą reszt cysteinowych na reszty alaninowe w pozycjach 27, 52 i 56 sekwencji białka HP1021 (C27A; C51A; C56A).	Uzyskano w tej pracy doktorskiej

	Wykorzystywany do produkcji białka HP1021NDC z metką Strep-tag II na N-końcu białka.	
pET-28a(+)Nstrep HP1021CDC	pET-28a(+)Nstrep zawierający gen <i>HP1021</i> z mutacjami nukleotydowymi w kodonach: 216GCA>TGC, 238GCC>TGC, 270GCG>TGC. Mutacje skutkują zamianą reszt cysteinowych na reszty alaninowe w pozycjach 216, 238 i 270 sekwencji białka HP1021 (C216A; C238A; C270A). Wykorzystywany do produkcji białka HP1021CDC z metką Strep-tag II na N-końcu białka.	Uzyskano w tej pracy doktorskiej
pET-28a(+)NstrepHP1021DC	pET-28a(+)Nstrep zawierający gen <i>HP1021</i> z mutacjami nukleotydowymi w kodonach: 27GCT>TGC, 51GGC>TTG, 56CGC>TTG, 216GCA>TGC, 238GCC>TGC, 270GCG>TGC. Mutacje powodują wymianę wszystkich reszt cysteinowych na reszty alaninowe w pozycjach C27A; C51A; C56A; C216A; C238A; C270A. Wykorzystywany do produkcji białka HP1021DC z metką Strep-tag II na N-końcu białka.	Uzyskano w tej pracy doktorskiej

*Wektor otrzymany przez zhybrydyzowanie oligonukleotydów P45 oraz P46 (Tab. 5), a następnie wklonowanie dwuniciowego oligonukleotydu w plazmid pET28a(+) w miejsca NcoI/BamHI.

P29	CGTGGGGTTAGGGGTATAAAG
P30	CGCAAAGCTTGAATCTCAAAT
P31	ACGCGCTGCTTTCATAACTC
P32	CACCCAGCATTTCAGGTTTA
P33	GTGATAAAAGGAAGAATTGATGAAAATCTTAATCATTGAA
P34	TTCAATGATTAAGATTTTCATCAATTCTTCCTTTTATCAA
P35	ATAACTTACCGCGCAAATAAGGATCCTGACTAACTAGGAGGAA
P36	AATCCTCCTAGTTAGTCAGGATCCTTATTTGCGCGGTAAGTTAT
P37	GCGATTTTAGGAGCGATTAAAGGG
P38	GAATCTTTTAGGGAGTGTTTTATTAG
P39	BIOTIN-CTCTATTTTGAAAACCCCTATTTTC
P40	CTATATTTTTTCAATGGTTTAGTGC
P41	GCATAAGATCTAGGAGTAAGA
P42	BIOTIN-CATGTTTGACAGCTTATCATCG
P43	BIOTIN-CCCTACTACTGTTACTAATTATTATT
P44	AATAATAATTAGTAACAGTAGTAGGG
P45	Pho-CATGGCAAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGCGCCG
P46	Pho-GATCCGGCGCCTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTTGC
P49	ATAATTTGCCGCGCAAATAACGGAATTTACGGAGGATAAATGGAGAAAAAATCACTGG
P50	CCAGTGATTTTTTTCTCATTATCCTCCGTAAATTCCGTTATTTGCGCGGCAAATTAT
P51	TACCTGGAGGGAATAATGCTGCAGCAGAAAATCCTTAAGC
P52	GCTTAAGGATTTTCTGCTGCAGCATTATCCCTCCAGGTA
P53	TAATACGACTCACTATAGG
P54	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.3 Odczynniki i enzymy

- Enzymy restrykcyjne i modyfikujące DNA pochodzą z firm: Thermo Fisher Scientific i Fermentas.
- Zestawy do izolacji plazmidowego DNA z komórek *E. coli*, *H. pylori* i oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych (trawienie enzymami restrykcyjnymi, PCR, modyfikacja DNA) pochodzą z firm: Qiagen oraz A&A Biotechnology.
- Reakcje sekwencjonowania wykonywano w firmie Genomed (Warszawa).
- Złoże chromatograficzne do oczyszczania rekombinowanych białek pochodziło z firmy IBA Lifesciences.
- Przeciwciała wykorzystane w pracy pochodziły z firm GE Healthcare (ośle przeciwciała IgG skierowane przeciwko króliczym IgG, skoniugowane z peroksydazą chrzanową; NA934V) oraz Sigma-Aldrich (kozie przeciwciała IgG skierowane przeciwko króliczym IgG, skoniugowane z fosfatazą alkaliczną; A3687). Surowica królicza, zawierająca przeciwciała skierowane przeciwko białku HP1021, uzyskana została za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN na mocy Uchwały nr 51/2012 z dnia 18.07.2012 roku.

3.4 Bufory i roztwory

Tab. 6. Bufory i roztwory

TBE 1x		PBS	
Tris	89 mM	NaCl	0,8%
Kwas borowy	89 mM	KCl	0,02%
EDTA	2 mM	Na ₂ HPO ₄	0,144%
		NaH ₂ PO ₄	0,024%
TE			
Tris-HCl pH 8,0	10 mM	Obciążnik 4xβ	
EDTA	1 mM	Tris pH 6,8	250 mM
		SDS	8%
Bufor Tris-Glicyna 1x		Glicerol	40%
Tris	25 mM	β-merkaptioetanol 14M	0,7 M
Glicyna	192 mM	Bromophenol Blue	0,025%
SDS	0,1%		

Obciążnik 6x do DNA		CBB (Coomassie Brilliant Blue)	
Błękit bromofenolowy	0,25%	CBB R250	0,1%
Sacharoza w H ₂ O	40% (w/v)	CBB G250	0,05%
		Etanol 96%	40%
		Metanol	5%
		Kwas octowy	10%
		Odbarwiacz	
		Metanol	35%
		Kwas octowy	7%

3.5 Podłoża mikrobiologiczne

Tab. 7. Podłoża mikrobiologiczne

LB pH 7,5 (na 1 litr)		SOC	
Trypton	10 g	SOB	5 ml
Ekstrakt drożdżowy	5 g	Glukoza 1 M	100 µl
NaCl	10 g	MgCl ₂ 2 M	25 µl
Stałe podłoże LB		Columbia Blood Agar 250 ml	
LB	1 L	Columbia Blood	
Agar	15 g	Agar Base	9,75 g
		H ₂ O	225 ml
SOB pH 7,0 (na 100ml)		Po sterylizacji:	
Trypton	2 g	Krew końska	
Ekstrakt drożdżowy	0,5 g	odwłókniona	25 ml
NaCl	0,05 g		
KCl 250mM	1 ml	BBL 400 ml	
Po sterylizacji 0,5 ml 2M MgCl ₂		Brucella Broth	11,6 g
		H ₂ O	360 ml
TSS (na 100 ml)		Po sterylizacji:	
Trypton	1 g	FCS (Biowest S1810)	
Ekstrakt drożdżowy	0,5 g	inaktywowany termicznie	40 ml
NaCl	0,5 g		
PEG 20000	10 g	BHI z glicerolem 200 ml	
Po sterylizacji:		Brain Hearth Infusion	7,4 g
DMSO	5 ml	Glicerol 100%	40 ml
MgCl ₂ 2 M	5 ml	H ₂ O	160 ml

3.6 Hodowle mikroorganizmów

3.6.1 Hodowle *E. coli*

Hodowle na podłożach stałych prowadzono na płytkach Petriego, na podłożu LB (Tab. 7) z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. Dodatkowo w niektórych przypadkach w celu selekcji kolonii białych i niebieskich do podłoża dodawano IPTG (1 mM) i X-gal (0,2 mg/ml). Bakterie inkubowano w temperaturze 37°C przez około 16-20 godzin.

Hodowle płynne prowadzono w kolbach stożkowych, w pożywce LB w objętości nie przekraczającej 1/5 pojemności kolby, z wytrząsaniem 180 rpm w temperaturze 37°C z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku.

Antybiotyki selekcyjne:

- Ampicylina 100 µg/ml
- Kanamycyna 25 µg/ml
- Chloramfenikol 34 µg/ml

3.6.2 Hodowle *H. pylori*

Hodowle *H. pylori* prowadzono na wentylowanych płytkach Petriego, na podłożu Columbia Blood Agar (Tab. 7) z dodatkiem 10% odwódnionej krwi końskiej, koktajlu antybiotykowego oraz antybiotyku selekcyjnego (jeśli był konieczny). Hodowle wysiewano na płytkę i inkubowano 24 godziny w warunkach mikroaerofilnych w temperaturze 37°C, a następnie przesiewano na nowe płytki i inkubowano kolejne 24 godziny. Komórki po transformacji inkubowano 5-6 dni.

Atmosfera mikroaerofilna zapewniana była przez system wymiany gazowej na zasadzie wypompowania powietrza ze słoików hodowlanych (Oxoid HP0011; BD 260629) do ciśnienia - 0,4 atmosfery, oraz wprowadzenia do słoików mieszanki gazowej o zdefiniowanym składzie: 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂. Procedurę odpompowania gazu ze słoja i wprowadzenia gazu z butli przeprowadzano 2-3 krotnie.

Koktajl antybiotykowy⁴⁴

polimyksyna B	0,3 µg/ml
wankomycyna	12,5 µg/ml
amfoterycyna B	2,5 µg/ml
trimetoprim	6,25 µg/ml

Antybiotyki selekcyjne:

- kanamycyna 15 µg/ml
- chloramfenikol 8 µg/ml

Hodowle płynne prowadzono w temperaturze 37°C, w pożywce BBL (Tab.7) z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie surowicy płodowej cielęcej, z wytrząsaniem orbitalnym 140 rpm. Pożywkę zaszczepiano do OD₆₀₀ = 0,5 komórkami zebranymi z hodowli na podłożu stałym, hodowano około 6 godzin, a następnie przesiewano na świeżą pożywkę. Hodowle prowadzono w warunkach mikroaerofilnych lub innych, dostosowanych do wymagań eksperymentu (szczegóły w rozdziale Wyniki).

3.7 Techniki wykorzystywane w pracy z DNA

3.7.1 Mini-izolacja plazmidów z komórek *E. coli* (tzw. miniprep)

W celu izolacji plazmidowego DNA z 1,5-2 ml hodowli bakteryjnej, 1,5-2 ml płynnego LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego (rodz. 3.6.1) zaszczepiano komórkami *E. coli* DH5α zawierającymi plazmid, a następnie hodowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przez noc. Plazmidowy DNA izolowano z wykorzystaniem zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

3.7.2 Izolacja plazmidów z komórek *E. coli* na średnią skalę (tzw. midiprep)

W celu izolacji plazmidowego DNA z 50 ml hodowli bakteryjnej, 50 ml płynnego LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego (Rozdział 3.6.1) zaszczepiano komórkami *E. coli* DH5α, a następnie hodowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przez noc. Plazmidowy DNA izolowano z wykorzystaniem zestawu Plasmid Midi (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

3.7.3 Izolacja genomowego DNA z komórek *H. pylori*

W celu izolacji genomowego DNA zbierano biomasę bakterii z około ¼ płytki hodowlanej, a następnie zawieszano w 1 ml 150 mM NaCl. Osad po odwirowaniu (5 min, 5000 rpm, 25°C) zawieszano w 100 ul buforu TRIS (10 mM, pH 8,5). Izolację genomowego DNA prowadzono zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta zestawu (Genomic Mini, A&A Biotechnology).

3.7.4 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

DNA rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym o stężeniu zależnym od wielkości fragmentów DNA: niskocząsteczkowe fragmenty (100-500 pz) w żelu 1,5%, cząsteczki o wyższej masie (500-10000 pz) w żelu 1%. Do żelu dodawano barwnik SimplySafe (EurX). Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej w buforze 1x TBE, w aparacie do elektroforezy horyzontalnej, przy napięciu 8-10 V/cm. Wielkość rozdzielanych fragmentów DNA oceniano przez porównanie z równocześnie naniesionym wzorcem mas cząsteczkowych DNA (λ DNA/PstI, Rozdział 3.7.5).

3.7.5 Wzorzec mas cząsteczkowych DNA

Wzorzec mas cząsteczkowych λ DNA/PstI przygotowywano przez trawienie 6 μ g DNA faga λ z użyciem 20 U enzymu restrykcyjnego PstI w buforze O (Thermo Fisher Scientific, BO5), w temperaturze 37°C przez noc, a następnie dodanie obciążnika 6x do DNA (Tab. 6).

3.7.6 Oczyszczanie DNA

Fragmenty DNA:

- po wycięciu z żelu agarozowego
- produkty reakcji PCR (z pominięciem etapu rozpuszczania agarozy w temperaturze 50°C, wykorzystując bufor R7SI w objętości 1:1 w stosunku do objętości reakcji oraz izopropanol w objętości 0,5 V objętości użytego buforu R7SI)

- po trawieniu enzymami restrykcyjnymi (z pominięciem etapu rozpuszczania agarozy w temperaturze 50°C, wykorzystując bufor R7SI w objętości 1:1 w stosunku do objętości reakcji oraz izopropanol w objętości 0,5 V objętości użytego buforu R7SI) oczyszczano używając zestawu GelOut (A&A Biotechnology).

3.7.7 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcję trawienia enzymami restrykcyjnymi prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta przyjmując, że 1 U enzymu trawi całkowicie 1 µg DNA w ciągu 1 godziny w optymalnych warunkach temperatury i buforu. W przypadku enzymów FastDigest (Thermo Fisher Scientific) przyjmowano że 1 µl enzymu trawi 1 µg plazmidowego DNA lub 0,2 µg produktu PCR w ciągu 5 minut w optymalnych warunkach temperatury. DNA oczyszczano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym a następnie oczyszczanie zestawem GelOut (A&A Biotechnology) lub bezpośrednio po reakcji PCR z wykorzystaniem wyżej wymienionego zestawu (Rozdział 3.6.7).

3.7.8 Defosforylacja 5' końców DNA

Do reakcji defosforylacji używano fosfatazy alkalicznej (FastAP, Thermo Fisher Scientific). Reakcję prowadzono w buforze i warunkach zalecanych przez producenta. Po reakcji enzym inaktywowano termicznie (5 min, 75°C). Produkt defosforylacji używano bezpośrednio do reakcji ligacji.

3.7.9 Ligacja

Do ligacji produktów PCR używano zestawu pGEM-T Easy według zaleceń producenta lub produkty PCR klonowano z wykorzystaniem miejsc restrykcyjnych. Do ligacji fragmentów restrykcyjnych używano ligazę T4 (Thermo Fisher Scientific). Reakcja ligacji prowadzona była przez noc w temperaturze 4°C. W reakcji stosowano trzykrotny nadmiar molowy insertu w stosunku do wektora. Objętość mieszaniny wynosiła 10-20 µl w tym 1-2 U ligazy oraz bufor do ligazy.

3.7.10 łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcję prowadzono w objętości 10-100 μl przy użyciu zestawów iProof (BioRad) (PCR preparatywny, używano polimerazy o zwiększonej wierności celem eliminacji błędów polimerazy przy produkcji fragmentów do klonowania) lub DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) (PCR analityczny, powielenie DNA jako etap analizy wyników lub przygotowanie sond DNA).

Typowy przebieg etapów reakcji PCR:

1. Denaturacja wstępna: 3 minuty, 95°C
2. Denaturacja: 30 sekund, 95°C
3. Stapianie starterów: 30 sekund w temperaturze T_a obliczonej wg wzoru:
 $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$, gdzie $T_m = 4 \cdot (n_G + n_C) + 2 \cdot (n_A + n_T)$; n-liczba nukleotydów
4. Synteza: 72°C, 20-150 sekund w zależności od długości fragmentów przyjmując 1 min na 1000 pz.

Kroki 2-4 powtarzano 25-35 razy. Ostatni etap syntezy wydłużano do 5 minut i mieszaninę schładzano do temperatury 4°C. Produkty analizowano elektroforetycznie; jeśli celem było uzyskanie DNA do dalszych etapów pracy, oczyszczano DNA z wykorzystaniem odpowiedniego zestawu (Gel-Out, A&A Biotechnology) (Rozdział 3.6.7).

Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR (na 50 μl).

Składniki	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość dodawana
Matryca DNA	5-50 ng/ μl	100-1000 pg/ μl	1-2 μl
Starter 3'	5 μM	0,5 μM	5 μl
Starter 5'	5 μM	0,5 μM	5 μl
Bufor	10x lub 5x	1x	5-10 μl
dNTP	10 mM	0,2 mM	1 μl
H ₂ O			do 50 μl
Polimeraza	1-5 U/ μl	0,01-0,02 U/ μl	0,5-1 μl

3.7.11 Reakcja PCR wydłużania nakładających się odcinków (OE-PCR)

Metodę OE-PCR (*ang. overlap extension PCR*) stosowano do łączenia fragmentów PCR¹⁰⁰. Do reakcji stosowano odpowiednio przygotowane w reakcji PCR fragmenty DNA z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów. Fragmenty oczyszczano z żelu agarozowego, a następnie łączono w kolejnej reakcji PCR wykorzystując skrajną parę starterów.

Etapy OE-PCR:

1. Denaturacja wstępna: 1 minuta, 92°C
2. Denaturacja: 1 minuta, 92°C
3. Stapianie starterów: 1 minuta, 50°C
4. Synteza: 2,5 minuty, 72°C

Kroki 2-4 powtarzano 25-35 razy. Ostatni etap syntezy wydłużano do 3 minut i mieszaninę schładzano do temperatury 4°C. Produkty analizowano elektroforetycznie i oczyszczano z wykorzystaniem odpowiedniego zestawu (Gel-Out, A&A Biotechnology) (Rozdział 3.6.7)

3.7.12 Transformacja komórek *E. coli*

Komórki *E. coli* transformowano plazmidowym DNA lub mieszaniną ligacyjną z wykorzystaniem metody szoku cieplnego.

3.7.12.1 Transformacja metodą szoku cieplnego

Przygotowanie komórek kompetentnych

Komórkami z pojedynczej kolonii zaszczepiano 20 ml pożywki płynnej LB a następnie hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 rpm do OD₆₀₀ = 0,4. Komórki schładzano przez 30 minut na lodzie, a następnie zwirowywano (10 min, 5000 x g, 4°C). Osad komórkowy przemywano 1 objętością (równą objętości hodowli) zimnym sterylnym 50 mM CaCl₂. Osad komórkowy zawieszano w 1 ml zimnego sterylnego 50 mM CaCl₂, inkubowano 30 minut na lodzie, a następnie wirowano (10 min, 5000 x g, 4°C). Osad zawieszano w 500 µl zimnego, sterylnego 50 mM CaCl₂ w 15% glicerolu i rozporcjowywano po 100 µl, a następnie

szybko zamrażano z wykorzystaniem ciekłego azotu. Do transformacji używano komórek przechowywanych w temperaturze -70°C .

Transformacja komórek

Komórki kompetentne rozmrażano na lodzie, a następnie dodawano DNA i inkubowano:

- 30 minut na lodzie, od czasu do czasu delikatnie mieszając
- 90 sekund w temperaturze 42°C
- 2 minuty na lodzie
- 3 minuty w temperaturze pokojowej

Następnie do mieszaniny dodawano 1 ml SOC (Tab. 7) i inkubowano 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Na płytkę z podłożem LB i odpowiednim antybiotykiem wysiewano 50-150 μl hodowli, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

3.7.13 Transformacja komórek *H. pylori*

Komórki *H. pylori* posiadają naturalną zdolność do przyjmowania DNA ze środowiska zewnętrznego. W warunkach laboratoryjnych stosowano metodę transformacji komórek *H. pylori* wykorzystując naturalną kompetencję komórek.

3.7.13.1 Wykorzystanie naturalnej kompetencji *H. pylori* do pobierania DNA ze środowiska zewnętrznego

Komórki *H. pylori*, po uprzedniej 2-dniowej hodowli płytkowej (Rozdział 3.6.2) zbierano jałową wymazówką z płytki, a następnie wysiewano w postaci hodowli o średnicy 1 cm. Płytki inkubowano około 4-6 godzin w warunkach mikroaerofilnych. Następnie na hodowle *H. pylori* nanoszono 3-5 μg plazmidowego DNA w objętości 10 μl i inkubowano w temperaturze 37°C , w warunkach mikroaerofilnych, agarem do dołu przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie hodowle zbierano wymazówką i wysiewano na nowe płytki z podłożem CBA i antybiotykiem selekcyjnym. Płytki następnie inkubowano 3-5 dni w temperaturze 37°C w warunkach mikroaerofilnych (Rozdział 3.6.2). Po tym czasie powstałe pojedyncze kolonie przesiewano na nowe płytki z pożywką CBA oraz antybiotykiem selekcyjnym i inkubowano 2 dni

w temperaturze 37°C w warunkach mikroaerofilnych. Ostatnim etapem było przesianie każdego z klonów na pojedynczą płytkę, inkubacja 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach mikroaerofilnych, a następnie zabezpieczenie klonów w postaci hodowli glicerynowych poprzez zawieszenie zebranej hodowli w BHI z glicerolem oraz zamrożenie w 70°C.

3.8 Techniki wykorzystywane w pracy z RNA

3.8.1 Izolacja całkowitego RNA z komórek *H. pylori*

Całkowity RNA z komórek *H. pylori* izolowano z wykorzystaniem zestawu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Komórki *H. pylori* pobierano z hodowli płynnej w ilości około $0,5 \times 10^9$ komórek, wirowano (3 minuty, 5000 x g, 25°C) a następnie z komórek izolowano RNA według protokołu producenta. Wyizolowany RNA przechowywano w temperaturze -20°C. Oczyszczony RNA analizowano elektroforetycznie i spektrofotometrycznie.

3.8.2 Odwrotna transkrypcja RNA

Cały preparat wyizolowanego RNA poddawany był trawieniu DNazą I (1 U, 30min, 37°C) (EN0525; Thermo Fisher Scientific). Reakcję przerywano przez dodanie 1 µl 50 mM EDTA (15575020; Thermo Fisher Scientific) i inkubację mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 65°C przez 10 min. Następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji wykorzystując 400-500 ng przygotowanego RNA. W reakcji stosowano odwrotną transkryptazę Maxima RT (Thermo Fisher Scientific; EP0741), startery Random Hexamers (Thermo Fisher Scientific; SO142) oraz inhibitor RNaz RiboLock (Thermo Fisher Scientific; EO0381). Reakcję prowadzono w objętości 20 µl w warunkach:

- 10 minut, 25°C
- 30 minut, 50°C
- 5 minut, 85°C

Otrzymany produkt używano bezpośrednio do rozcieńczeń w reakcji Reverse transcription - qPCR.

3.8.3 Ilościowa reakcja PCR (qPCR)

Reakcję ilościowego PCR (qPCR, *ang. quantitative PCR*) przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu SensiFast NO-ROX (Bioline). Do reakcji wykorzystywano 1 µl 10-krotnie rozcieńczonej mieszaniny z reakcji odwrotnej transkrypcji (Rozdział 3.8.2) oraz startery specyficzne dla badanych genów (Tab.5). Reakcję prowadzono w objętości 20 µl w standardowych warunkach:

1. 95°C, 3 minuty
2. 95°C, 5 sekund
3. 60°C, 10 sekund
4. 72°C, 20 sekund; Odczyt

Kroki 2-4 powtórzyć 40 razy

5. 95°C 10 sekund
6. 65°C-95°C zmiana co 0,5°C plus odczyt

Reakcja prowadzona była w aparacie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) przy użyciu programu CFX Manager. Wyniki analizowano z wykorzystaniem programu CFX Manager (BioRad) lub Excel 2017.

3.9 Techniki wykorzystywane do pracy z białkami

3.9.1 Oznaczanie stężenia białka

Stężenia białek oznaczano metodą Bradford¹⁰¹ w objętości 1 ml. Do kuwety spektrofotometrycznej dodawano 200 µl odczynnika 5x Bradford (Roth, K015.1) oraz uzupełniano do objętości 1 ml wodą. Następnie do kuwety dodawano białko w objętości 2-10 µl. Równolegle przygotowywano próbę zerową bez białka. Składniki po wymieszaniu inkubowano przez 5 minut, a następnie odczytywano wartość absorbancji przy długości fali 595 nm. Stężenie białka wyliczano na podstawie krzywej standardowej przygotowanej dla BSA.

3.9.2 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE)

Białka rozdzielano w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących¹⁰². Przygotowywano mini-żele o wymiarach 8,6 x 6,7 x 0,1 cm. Najpierw wylewano żel rozdzielający, po jego spolimeryzowaniu żel zagęszczający. Przygotowane żele umieszczano w aparacie do elektroforezy wertykalnej (Mini-Protean Tetra Cell, BioRad). Do próbek dodawano obciążnik 4x β w stosunku 3:1 (Tab. 6) a następnie ogrzewano bezpośrednio przed nałożeniem na żel w temperaturze 95°C przez 5 minut. Elektroforezę prowadzono przy natężeniu prądu 30 mA. Po zakończeniu rozdzielania, żel wizualizowano na lampie UV z wykorzystaniem metody StainFree (ImageLab, BioRad) dzięki obecności 0,5% TCE w żelu, lub przeprowadzano Western Blotting (Rozdział 3.9.3.). Masę cząsteczkową białek szacowano na podstawie wzorca mas cząsteczkowych naniesionego równolegle z próbkami badanymi.

Tab. 9. Skład żelu rozdzielającego (5 ml).

Składniki	10%	12%	15%
H ₂ O	0,98 ml	0,65 ml	0,15 ml
Rotiphorese gel 30 (Roth, 3029.1)	1,67 ml	2 ml	2,5 ml
1,88M Tris (pH 8,8)	1 ml	1 ml	1 ml
2% TCE	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
10% SDS	50 ul	50 ul	50 ul
10% APS	50 ul	50 ul	50 ul
TEMED	5 ul	5 ul	5 ul

Tab. 10. Skład żelu zagęszczającego.

Składniki	5%
H ₂ O	1,22 ml
Rotiphorese gel 30 (Roth, 3029.1)	0,34 ml
0,625M Tris (pH 6,8)	0,4 ml
10% SDS	20 ul
10% APS	20 ul
TEMED	2 ul

3.9.3 Immunoblotting (Western Blotting)

Technikę stosowano w celu specyficznej identyfikacji białek z użyciem specjalnie dobranych przeciwciał. Transfer białek na membranę nitrocelulozową przeprowadzono w aparacie TransBlot Turbo Transfer System (BioRad). Umieszczono w nim kolejno: bibułę Extra thick western blotting filter paper (Thermo Fisher Scientific), membranę nitrocelulozową, żel, bibułę Extra thick western blotting filter paper. Wszystkie elementy poza żelem uprzednio namoczono w buforze Trans-Blot Turbo (BioRad, bufor wchodzący w skład jednego z zestawów Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, np. 1704272). Transfer przeprowadzono przez 7 minut w warunkach 25 V, 1,3 A w aparacie Trans-Blot Turbo Transfer System. Po transferze membranę umieszczano w 5% roztworze mleka na około 30 min lub przez noc w temperaturze 4°C, a następnie inkubowano z rozcieńczonym 1:2500 w PBST przeciwciałem pierwszorzędowym anti-HP1021 przez 60 minut. Po tym czasie niespecyficzenie związane przeciwciała odmywano buforem PBST (3 x 5 ml), po czym membranę inkubowano z rozcieńczonym 1:3000 (NA934V, GE Healthcare) lub 1:10000 (A3687, Sigma-Aldrich) przeciwciałem drugorzędowym przez 60 minut. Membranę przemywano buforem PBST (3 x 5 ml, 5 min), a następnie buforem PBS (3 x 5 ml, 5 min). W zależności od zastosowanego przeciwciała drugorzędowego detekcji dokonywano za pomocą reakcji barwnej (gdy używano koniugatu przeciwciała z fosfatazą alkaliczną) lub chemiluminescencyjnej (w przypadku koniugatu przeciwciała z peroksydazą chrzanową).

3.9.3.1 Reakcja barwna

Osuszoną membranę umieszczano w roztworze AP zawierającym substraty dla enzymu (BCIP oraz NBT) (Bufor do reakcji barwnej, Tab. 11). Reakcję prowadzono do momentu pojawienia się sygnałów o pożądanej intensywności i przerywano przepłukując buforem TE (Tab. 11).

3.9.3.2 Reakcja chemiluminescencyjna

Wszystkie kroki wykonywano w ciemnym pokoju z wykorzystaniem lampy ciemniowej. Osuszoną membranę umieszczano w połączonych Roztworach do wywoływania 1 i 2 (Tab. 11). Reakcję prowadzono przez 1 minutę, następnie membranę lekko osuszano, zabezpieczano folią i umieszczano w kasecie rentgenowskiej. Detekcji sygnału dokonywano przykładając kliszę rentgenograficzną (CL-XPosure film, Thermo Fisher Scientific). Naświetloną kliszę inkubowano w roztworze wywoływacza do czasu pojawienia się sygnału, płukano w wodzie destylowanej i utrwalano w roztworze utrwalacza (Carestream Readymatic X-Ray solution Set, Carestream Health). Intensywność sygnału regulowano czasem kontaktu membrany z kliszą (15 sekund – 5 minut) oraz czasem inkubacji w roztworze wywoływacza.

Tab. 11. Roztwory wykorzystywane w technice Western Blotting.

Bufor AP		Roztwór blokujący	
Tris-HCl pH 9,5	100 mM	PBST	50 ml
NaCl	100 mM	Odtłuszczone mleko w proszku	1,5 g
MgCl ₂	50 mM		
Bufor do reakcji barwnej		Bufor do transferu (z zestawu BioRad 1704272)	
Roztwór NBT	66 µl	5x BioRad trans blot turbo buffer	200 ml
Roztwór BCIP	33 µl	H ₂ O	600 ml
Bufor AP	10 ml	Etanol	200 ml
Roztwór NBT			
NBT	0,5 g		
Dimetyloformamid 70%	10 ml		
Roztwór BCIP			
BCIP	0,5 g		
H ₂ O	10 ml		

PBS		Roztwór do wywoływania 1	
NaCl	137 mM	Tris-HCl pH 8,5	1 ml
KCl	2,7 mM	Luminol 250 mM	100 µl
Na ₂ HPO ₄	10 mM	Kwas kumarynowy 90 mM	44 µl
		H ₂ O	do 10 ml
PBST		Roztwór do wywoływania 2	
NaCl	137 mM	Tris-HCl pH 8,5	1 ml
KCl	2,7 mM	H ₂ O ₂ 30%	15 µl
Na ₂ HPO ₄	10 mM	H ₂ O	do 10 ml
Tween 20	0,05%		

3.10 Izolacja rekombinowanych białek HP1021, HP1021NDC, HP1021CDC, HP1021DC

Komórkami *E. coli* BL21, zawierającymi odpowiedni wektor serii pET (Tab. 4), zaszczepiano 50 ml hodowli płynnej pożywki LB z kanamycyną (Rozdział 3.6.1). Inkubowano przez noc w temperaturze 37°C. 1000 ml pożywki LB z kanamycyną zaszczepiano 20 ml nocnej hodowli, inkubowano wytrząsając w temperaturze 37°C do gęstości optycznej OD₆₀₀ = 0,8. Hodowlę indukowano IPTG w stężeniu końcowym 0,05 mM i inkubowano około 2,5-3 godziny. Komórki zwirowywano (15 min, 5000 x g, 4°C). Osad zawieszano w 20 ml buforu w z dodatkiem inhibitora proteaz (Roche, nr. kat. 13812200) i poddawano działaniu ultradźwięków (Ultrasonic Desintegrator Type UD-11, 6x15 sekund, moc 5) w łaźni lodowej. Zawiesinę rozbitych komórek zwirowywano (40 min, 15000 rpm, 4°C). Po zwirowaniu supernatant przenoszono na odpowiednio przygotowaną kolumnę zawierającą złożę Strep-Tactin Superflow High Capacity (IBA Lifescience) (500 µl CV, *ang. column volume*). Następnie kolumnę przemywano pięciokrotnie buforem w jedną objętością kolumny (1x CV) (5 x 500 µl), a następnie jednokrotnie (1x CV) buforem w bez dodatku EDTA. Białko odmywano buforem E zbierając osobno sześć frakcji o objętości połowy objętości kolumny (0,5 x CV) (6 x 250 µl). Otrzymane frakcje przechowywano w 50% glicerolu w temperaturze -20°C. Czystość wyizolowanych frakcji białkowych sprawdzano przeprowadzając elektroforezę SDS-PAGE.

Tab. 12. Roztwory do izolacji białek rekombinowanych.

Bufor W		Bufor E	
Tris-HCl pH 8	100 mM	Tris-HCl pH 8	100 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
EDTA	1 mM	Destiobiotyna	2,5 mM

3.11 Badanie oddziaływań białek z DNA

3.11.1 Opóźniona migracja kompleksów nukleoproteinowych w żelu poliakrylamidowym

Fragmety DNA zawierające region *oriC2* przygotowywano w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów P17 oraz P18 (Tab. 5), a następnie otrzymany produkt oczyszczano z żelu agarozowego (Rozdział 3.7.6). Białka do reakcji izolowano jak opisano w rozdziale 3.10.1.

Reakcję prowadzono w objętości 20 μ l w buforze EMSA (Tab. 13). W skład mieszaniny wchodziło badane białko, fragment DNA znakowany FAM, oraz, jeżeli eksperyment tego wymagał reduktor TCEP w stężeniu 5 mM i/lub jony metali dwuwartościowych. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie schładzano na lodzie. Próbkę nanoszono na 4% żel poliakrylamidowy (Tab. 13). Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze 0,5x TBE przez 2 godziny przykładając napięcie 5-10 V/cm. Po skończonej elektroforezie żele wizualizowano z wykorzystaniem aparatu Typhoon FLA-9500 (GE Healthcare).

Tab. 13. Roztwory wykorzystywane w metodzie EMSA.

Bufor EMSA		4% żel poliakrylamidowy	
Tris-HCl pH 8	50 mM	H ₂ O	33,17 ml
NaCl	100 mM	Akrylamid-Bisakrylamid	
Triton X-100	0,2%	30:1, 35 %	4,6 ml
		10x TBE	2 ml
		APS 10%	220 μ l
		TEMED	14,2 μ l

3.11.2 Analiza oddziaływań nukleoproteinowych metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR)

Analizę oddziaływań w czasie rzeczywistym wykonywano w aparacie Biacore T200 (GE Healthcare) w temperaturze pokojowej. Analiza sensogramów wykonywana była za pomocą oprogramowania Biacore T200 Evaluation Software oraz Excel 2017.

3.11.2.1 Immobilizacja oligonukleotydów

Sensor opłaszczony streptawidyną (Sensor Chip SA, GE Healthcare nr kat. BR100032) umieszczono w aparacie. Powierzchnię sensora aktywowano poprzez płukanie każdego kanału buforem płuczającym 1.

Następnie do sensorów immobilizowano biotynylowane na jednym z 5' końców dwuniciowe fragmenty DNA (Tab. 14) o stężeniu 0,4 ng/ μ l w buforze do wiązania DNA (Tab. 15), którego szybkość przepływu w kanałach sensora ustalano na 15 μ l/min aż do związania odpowiedniej ilości DNA (100 RU). Niespecyficznie związane DNA odmywano przez płukanie kanałów buforem płuczającym 1, a następnie buforem płuczającym 2 (Tab. 15).

Tab. 14. Przygotowanie fragmentów DNA stosowanych w SPR.

NAZWA FRAGMENTU	SPOSÓB OTRZYMANIA	STARTERY	WIELKOŚĆ [pz]	OPIS
Bio-HP0180	PCR, produkt oczyszczany z żelu agarozowego	P39 P40	191	Kontrolny fragment DNA, niewiązany przez białko HP1021 (dane niepokazane)
Bio-HPoriC2		P41 P42	337	Fragment DNA zawierający sekwencję <i>oriC2</i>

3.11.2.2 Badanie oddziaływań białko-DNA

Roztwór białka w buforze EMSA (Rozdział 3.11.1) podawano na sensor z prędkością przepływu 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, wiązanie prowadzono przez 180 sekund. Fazę dysocjacji prowadzono przez 180 sekund przemywając powierzchnię buforem EMSA przy przepływie 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kanały regenerowano po każdym przepływie płuczając roztworem 0,005 % SDS przez 30 sekund a następnie równoważąc buforem EMSA.

3.11.2.3 Analiza wyników

Sensogramy przedstawiające przebieg reakcji wiązania i dysocjacji białka oddziałującego z DNA analizowano z wykorzystaniem programu Biacore T200 Evaluation Software. W celu normalizacji wyników, od krzywych uzyskanych dla analizy oddziaływania białka z badanym DNA odejmowano wykresy otrzymane dla oddziaływania białka z fragmentem DNA niezawierającym miejsca wiązania białka.

Tab. 15. Bufory SPR.

Bufor płuczący 1		Bufor do wiązania DNA	
NaOH	50 mM	Tris-HCl	100 mM
NaCl	1000 mM	NaCl	500 mM
		EDTA	1 mM
Bufor płuczący 2			
NaOH	50 mM		
NaCl	1000 mM		
Izopropanol	50 %		

3.12 Badanie wiązania jonów cynku przez białko

Badanie oddziaływania białka z jonami cynku przeprowadzono z wykorzystaniem odczynnika Zincon (Merck, 96440) i pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali 618 nm. Przygotowywano białko w stężeniu 200 μM z dodatkiem reduktora TCEP do stężenia 5 mM lub bez reduktora, które następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze 4°C. Do kuwet kwarcowych dodawano bufor E w objętości 1477,5 μl (Tab. 12), TCEP do stężenia 0,5

mM oraz Zincon do stężenia 100 μ M. Następnie do mieszaniny dodawano $ZnSO_4$ do stężenia 10 μ M. Wykonywano pomiar zerowy a następnie mieszaninę miareczkowano białkiem w objętościach 10 μ l wykonując pomiar absorbancji po każdym dodaniu białka. Z otrzymanych wyników wykreślono krzywą zależności absorbancji od stężenia białka. W taki sam sposób wykonano próbę kontrolną stosując bufor E zamiast białka.

3.13 Analiza obecności wolnych grup tiolowych *in vivo*

Eksperymenty prowadzono na podstawie protokołów literaturowych¹⁰³, z modyfikacjami. W eksperymencie zastosowano kwas 4-acetamido-4'-maleimidyllostilbene-2,2'-disulfonowy (AMS, Thermo Fisher Scientific, A485). Komórki *H. pylori* szczepu N6 oraz 26695 hodowano na płytkach Petriego na podłożu CBA a następnie w butelkach do hodowli komórkowych na podłożu BBL (Beckton Dickinson, 211088) z 1% β -cyklodekstryną (Sigma-Aldrich, C4767) do gęstości optycznej $OD_{600}=1$ (Rozdział 3.6.2). Następnie bezzwłocznie po otwarciu słoja hodowlanego przenoszono 1,8 ml hodowli do próbek zawierających 200 μ l 100% kwas trichlorooctowego (TCA). Kolejne próbki hodowli pobierano w odpowiednich odstępach czasu i traktowano podobnie TCA. Próbki inkubowano na lodzie przez 30 minut, a następnie wirowano (15000 rpm, 5 min, 4°C). Supernatant usuwano, osad delikatnie przepłukiwano 200 μ l zimnego acetonu i znów zwirowywano (15000 rpm, 5 min, 4°C). Supernatant ponownie usuwano, a osad suszono w temperaturze 37°C przez 15 minut. Następnie osad zawieszano w buforze AMS (Tab. 16) i inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 1400 rpm (Eppendorf Thermomixer Compact) przez noc. Próbki uzupełniano buforem do próbek SDS-PAGE bez β -MeOH. Otrzymane próbki rozdzielano elektroforetycznie (Rozdział 3.9.2), a następnie analizowano metodą Western Blotting (Rozdział 3.9.3).

Tab. 16. Bufor AMS.

Bufor AMS	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
SDS	0,1%
EDTA	10 mM
AMS*	20 mM

*kwas 4-acetamido-4'-maleimidyllostilbene-2,2'-disulfonowy

4 Wyniki

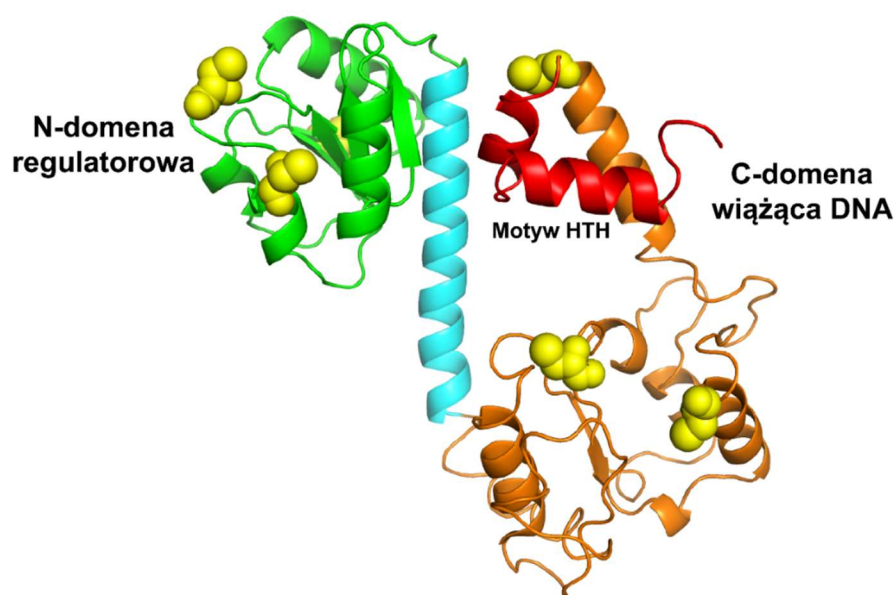
4.1 Charakterystyka białka HP1021 na podstawie analizy sekwencji i przewidywanej struktury drugo- i trzeciorzędowej

Białko HP1021 jest sierocym regulatorem odpowiedzi bakterii *H. pylori*, którego mechanizm regulacji pozostawał dotąd niescharakteryzowany. Z dotychczasowych badań wynika, że brak białka wpływa na ekspresję około 80 różnych genów⁴¹ oraz że HP1021 prawdopodobnie uczestniczy w regulacji inicjacji replikacji chromosomu *H. pylori*⁴⁰. Białko to, posiada w części C-końcowej domenę HTH wiążącą DNA⁴¹. Jak zauważono w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej, posiada ono w swej sekwencji również sześć reszt cysteinowych, które będąc jednymi z rzadziej występujących aminokwasów, często w ważnych regionach białek, mogą brać udział w mechanizmie regulacji aktywności badanego białka. Obecne w białkach reszty cysteinowe mogą ulegać reakcjom redoks¹⁰⁴ oraz mogą posiadać właściwości wiązania jonów metali dwuwartościowych¹⁰⁵. Dotychczas, mimo kilku prób, nie udało się uzyskać struktury krystalicznej badanego białka (Szczepanowski, dane nieopublikowane), natomiast wykorzystując system przewidywania struktury Phyre2 otrzymano model sugerujący budowę dwudomenową badanego białka. W oparciu o uzyskany model białka HP1021 zaproponowano, że N-końcowa część może posiadać właściwości domeny regulatorowej, natomiast C-końcowa część, ze względu na obecność motywu HTH, domeny wiążącej DNA. Podobną budowę wykazano w przypadku drugiego sierociego regulatora odpowiedzi *H. pylori*, HP1043¹⁰⁶.

10	20	30	40	50	60
MKILIIEDDL	ALARSISHNL	HDLGHFCEII	SSISEENKEP	YDVILVSSKV	CTQGRCEHFV
70	80	90	100	110	120
RYNSKQIIIM	MASHVNEEDGV	NKPIQAGARD	YILKPFKMDE	LLRKIQYHKA	YQEMTARLGF
130	140	150	160	170	180
YENYLDFIHA	ELPLPKDFS	RPPFIIHTPS	QELANAYLLQ	YAKERQMDFS	FFSLKDTTWK
190	200	210	220	230	240
ELYKNKDKLE	RPFYIMHLEE	LKKDEQLKLL	ELARSCPIVL	SYTHKEPLEF	PKIVSIECGN
250	260	270	280	290	
KPLSLFNNHT	TFLSIQEYEK	EAIRHFSSTC	TDTELANHTKKLG	ISRKSLWEKR	RKYNLF

motyw HTH

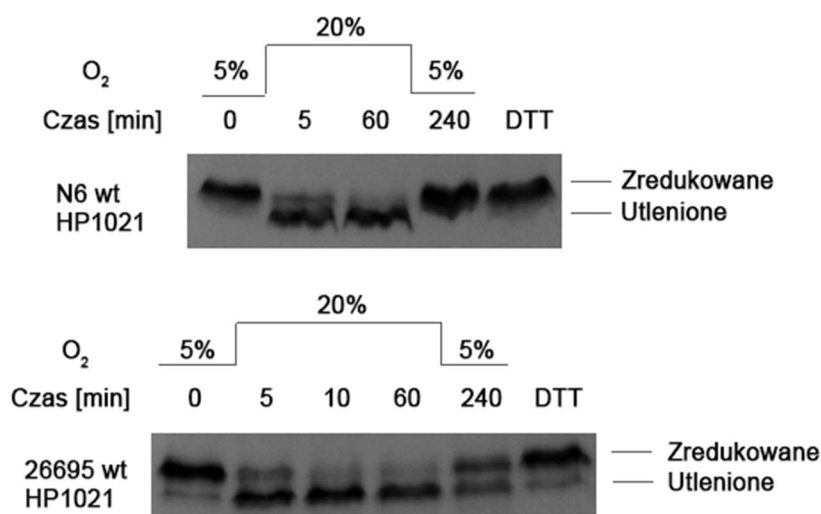
Rys. 5. Sekwencja aminokwasowa białka HP1021. Kolorem żółtym zaznaczono występujące w białku reszty cystein. Kolorem czerwonym oznaczono motyw HTH wiążący DNA. Motyw HTH przewidziano wykorzystując program Gym 2.0¹⁰⁷.



Rys. 6. Przewidywana struktura białka HP1021 otrzymana przy użyciu programu Phyre2. Analiza modelu wskazuje na dwudomenową budowę białka HP1021. Domena N-końcowa połączona jest z domeną C-końcową za pośrednictwem alfa-helisy, co zapewnia prawdopodobnie ruchliwość domen względem siebie. Kolorem żółtym zaznaczone są występujące w białku reszty cysteinowe (C27, C51, C56, C216, C238 oraz C270). Motyw HTH, oznaczony na czerwono, znajduje się w domenie C-końcowej (Rys. 1).

4.2 Analiza obecności wolnych grup tiolowych *in vivo* w białku HP1021

Analiza sekwencji aminokwasowej HP1021 wykazała obecność 6-ciu reszt cysteinowych (Rozdział 4.1). Grupy tiolowe reszt cysteinowych mogą ulegać utlenieniu w zależności od warunków redoks środowiska oraz najbliższego otoczenia aminokwasowego¹⁰⁸. Dotychczas nie wiadomo było, czy reszty cysteinowe w białku HP1021 podlegają redukcji lub utlenieniu *in vivo*. Dlatego postanowiono sprawdzić, czy przeniesienie hodowli bakterii *H. pylori* z warunków mikroaerofilnych do warunków tlenowych będzie skutkowało utlenieniem reszt cysteinowych w badanym białku. W badaniach wykorzystano odczynnik AMS specyficznie reagujący z wolnymi grupami tiolowymi w białkach¹⁰³. Przyłączenie jednej cząsteczki AMS do jednej wolnej grupy tiolowej skutkuje wzrostem masy cząsteczkowej białka o 490 Da. Wykonana analiza pozwoliła na ocenę stanu utlenienia reszt cysteinowych w białku HP1021 w warunkach mikroaerofilnych jak również w warunkach szoku oksydacyjnego na podstawie rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (Rys. 7).



Rys. 7. Znakowanie białka HP1021 odczynnikiem AMS *in vivo*. Hodowlę bakteryjną poddano działaniu tlenu atmosferycznego i pobierano próbki w czasie stresu (szczep N6: po 5 i 60 minutach; szczep 26695: po 5, 10 i 60 minutach), a następnie przeniesiono do warunków mikroaerofilnych na czas 3 godzin. Próbka z DTT służyła kontroli w celu utrzymania warunków redukujących środowiska (odcynnika DTT dodano do hodowli kontrolnej przed szokiem oksydacyjnym).

Badania wykazały obecność większej liczby wolnych grup tiolowych w białku HP1021 w warunkach mikroaerofilnych niż w warunkach tlenowych. W komórkach *H. pylori* w warunkach mikroaerofilnych (Rys. 7, 5% O₂, czas 0) oraz w próbkach traktowanych DTT, które wprowadzało silnie redukujące warunki środowiska, obserwowano podobną migrację białka HP1021, które prawdopodobnie było zredukowane i znakowało się odczynnikiem AMS. Po poddaniu hodowli działaniu tlenu atmosferycznego (Rys. 7, 21% O₂, 5, 10 i 60 min) można zauważyć, że białko HP1021 migruje szybciej niż białko HP1021 z komórek w warunkach mikroaerofilnych. Świadczy to prawdopodobnie o jego mniejszej masie cząsteczkowej niż masa cząsteczkowa białka w warunkach redukujących, co z kolei wynika z mniejszej liczby przyłączonych cząsteczek odczynnika AMS. Dowodzi to, że grupy tiolowe reszt cysteinowych obecnych w białku uległy utlenieniu pod wpływem warunków utleniających, którym poddana została hodowla bakteryjna. Co ciekawe, badania wykazały, że już pięciominutowe poddanie hodowli działaniu tlenu atmosferycznego powoduje utlenienie większości cząsteczek białka HP1021 obecnych w komórce, co świadczy o wysokiej czułości reszt cysteinowych na warunki redoks. Dodatkowo wykazano, że przeniesienie hodowli szokowanej z powrotem do warunków mikroaerofilnych na czas 3 godzin skutkuje pojawieniem się cząsteczek białka w formie zredukowanej. Jednakże na obecnym etapie nie wiadomo, czy białko ulega procesowi odwracalnego utlenienia/redukcji, czy forma utleniona zostaje zdegradowana i syntezowane jest nowe białko w formie zredukowanej.

4.3 Izolacja rekombinowanych białek: HP1021 oraz muteiny HP1021DC

Analizy przeprowadzone w komórkach *H. pylori* wykazały, że reszty cystein białka HP1021 podlegają redukcji i utlenieniu w zależności od warunków redoks (Rozdział 4.4.1). Przygotowanie serii konstruktów plazmidów ekspresyjnych i izolacja kilku wariantów rekombinowanych białek miała na celu uzyskanie preparatów białek wykorzystywanych później do charakterystyki HP1021 oraz roli reszt cysteinowych w regulacji aktywności białka HP1021 *in vitro*. Wszystkie oczyszczane białka posiadały metkę Strep-tag II na N-końcu białka rekombinowanego (Tab. 4; ¹⁰⁹). Oczyszczano dwa warianty badanego białka: HP1021 (wariant dziki białka) oraz HP1021DC (muteina HP1021 C27A C52A C56A C216A C238A C270A) (Rozdział 3.1.4)

4.3.1 Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021

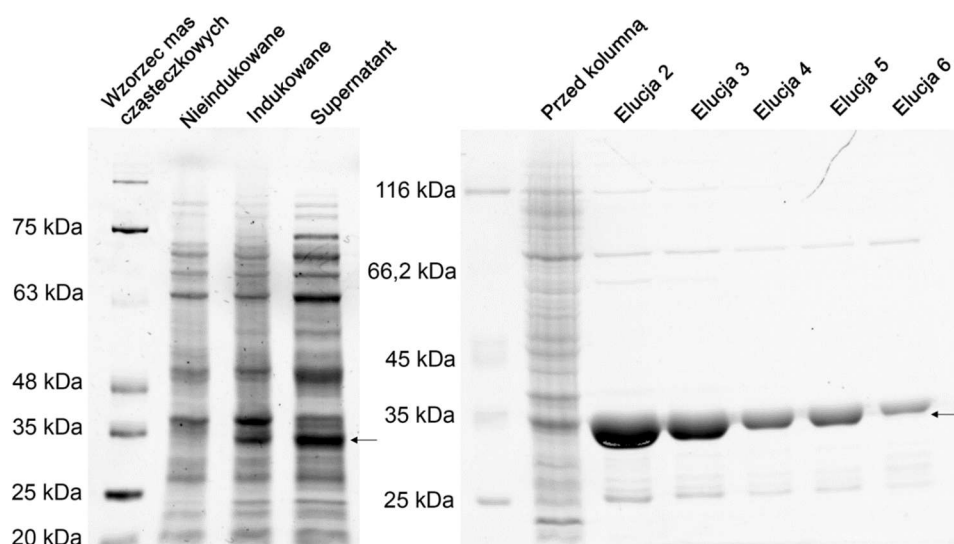
4.3.1.1 Konstrukcja wektora pET-28a(+)*Nstrep*HP1021

Gen *HP1021* powielono w reakcji PCR na matrycy genomowego DNA szczepu 26695 *H. pylori* wykorzystując parę starterów P3 i P4 (Tab. 5). Produkt reakcji PCR (898 pz) poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi BamHI oraz XhoI, a następnie wklonowano w wektor pET28a(+)*Nstrep* (Tab. 4) trawiony tymi samymi enzymami. Następnie mieszaniną ligacyjną transformowano komórki *E. coli* szczepu DH5 α (Rozdział 3.7.12.1.). Z uzyskanych klonów izolowano plazmidowy DNA. W celu sprawdzenia poprawności klonowania wklonowany gen po uprzednim zamplifikowaniu z wykorzystaniem starterów P53 i P54 poddano reakcji sekwencjonowania. Po stwierdzeniu poprawności sekwencji wklonowanego genu, uzyskanym plazmidem pET28a(+)*Nstrep*HP1021 stransformowano komórki *E. coli* BL21 (Rozdział 3.7.12.1), z których następnie izolowano rekombinowane białko HP1021 (Rozdział 3.10.1).

4.3.1.2 Izolacja białka HP1021

Białko HP1021, o obliczonej na podstawie sekwencji masie cząsteczkowej 36,7 kDa, oczyszczano z 1000 ml indukowanej IPTG (0,05 mM, 3 godziny indukcji) hodowli komórek *E. coli* BL21 zawierających plazmid pET-28a(+)*Nstrep*HP1021 (Rozdział 3.10.). Białko znajdujące się we frakcji rozpuszczalnej po rozbiciu komórek izolowano na złożu Strep-Tactin Superflow high capacity (IBA). Otrzymane frakcje analizowano elektroforetycznie (Rys. 8).

Uzyskano około 4 mg białka HP1021 o stopniu czystości wynoszącym około 95%. Stężenie otrzymanych frakcji (po 250 μ l) wahało się od 0,3 mg/ml (frakcja 6) do 2,8 mg/ml (frakcja 3). W badaniach stosowano preparaty o stężeniu 0,7-2,8 mg/ml.



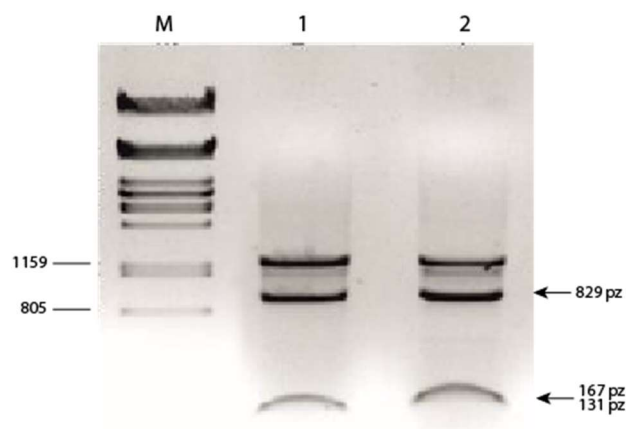
Rys. 8. Analiza etapów oczyszczania białka HP1021. Białko o przewidywanej masie 36,7 kDa izolowano z komórek *E. coli* BL21 niosących plazmid pET28a(+)*Nstrep*HP1021; analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu SDS-PAGE zawierającym TCE, żel wizualizowano z wykorzystaniem metody *StainFree* oraz urządzenia *GelDoc*. Wzorzec mas cząsteczkowych – *Pierce Unstained protein MW Marker* nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją IPTG; Indukowane – lizat komórek po indukcji IPTG; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na żel; Elucja 2-6 - frakcje eluowane z kolumny buforem z destiobiotyną; strzałką zaznaczono rekombinowane białko HP1021.

4.3.2 Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021DC

4.3.2.1 Konstrukcja wektora pET28a(+)*Nstrep*HP1021DC

Praca miała na celu przygotowanie konstruktów do syntezy białka HP1021, w którym reszty cysteinowe (C27, C51, C56, C216, C238 oraz C270) zostały zamienione na reszty alanin. W celu przygotowania konstruktów wykorzystano uprzednio przygotowane dwa plazmidy pET28a(+)*Nstrep*HP1021NDC oraz pET28a(+)*Nstrep*HP1021CDC posiadające mutację w genie HP1021 (Rozdziały 4.6.1.1 oraz 4.6.2.1). Plazmid pET28a(+)*Nstrep*HP1021NDC (Rozdział 4.6.1.1.) trawiono enzymami restrykcyjnymi *Bam*HI oraz *Mun*I w celu uzyskania fragmentu genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C27, C51, C56 (Załącznik 1; Załącznik 3). Produkty trawienia rozdzielono w żelu agarozowym. Następnie wycięto i oczyszczono z żelu agarozowego fragment DNA o długości 620 pz, po czym wklonowano oczyszczony fragment genu do wektora pET28a(+)*Nstrep*HP1021CDC (Rozdział 4.6.2.1.) otrzymanego na drodze trawienia tymi samymi enzymami i oczyszczonego z żelu agarozowego. Mieszaninę ligacyjną transformowano komórki *E. coli* DH5 α . Następnie

wybrane na drodze selekcji antybiotykowej klon hodowano i wyizolowano plazmid w skali miniprep (Rozdział 3.7.1.). Na matrycy otrzymanego plazmidu przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów P53 i P54, uzyskany produkt reakcji następnie poddano analizie poprzez trawienie restrykcyjne enzymami BamHI/Ascl (Załącznik 2; Załącznik 3). Otrzymano fragmenty DNA o masach 131 pz, 167 pz oraz 850 pz (Rys. 9), co wskazywało na poprawność klonowania; nie było konieczności sekwencjonowania ze względu na wykorzystanie uprzednio zweryfikowanych sekwencjonowaniem konstruktów (Rozdział 4.6.1.1 i 4.6.2.1). Otrzymanym plazmidem transformowano komórki *E. coli* BL21, z których następnie izolowano rekombinowane białko HP1021DC.

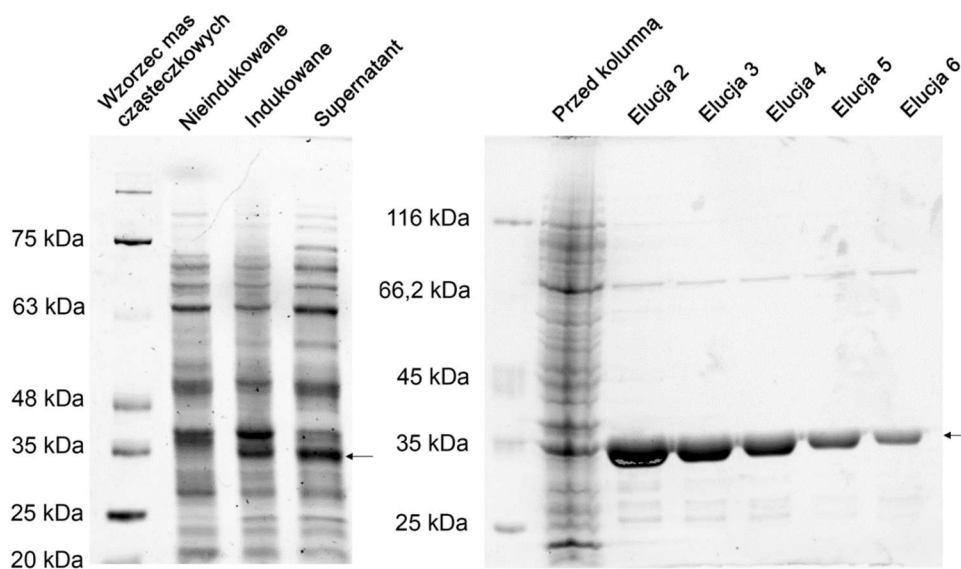


Rys. 9. Analiza trawienia genu HP1021DC zamplifikowanego z użyciem starterów P53 i P54 na matrycy pET28a(+)*Nstrep*HP1021DC. Do trawienia wykorzystano enzymy BamHI oraz Ascl ze względu na wprowadzone miejsca restrykcyjne podczas mutacji. M, wzorzec mas cząsteczkowych Lambda/PstI [pz]; 1,2, reakcja trawienia amplikonów HP1021DC, powstałych na matrycy dwóch różnych klonów *E. coli* niosących plazmid pET28a(+)*Nstrep*HP1021DC. Strzałkami z prawej strony oznaczono spodziewane wysokości produktów trawienia. Prążek DNA widoczny powyżej 829 pz jest niedotrawionym substratem reakcji trawienia.

4.3.2.2 Izolacja białka HP1021DC

Białko HP1021DC oczyszczano na złożu Strep-tactin Superflow high capacity (IBA) z 1000 ml indukowanej IPTG (0,05 mM, 3 godziny indukcji) hodowli komórek *E. coli* BL21 zawierających plazmid pET28a(+)NstrepHP1021DC (Rozdział 3.10). Otrzymane frakcje analizowano elektroforetycznie (Rys. 10).

Uzyskano około 3 mg białka HP1021DC (masa cząsteczkowa obliczona na podstawie sekwencji: 36,7 kDa), o stopniu czystości wynoszącym około 95%. Stężenie otrzymanych frakcji (po 250 μ l) wahało się od 0,6 mg/ml (frakcja 6) do 2,5 mg/ml (frakcja 3). W badaniach stosowano preparaty o stężeniu 0,6-2,5 mg/ml.

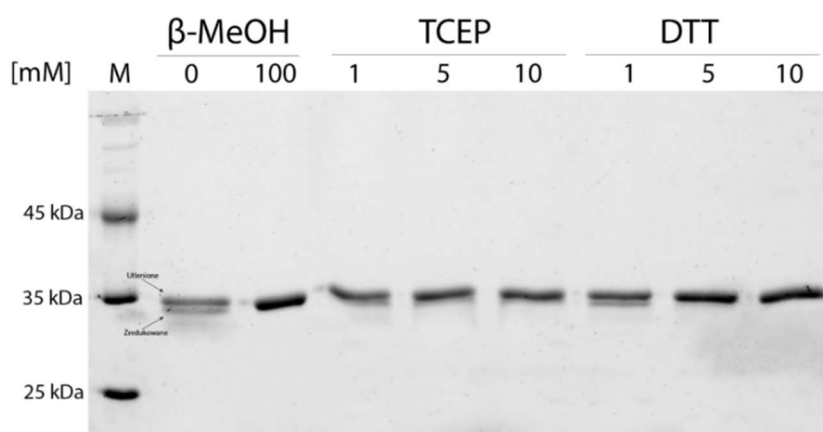


Rys. 10. Analiza etapów izolacji białka HP1021DC. Białko o masie około 36 kDa izolowano z komórek *E. coli* BL21 pET28HPNStrep1021DC; analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu SDS-PAGE zawierającym TCE, żel wizualizowano z wykorzystaniem metody StainFree oraz urządzenia GelDoc. Wzorzec mas cząsteczkowych –Pierce Unstained protein MW Marker nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją IPTG; Indukowane – lizat komórek po indukcji IPTG; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożo; Elucja 2-6 - frakcje eluowane z kolumny buforem z destiobiotyną; strzałką zaznaczono rekombinowane białko HP1021DC.

4.4 Charakterystyka białka HP1021

4.4.1 Analiza stanu redoks białka HP1021

Badania przeprowadzono w celu określenia czy reszty cysteinowe obecne w białku rekombinowanym HP1021 (Rozdział 4.1) mogą podlegać redukcji lub utlenieniu *in vitro* w zależności od warunków środowiska, podobnie jak to ma miejsce *in vivo* (Rozdział 4.2). Utlenienie grup tiolowych często prowadzi do utworzenia mostków disiarczkowych. Tworzenie się mostków disiarczkowych międzycząsteczkowych prowadzi do powstania form oligomerycznych białka (dimerów, trimerów, i wyższych oligomerów), natomiast utworzenie mostków wewnątrzcząsteczkowych skutkuje zwykle zmianą konformacji białka. W obu wypadkach białko zmienia szybkość migracji w żelu poliakrylamidowym¹¹⁰. Analizę stanu redoks reszt cysteinowych HP1021 przeprowadzono z wykorzystaniem próbki białka nieredukowanego oraz próbek białka poddanego działaniu czynników redukujących: DTT oraz TCEP, w różnych stężeniach. Stosowano różne reduktory ze względu na ich różną siłę i specyficzność działania¹¹¹. Do próbek białka (1 μg) izolowanego w warunkach nieredukujących (Rozdział 3.10.1) dodano czynnik redukujący w stężeniach 1-10 mM, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 25 minut. Następnie do próbki dodano obciążnika 4x β bez β -MeOH (Tab. 6) i denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 minut. Jako kontrolę zastosowano próbkę z obciążnikiem 4x β z β -MeOH (Tab. 6). Próbki rozdzielano elektroforetycznie w 10% żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE (Rys. 11).



Rys. 11. Analiza redukcji białka HP1021 przez czynniki redukujące DTT i TCEP. Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE w żelu 10% z dodatkiem TCE. Ścieżka 1 – Marker mas cząsteczkowych; Pierce Unstained MW Marker nr. kat. 26610 Ścieżka 2 – białko HP1021 nietraktowane czynnikiem redukującym; Ścieżki 3-9 – białko HP1021 traktowane czynnikiem redukującym zgodnie z opisem nad żelem.

Białko w warunkach redukcji 100 mM β -MeOH widoczne jest jako pojedynczy prążek o spodziewanej masie cząsteczkowej około 35 kDa. W przypadku niezastosowania reduktora β -MeOH, rozdzielając białko nieredukowane (jak oczyszczono; Rozdział 4.3.1.2.), pojawia się dodatkowy prążek migrujący szybciej niż białko zredukowane, co wskazuje na to, że białko HP1021 wykazuje zdolność do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych. Zastosowanie reduktora powoduje zniszczenie powstałych mostków i zmianę konformacji białka. DTT prawdopodobnie wydajniej redukuje badane białko, ponieważ niższe stężenie DTT niż TCEP prowadzi do wydajniejszej redukcji mostków disiarczkowych. Natomiast do późniejszych badań zdecydowano się stosować TCEP ze względu na jego dużo mniejszą zdolność wiązania jonów metali w porównaniu z DTT (¹¹² oraz rozdział 4.9).

4.5 Oddziaływanie białek HP1021 i HP1021DC z DNA

Jak wykazano w wcześniejszych badaniach, białko HP1021 posiada zdolność wiązania DNA^{113,41}. Dotychczas nie badano jednak czy warunki redoks środowiska (utleniające/redukujące) wpływają na oddziaływanie HP1021 z DNA. Dlatego w pracy postanowiono zbadać czy stan redoks białka HP1021 wpływa na jego oddziaływanie z DNA. Porównywano oddziaływanie białka niezredukowanego, posiadającego prawdopodobnie utlenione reszty cystein oraz białka zredukowanego TCEP, w którym reszty cystein zostały zredukowane (Rys. 11).

Oddziaływanie białka HP1021 z DNA analizowano metodami opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym EMSA (*ang. electroforetic mobility shift assay*) oraz powierzchniowego rezonansu plazmonów SPR (*ang. surface plasmon resonance*). Do analizy stosowano dzikie białko HP1021 oraz muteinę HP1021DC. Analizowano oddziaływanie wyżej wymienionych białek z regionem *oriC2 H. pylori*, w którym wykazano obecność 3 sekwencji wiązanych przez białko HP1021 (tzw. boksów HP1021) (Rys. 12)⁴⁰. Zaznaczyć należy, że nie wiadomo czy białko HP1021 wiąże boksy o różnych sekwencjach (TGTTTCA i TGTTACT) z takim samym czy różnym powinowactwem.

Sekwencja *OriC2*

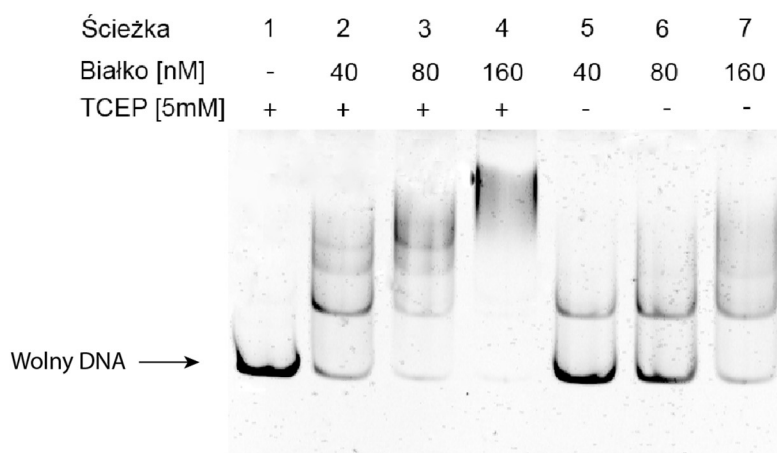
AGGCTTATGAAAAAGCGTTTCATTCACTTCTTTTCAAATCCCACAACCCCCCTAAAAACCACACCTCTAAAG
 CTTTTATTGTTTCATTCCATCCATTACGCCCCCTACTACTGTTACTAATTATTATTAATTAAGTGTACTTATC
 TATAACCTATTTATGACTTTTACTAAACCTTTTTTTAAGCTATAATCCAAAAATCTAAAATAAAAAGGAATAAG

Rys. 12. Sekwencja *oriC2* z zaznaczonymi bokсами wiązanyimi przez białko HP1021. Na podstawie ⁴⁰.

4.5.1 Badanie oddziaływania białek HP1021 i HP1021DC z DNA metodą EMSA

4.5.1.1 Opóźniona migracja kompleksów HP1021-*oriC2* w żelu

Celem eksperymentu była ocena wpływu warunków redoks na zdolność wiązania DNA przez białko HP1021. Białko HP1021 inkubowano w temperaturze 37°C z wyznakowanym FAM regionem *oriC2* (FAM-*oriC2*, 5 nM) w obecności reduktora TCEP (4 mM) lub bez reduktora (Rozdział 3.11.1). Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rozdział 3.11.1), a następnie analizowano przy użyciu aparatu Typhoon FLA-9500 (Rys. 13).



Rys. 13. Opóźniona migracja regionu FAM-*oriC2* związanego z białkiem HP1021 w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.

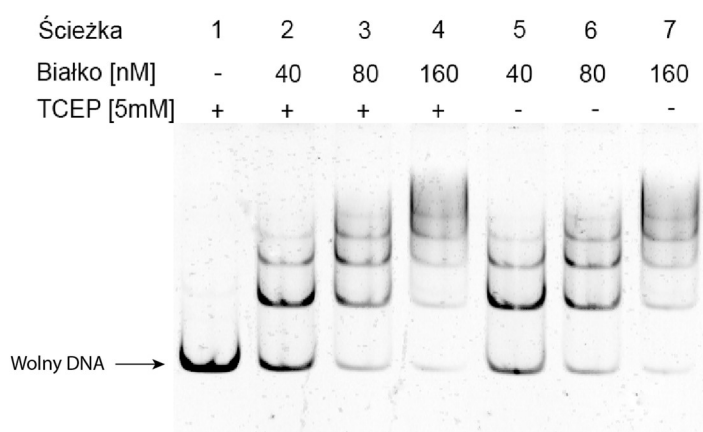
Zredukowane i niezredukowane HP1021 oddziaływało z DNA (Rys. 13). Zredukowane białko HP1021 wiązało DNA tworząc 3 lub 4 typy kompleksów widocznych jako 3-4 prążki DNA migrujące wolniej od niezwiązanego DNA, przy prawie całkowitym związaniu obecnego w próbce DNA w zakresie stosowanych stężeń (40-160 nM, Rys. 13). W najwyższym stężeniu (160 nM) białko tworzyło wysokocząsteczkowe kompleksy z DNA. Liczba obserwowanych

prążków prawdopodobnie wskazuje na liczbę cząsteczek białka oddziałujących z 1 cząsteczką DNA, a w przypadku kompleksów o dużej masie cząsteczkowej na powstanie złożonych kompleksów nukleoproteinowych o bliżej nieokreślonej stechiometrii. Białko w warunkach nieredukujących tworzyło mniej rodzajów kompleksów nukleoproteinowych (jeden lub dwa) oraz można było zauważyć obecność większej ilości niezwiązanego DNA niż w przypadku białka zredukowanego w takim samym stężeniu. Świadczy to o niższym powinowactwie niezredukowanego HP1021 do DNA w porównaniu do białka zredukowanego.

W wyniku analizy potwierdzono oddziaływanie HP1021 z DNA, oraz wykazano, że stopień utlenienia reszt cysteinowych wpływa na powinowactwo białka do DNA, które jest najwyższe gdy reszty cysteinowe pozostają zredukowane.

4.5.1.2 Opóźniona migracja kompleksów HP1021DC-*oriC2* w żelu

Wykazano, że stan redoks HP1021 wpływa na jego powinowactwo do DNA (Rys. 13). Aby potwierdzić, że wynik otrzymany dla białka HP1021 jest specyficznie zależny od stopnia utlenienia reszt cysteinowych, zbadano oddziaływanie muteiny HP1021DC, która nie zawiera reszt cysteinowych, z regionem *oriC2* w różnych warunkach redoks. Białko HP1021DC inkubowano z DNA w takich samych warunkach jak białko HP1021 (Rozdział 3.11.1 oraz 4.5.1.1). Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rys. 14).



Rys. 14. Opóźniona migracja regionu FAM-*oriC2* związanego z białkiem HP1021DC w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.

Białko HP1021DC oddziaływało z regionem *oriC2*, co wskazuje na to, że obecność reszt cysteinowych nie jest niezbędna do oddziaływania HP1021 z DNA. Oddziaływanie HP1021DC-

oriC2 było niezależne od warunków redoks, o czym świadczy podobny profil ubywania wolnego DNA wraz ze wzrostem stężenia białka w warunkach redukujących i nieredukujących oraz podobna liczba kompleksów nukleoproteinowych powstających dla tych samych stężeń białka zredukowanego i nieredukowanego. Tym samym potwierdzono, że zaobserwowana zmiana aktywności białka HP1021 zależnie od warunków redoks (Rys. 13) swoiście zależy od redukcji/utlenienia reszt cysteinowych.

4.5.2 Badanie oddziaływania białek HP1021 i HP1021DC z DNA metodą SPR

Powierzchniowy rezonans plazmonów (ang. *surface plasmon resonance*, SPR) jest techniką opartą na pomiarze zmiany współczynnika załamania światła spowodowanej oddziaływaniem cząsteczek przepływających nad powierzchnią sensora z cząsteczkami do niego związanymi (np. DNA). W wyniku analizy otrzymuje się wykres (tzw. sensogram) zmiany rezonansu powierzchni w czasie wyrażany w jednostkach RU. Zmiana RU jest proporcjonalna do masy związanych cząsteczek do powierzchni sensora, przy czym 1 RU odpowiada związaniu 1 pg białka/1 mm² powierzchni sensora. Otrzymany sensogram można podzielić na trzy fazy:

- Faza I – jest to faza asocjacji, w której dochodzi do związania cząsteczek analitu z ligandem związanym do powierzchni sensora. Przyrost wartości RU w tej fazie spowodowany jest przyrostem masy cząsteczek na powierzchni sensora
- Faza II – stan równowagi; bywa niewidoczny na sensogramie z powodu niestabilności powstałych kompleksów lub nieosiągnięcia stanu równowagi
- Faza III – faza dysocjacji czyli rozpadu powstałych kompleksów. W tej fazie można zauważyć spadek wartości RU na skutek spadku masy cząsteczek związanych z powierzchnią sensora

Analizę przeprowadzono dla wszystkich białek opisanych w niniejszej pracy. Wykorzystano następujące biotynylowane fragmenty DNA przygotowane uprzednio w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów znakowanych biotyną (Rozdział 3.11.2.1.):

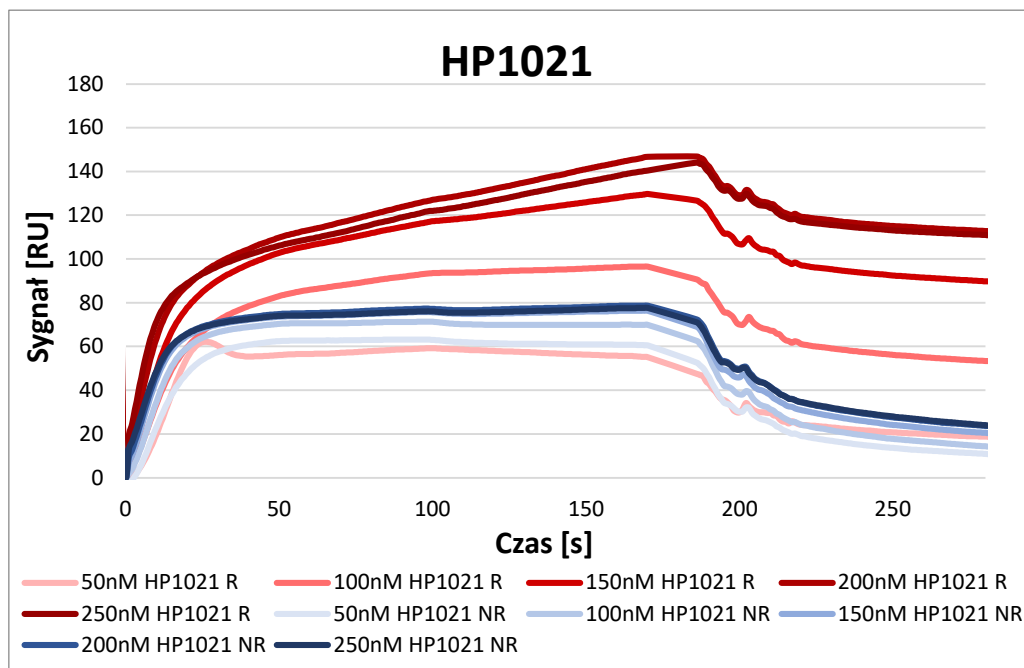
- Kanał nr 1: Biotynylowany fragment genu HP0180 (BIO-HP0180), niezawierający sekwencji wiązanej przez białko HP1021 (Załącznik 6)

- Kanał nr 2: Biotynylowany fragment *H. pylori oriC2* (BIO-*oriC2*), zawierający trzy sekwencje związane przez białko HP1021 (Rys. 12; Załącznik 6)

W analizie wykorzystano białka zawieszone w buforze EMSA w stężeniach 50-250 nM. Wynik otrzymywano w postaci sensogramów, które następnie opracowywano z uwzględnieniem oddziaływań nieswoistych (Rozdział 3.11.2.).

4.5.2.1 Analiza oddziaływania białka HP1021 z *oriC2*

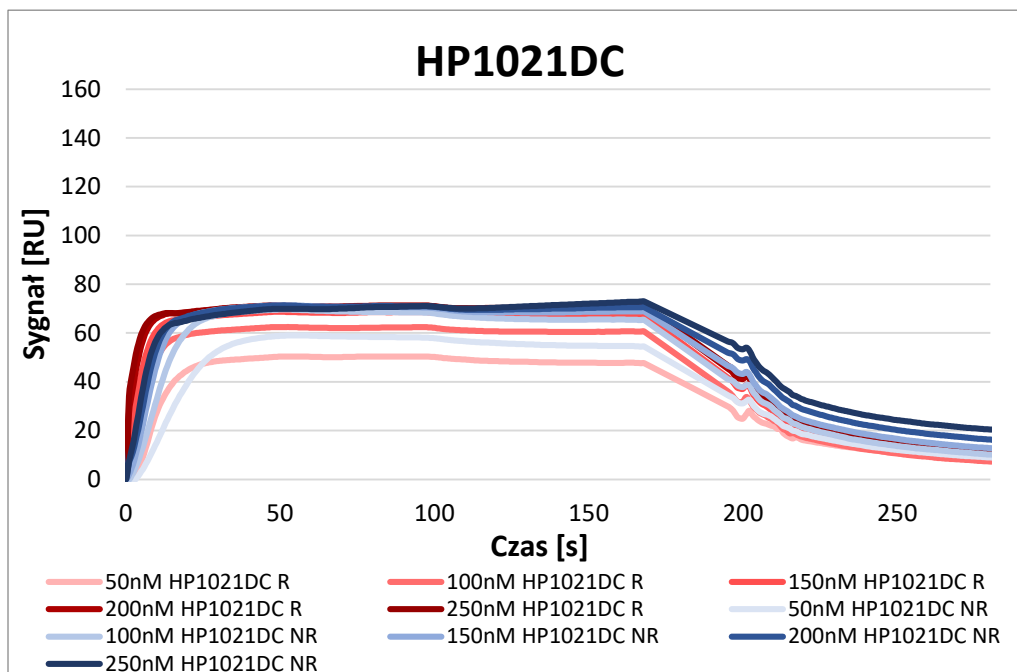
Analizie poddano oddziaływanie białka HP021 z *oriC2* w warunkach redukujących (5mM TCEP) i nieredukujących. Wykazano, że białko HP1021, zarówno nieredukowane jak i zredukowane, wiąże się z regionem *oriC2* (Rys. 15). Podobna ilość białka nieredukowanego oddziaływała z DNA w całym zakresie stosowanych stężeń (około 60-80 RU w zakresie 50-250 nM HP1021), co wskazuje na to, że w zakresie stosowanych stężeń wiązanie zostało wysyczone. Białko zredukowane wiązało *oriC2* zależnie od zastosowanego stężenia, przy czym im wyższe stężenie białka stosowano tym więcej HP1021 wiązało się z regionem *oriC2* (od ok. 60 RU do około 145 RU w zakresie 50-250 nM białka). Przy najwyższym stężeniu białek (250 nM) z DNA związane było prawie dwukrotnie więcej zredukowanego HP1021 niż białka niezredukowanego. Stąd wniosek, że, w porównaniu do oddziaływań białka niezredukowanego, białko zredukowane wykazuje wyższą wydajność wiązania *oriC2* (wykazuje wyższe powinowactwo do *oriC2* lub więcej cząsteczek zredukowanego białka HP1021 oddziałuje z DNA). Należy również zwrócić uwagę na fazę dysocjacji, która wskazuje na szybszą dysocjację cząsteczek nieredukowanego białka niż białka zredukowanego, co z kolei świadczy o wyższej stabilności kompleksów nukleoproteinowych tworzonych przez białko zredukowane niż białko niezredukowane. Podsumowując, uzyskane wyniki SPR świadczą o wpływie stanu redoks reszt cysteinowych HP1021 na wiązanie *oriC2*, przy czym redukcja reszt cysteinowych białka zwiększa aktywność wiązania DNA przez HP1021 oraz stabilizuje kompleksy nukleoproteinowe. Wyniki potwierdzają wcześniej uzyskane wyniki w analizie EMSA (Rozdział 4.5.1.1, Rys. 13).



Rys. 15. Analiza SPR wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko (R) redukowano 5 mM TCEP.

4.5.2.2 Analiza oddziaływania białka HP1021DC z *oriC2*

Analizie poddano oddziaływanie białka HP1021DC z *oriC2* w warunkach redukujących (5mM TCEP) i nieredukujących (Rys. 16). Białko poddane działaniu reduktora oraz białko nie traktowane czynnikiem redukującym oddziaływało z DNA. Nie zaobserwowano znaczących różnic w oddziaływaniu obu form białka z DNA zarówno pod względem kinetyki wiązania jak i ilości związanego białka z DNA. Wiązanie DNA przez białko HP1021DC przypominało oddziaływanie utlenionego białka HP1021 (Rys. 15), o czym świadczy zarówno ilość związanego białka (ok. 60-70 RU) jak i przebieg krzywych asocjacji i dysocjacji. Wyniki świadczą o tym, że reszty cysteinowe nie są niezbędne do oddziaływania białka z DNA, a obserwowany efekt zależności wiązania DNA przez białko HP1021 od warunków redoks jest specyficznie zależny od redukcji lub utlenienia reszt cysteinowych. Otrzymany wynik, podobnie jak wynik analizy EMSA (Rozdział 4.5.1.2, Rys. 14), wskazuje na to, że reszty cysteinowe białka HP1021 oraz ich stopień utlenienia wpływają na regulację aktywności HP1021.



Rys. 16. Analiza wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021DC metodą SPR. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko zredukowano 5 mM TCEP.

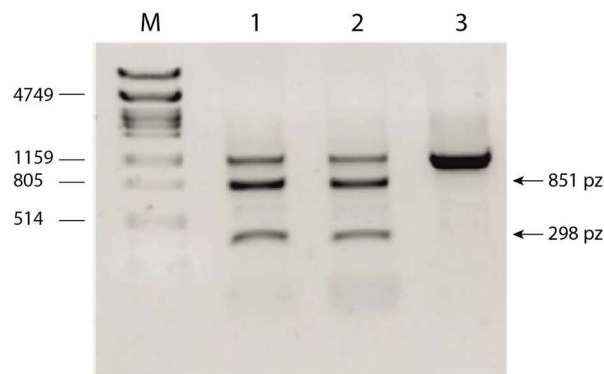
4.6 Izolacja rekombinowanych białek HP1021NDC i HP1021CDC

W analizach EMSA i SPR wykazano, że reszty cysteinowe białka HP1021 nie są niezbędne do oddziaływania z DNA, ale są istotne dla regulacji aktywności oddziaływania białka z DNA (Rozdział 4.5). Jak zaznaczono w rozdziale 4.1, HP1021 charakteryzuje się prawdopodobnie budową dwudomenową, przy czym każda z domen posiada po 3 reszty cysteinowe (C27, C51 i C56 w przypuszczalnej regulatorowej domenie N-końcowej; C216, C238 oraz C270 w C-końcowej domenie wiążącej DNA). Ciekawym pytaniem zatem było, czy i w jakim stopniu reszty cysteinowe obu domen są zaangażowane w regulację aktywności białka. Dlatego następnym etapem analiz było oczyszczenie białek, w których reszty cysteinowe każdej z domen zmieniono na niewrażliwe na zmiany redoks reszty alanin, a następnie zbadanie oddziaływania tych wariantów białek z DNA.

4.6.1 Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021NDC

4.6.1.1 Konstrukcja wektora pET28a(+)*Nstrep*HP1021NDC

W reakcji PCR na matrycy plazmidu pET28a(+)*Nstrep*HP1021 powielono fragmenty genu HP1021 z wykorzystaniem par starterów P5/P7, P6/P9 oraz P8/P16. Otrzymane fragmenty rozdzielono elektroforetycznie, a następnie oczyszczono (Rozdział 3.7.6.). Następnie otrzymane produkty PCR połączono w reakcji OE-PCR (Rozdział 3.7.11.) z wykorzystaniem pary starterów P1 oraz P16. Otrzymany produkt reakcji PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI oraz XhoI, a następnie wklonowano w wektor pET28a(+)*Nstrep* trawiony tymi samymi enzymami. Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki *E. coli* DH5 α (Rozdział 3.7.12.1). Następnie komórki z wybranych kolonii transformantów hodowano w pożywce płynnej i wyizolowano z nich plazmid w skali miniprep (Rozdział 3.7.1.) Poprawność wklonowania fragmentu DNA sprawdzono trawieniem restrykcyjnym fragmentu otrzymanego w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów P53/P54 z użyciem enzymu *Ascl* (Rys. 17; Załącznik 2; Załącznik 3).



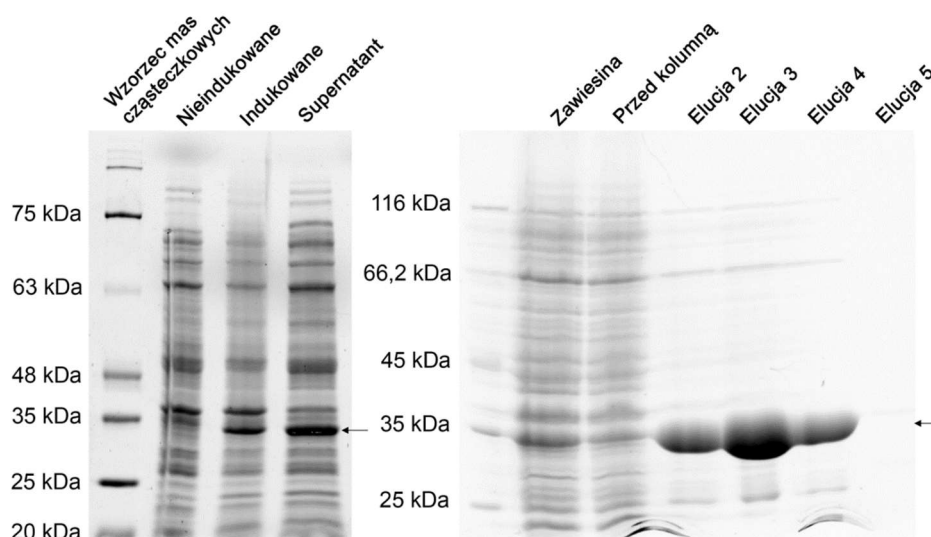
Rys. 17. Analiza trawienia *Ascl* genu HP1021NDC zamplifikowanego z użyciem starterów P53 i P54 na matrycy pET28a(+)*Nstrep*HP1021NDC. Do trawienia wykorzystano enzym *Ascl* ze względu na wprowadzenie miejsca trawienia dla tego enzymu podczas wprowadzania mutacji w kodonach kodujących reszty cysteinowe C52 i C56. M, wzorzec mas cząsteczkowych λ /PstI [pz]; 1,2, fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR na matrycy dwóch niezależnych klonów zawierających plazmid pET28a(+)*HP1021NDC* trawione enzymem *Ascl*; 3, nietrawiony fragment DNA uzyskany na matrycy pET28a(+)*Nstrep*HP1021. Strzałkami z prawej strony oznaczono spodziewane wielkości produktów trawienia. Prążek DNA widoczny powyżej 851 pz jest niedotrawionym substratem reakcji trawienia.

W wyniku trawienia enzymem *Ascl* otrzymano produkty o długości około 805 pz i 339 pz (oczekiwane produkty trawienia mają długość odpowiednio: 851 pz oraz 298 pz) co świadczy o tym, że w wektor wklonowany został gen o zmienionej sekwencji w stosunku do sekwencji genu dzikiego (Rys. 17). Na wysokości około 1150 pz widoczny jest prążek DNA

świadczący o obecności niedotrąconego fragmentu PCR. Następnie wklonowany gen poddano reakcji sekwencjonowania w celu weryfikacji poprawności sekwencji nukleotydowej zmutowanego genu. Po sprawdzeniu wyników reakcji sekwencjonowania, potwierdzających poprawność wklonowanej sekwencji, plazmidem pET28a(+)NstrepHP1021NDC stransformowano komórki *E. coli* BL21 (Rozdział 3.7.12.1) z których następnie izolowano rekombinowane białko HP1021NDC.

4.6.1.2 Izolacja białka HP1021NDC

Białko HP1021NDC oczyszczano na złożu Strep-tactin Superflow high capacity (IBA) z 1000 ml indukowanej IPTG (0,05 mM, 3 godziny indukcji) hodowli komórek *E. coli* BL21 zawierających plazmid pET28a(+)NstrepHP1021NDC (Rozdział 3.10). Otrzymane frakcje analizowano elektroforetycznie (Rys. 18).



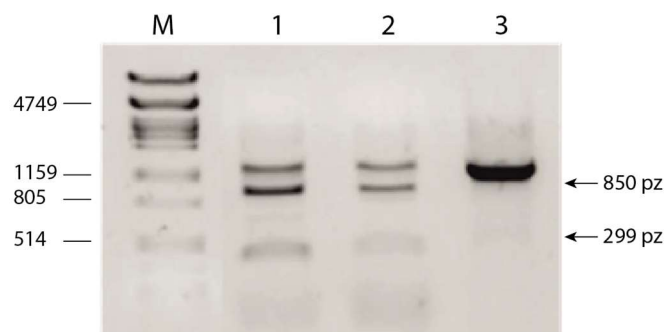
Rys. 18. Analiza izolacji białka HP1021NDC. Białko o masie około 36 kDa izolowano z komórek *E. coli* BL21 pET28NstrepHP1021NDC. Analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu SDS-PAGE zawierającym TCE, żel wizualizowano z wykorzystaniem metody StainFree oraz urządzenia GelDoc (Rozdział 3.9.2). Wzorzec mas cząsteczkowych – Pierce Unstained protein MW Marker nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją IPTG; Indukowane – lizat komórek po indukcji IPTG; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Zawiesina – komórki po dezintegracji z użyciem sonikatora; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożo; Elucja 2-5 - frakcje eluowane z kolumny buforem z destiobiotyną; strzałką zaznaczono rekombinowane białko HP1021NDC.

Uzyskano około 4 mg białka HP1021NDC o stopniu czystości wynoszącym około 95%. Stężenie białka w otrzymanych 250 μ l frakcjach wahało się od 0,2 mg/ml (frakcja 6) do 3 mg/ml (frakcja 3). W badaniach stosowano preparaty o stężeniu 0,5-3 mg/ml.

4.6.2 Oczyszczanie rekombinowanego białka HP1021CDC

4.6.2.1 Konstrukcja wektora pET28a(+)*Nstrep*HP1021CDC

Praca miała na celu przygotowanie konstruktów zawierających gen kodujący białko HP1021 w którym reszty cysteinowe w pozycjach C216, C238 oraz C270 zastąpiono resztami alanin. W reakcji PCR powielono fragmenty genu na matrycy plazmidu pET28a(+)*Nstrep*HP1021 z wykorzystaniem par starterów P5/P11, P10/P13, P12/P15 oraz P14/P16. Następnie otrzymane produkty PCR połączono w reakcji OE-PCR (Rozdział 3.7.12.) z wykorzystaniem pary starterów P5 oraz P16. Otrzymany produkt reakcji PCR trawiono enzymami restrykcyjnymi BamHI oraz XhoI, a następnie wklonowano w wektor pET28a(+)*Nstrep* trawiony tymi samymi enzymami. Mieszaninę ligacyjną transformowano komórki *E. coli* DH5 α (Rozdział 3.7.12.1). Następnie komórki z wybranych kolonii transformantów hodowano w pożywce płynnej i wyizolowano plazmid w skali miniprep (Rozdział 3.7.1) Poprawność wklonowania genu sprawdzono trawieniem restrykcyjnym fragmentu PCR otrzymanego na matrycy wyizolowanego plazmidu z użyciem starterów P53/P54 z wykorzystaniem enzymu NaeI (Załącznik 4; Załącznik 3; Rys. 19), a następnie wklonowany gen poddano reakcji sekwencjonowania.



Rys. 19. Analiza trawienia NaeI genu HP1021CDC zamplifikowanego z użyciem starterów P53 i P54 na matrycy pET28a(+)*Nstrep*HP1021CDC. Do trawienia wykorzystano enzym NaeI ze względu na wprowadzenie miejsca trawienia dla tego enzymu podczas wprowadzania mutacji w kodonie kodującym resztę cysteinową C238. M: wzorzec mas cząsteczkowych λ /PstI [pz]; 1,2: fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR na matrycy dwóch niezależnych klonów zawierających plazmid pET28a(+)*HP1021CDC* trawione enzymem NaeI ; 3: Nietrawiony fragment DNA uzyskany na matrycy pET28a(+)*Nstrep*HP1021. Strzałkami z prawej strony oznaczono spodziewane wielkości produktów trawienia. Prążek DNA widoczny powyżej 850 pz jest niedotrawionym substratem reakcji trawienia.

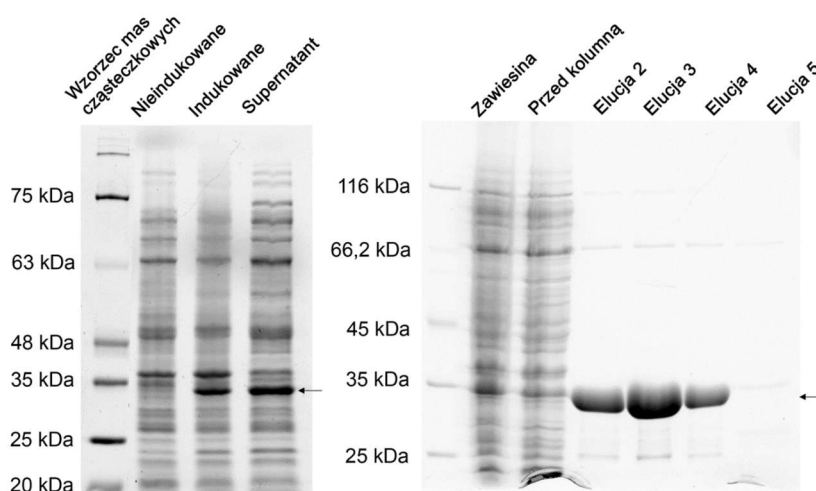
W wyniku trawienia enzymem NaeI otrzymano fragmenty o długości 850 pz i 299 pz co odpowiada długości oczekiwanych fragmentów. Na wysokości około 1150 pz widoczny jest prążek świadczący o obecności niedotrawionego fragmentu PCR. Po weryfikacji wyników

klonowania, otrzymanym plazmidem pET28a(+)NstrepHP1021CDC stransformowano komórki *E. coli* BL21 z których następnie izolowano rekombinowane białko HP1021CDC.

4.6.2.2 Izolacja białka HP1021CDC

Białko HP1021CDC oczyszczano na złożu Strep-tactin Superflow high capacity (IBA) z 1000 ml indukowanej IPTG (0,05 mM, 3 godziny indukcji) hodowli komórek *E. coli* BL21 zawierających plazmid pET28a(+)NstrepHP1021CDC (Rozdział 3.10.). Otrzymane frakcje analizowano elektroforetycznie (Rys. 20).

Uzyskano około 4 mg białka HP1021CDC o stopniu czystości wynoszącym około 95%. Stężenie białka w otrzymanych 250 µl frakcjach wahało się od 0,2 mg/ml (frakcja 6) do 3 mg/ml (frakcja 3). W badaniach stosowano preparaty o stężeniu 0,5-3 mg/ml.



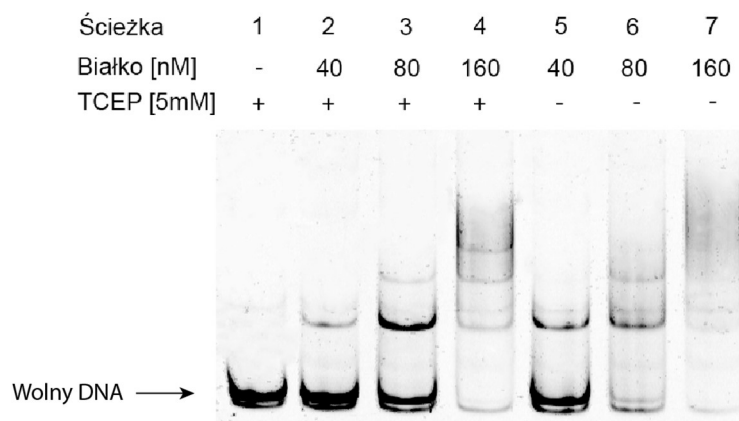
Rys. 20. Analiza izolacji białka HP1021CDC. Białko o masie około 36 kDa izolowano z komórek *E. coli* BL21 pET28NstrepHP1021CDC. Analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu SDS-PAGE zawierającym TCE, żel wizualizowano z wykorzystaniem metody StainFree oraz urządzenia GelDoc (Rozdział 3.9.2). Wzorzec mas cząsteczkowych – Pierce Unstained protein MW Marker nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją IPTG; Indukowane – lizat komórek po indukcji IPTG; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Zawiesina – komórki po dezintegracji z użyciem sonikatora; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożo; Elucja 2-5 - frakcje eluowane z kolumny buforem z destiobiotyną; strzałką zaznaczono rekombinowane białko HP1021CDC.

4.7 Oddziaływanie białka HP1021NDC i HP1021CDC z DNA

4.7.1 Badanie oddziaływania białek HP1021NDC i HP1021CDC z DNA metodą EMSA

4.7.1.1 Opóźniona migracja kompleksów HP1021NDC-*oriC2* w żelu

Badania miały na celu określenie wpływu warunków redukujących i utleniających na zdolność wiązania DNA przez białko HP1021NDC. Białko HP1021NDC inkubowano z regionem *oriC2* (Rozdział 3.11.1). Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rys. 21).



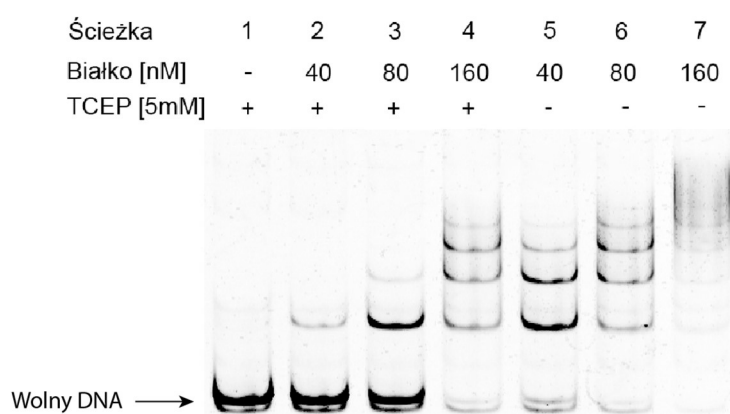
Rys. 21. Opóźniona migracja regionu *FAM-oriC2* związanego z białkiem HP1021NDC w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.

Białko HP1021NDC oddziaływało z *oriC2* zarówno w warunkach redukujących jak i nieredukujących (Rys. 21). Nieredukowane HP1021NDC z wyższym powinowactwem wiązało DNA niż białko zredukowane, na co wskazuje szybsze ubywanie wolnego DNA wraz ze wzrostem stężenia nieredukowanego HP1021NDC w stosunku do ubywania wolnego DNA w przypadku zredukowanego białka. Zaobserwowana różnica świadczy o wpływie warunków redoks na powinowactwo HP1021NDC do DNA zależne od reszt cysteinowych w C-końcowej domenie HP1021, przy czym utlenienie C-końcowej domeny zwiększa powinowactwo HP1021NDC do *oriC2*. Obserwowana zależność powinowactwa HP1021NDC do DNA od warunków redoks jest jednak odwrotna niż białka dzikiego HP1021, dla którego powinowactwo oddziaływania z DNA rosło na skutek redukcji HP1021 (Rys. 13). Odwrócenie tendencji może być spowodowane zamianą reszt cysteinowych na reszty alanin w potencjalnie regulatorowej N-domenie białka, prowadzące w konsekwencji do zaburzenia regulacji aktywności białka zależnej od domeny C-końcowej. Białko HP1021NDC, niezależnie od stanu redoks, wykazywało niższe powinowactwo do regionu *oriC2* niż zredukowane białko dzikie

HP1021 (np. porównanie oddziaływania białka w stężeniu 40 nM, ścieżka 2, Rys. 13 i Rys. 21). Prawdopodobnie może to wynikać z zaburzenia regulacji aktywności białka i jego zależnego od redoks powinowactwa do DNA na skutek mutacji reszt cysteinowych w potencjalnej regulatorowej domenie N-końcowej białka wpływających na aktywność samej domeny N-końcowej lub również, pośrednio, na aktywność domeny C-końcowej.

4.7.1.2 Opóźniona migracja kompleksów HP1021CDC-*oriC2* w żelu

Celem analizy było zbadanie wpływu warunków redukujących i utleniających na zdolność wiązania DNA przez białko HP1021CDC. Białko HP1021CDC inkubowano z regionem *oriC2* (Rozdział 3.11.1). Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rys. 22).



Rys. 22. Opóźniona migracja regionu *FAM-oriC2* związanego z białkiem HP1021CDC w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.

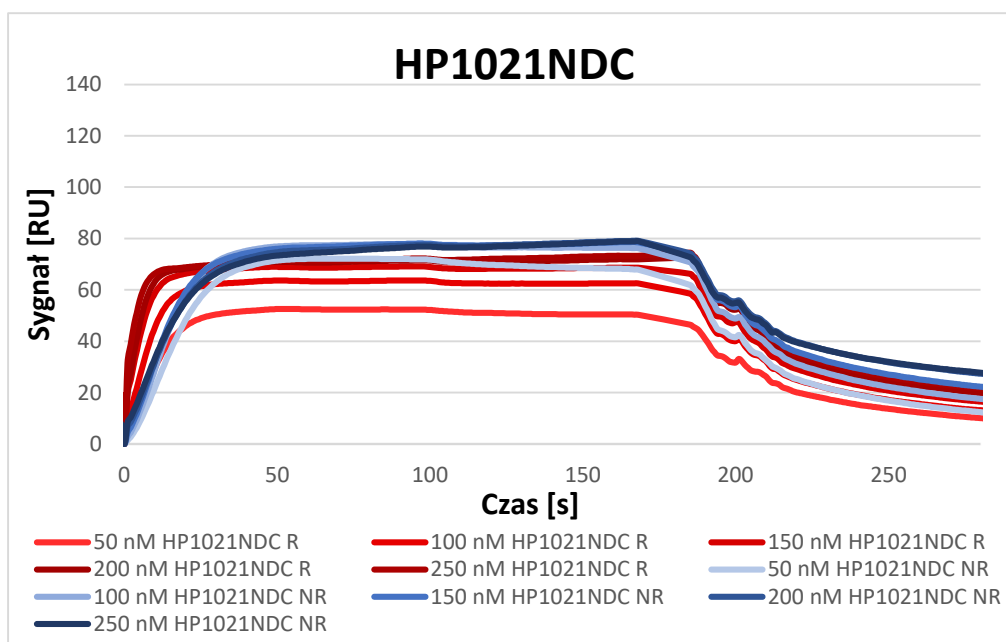
Zredukowane i niezredukowane białko HP1021CDC oddziaływało z DNA (Rys. 22). Zredukowane białko HP1021CDC wiązało DNA z niższym powinowactwem niż białko niezredukowane. Świadczy o tym zanikanie wolnego DNA przy wyższym stężeniu zredukowanego HP1021CDC niż w przypadku niezredukowanego białka (odpowiednio 160 nM i 40 nM). Wyniki wskazują na wpływ warunków redoks na aktywność domeny N-końcowej: utlenienie reszt cystein w domenie N-końcowej o prawdopodobnym znaczeniu regulatorowym zwiększa powinowactwo HP1021CDC do wiązania DNA. Obserwowana zależność powinowactwa HP1021CDC do *oriC2* od warunków redoks jest jednak odwrotna niż ta wykazana dla dzikiego białka HP1021, dla którego powinowactwo oddziaływania z DNA rosło na skutek redukcji HP1021. Odwrócenie tendencji może być spowodowane zamianą

reszt cysteinowych na reszty alanin w C-końcowej domenie białka wiążącej DNA, prowadzące w konsekwencji do zaburzenia regulacji aktywności białka zależnej od domeny N-końcowej.

4.7.2 Badanie oddziaływania białek HP1021NDC i HP1021CDC metodą SPR

4.7.2.1 Analiza oddziaływania białka HP1021NDC z *oriC2*

Analizie poddano oddziaływanie białka HP1021NDC z *oriC2* w warunkach redukujących (5mM TCEP) i nieredukujących metodą SPR (Rozdział 3.11.2). Zarówno białko zredukowane jak i niezredukowane oddziaływało z DNA (Rys. 23), a stabilność tworzonych kompleksów była porównywalna. W warunkach nieredukujących, białko HP1021NDC oddziaływało z DNA osiągając takie same wartości RU (ok. 70-80 RU) w całym zakresie stężeń białka (50-250 nM), co świadczy o wysyceniu oddziaływania w warunkach analizy. W warunkach redukujących białko HP1021NDC w niższych stężeniach oddziaływało z DNA z niższą wydajnością niż białko niezredukowane (50-55 RU), natomiast w wyższych stężeniach zredukowane HP1021NDC oddziaływało z DNA podobnie jak białko niezredukowane (ok. 70 RU). Tym samym nie zaobserwowano stymulującego wpływu reduktora na aktywność wiązania DNA przez białko, lub wręcz zaobserwowano niewielki wpływ hamujący, co może świadczyć o zaangażowaniu reszt cysteinowych w domenie C-końcowej w regulację aktywności badanego białka. Odwrócenie zależności aktywności białka HP1021NDC w stosunku do białka dzikiego HP1021 po wpływie warunków redoks (Rys. 15) może też wskazywać na zaburzenie mechanizmu regulacji HP1021NDC w stosunku do białka typu dzikiego, posiadającego reszty cystein w obu domenach, a tym samym świadczyć o wpływie reszt cysteinowych N-domeny na aktywność białka HP1021. Wyniki otrzymane w tej metodzie są zgodne z wynikami otrzymanymi metodą EMSA (Rozdział 4.7.1.1).

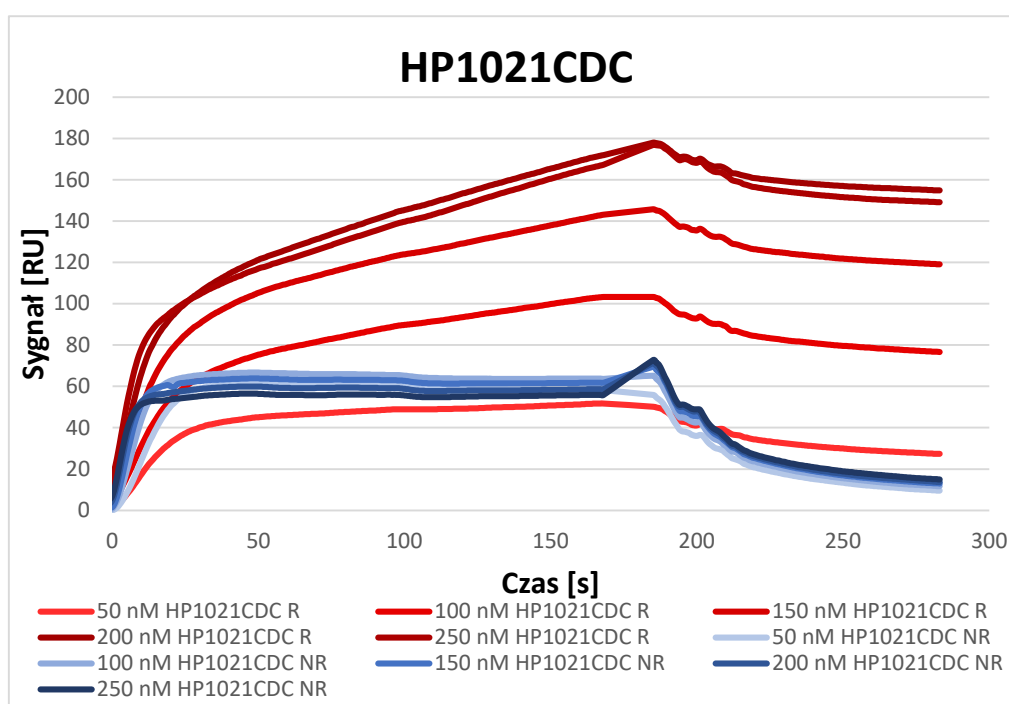


Rys. 23. Analiza wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021NDC metodą SPR. Kolorem czerwonym opisano wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko zredukowano 5 mM TCEP.

4.7.2.2 Analiza oddziaływania białka HP1021CDC z *oriC2*

Analizie poddano oddziaływanie białka HP1021CDC z *oriC2* w warunkach redukujących (5mM TCEP) i nieredukujących metodą SPR (Rozdział 3.11.2). HP1021CDC oddziaływało z DNA zarówno w warunkach redukujących jak i nieredukujących (Rys. 24). Wiązanie niezredukowanego HP1021CDC do DNA zostało wysyczone już przy najniższym stosowanym stężeniu (wiązaną białka na poziomie ok. 60 RU w zakresie stężeń 50-250 nM). Wiązanie HP1021CDC w warunkach redukujących w najniższym stosowanym stężeniu białka (50 nM) było podobne do wiązania HP1021CDC w warunkach nieredukujących (ok. 60 RU), natomiast wzrastało wraz ze wzrostem stężenia białka do wartości około 180 RU w przypadku najwyższego (250 nM) stężenia białka HP1021CDC. Świadczy to o tym, że aktywność białka HP1021CDC zależy od warunków redoks, przy czym białko w formie zredukowanej wydajniej oddziałuje z *oriC2* niż białko utlenione (z większym powinowactwem lub wiązanych jest więcej cząsteczek białka). Wyniki wskazują na to, że za regulację redoks odpowiada w tym białku domena N-końcowa. Na podstawie otrzymanych wartości RU wykazano, że zdolność wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021CDC zarówno w warunkach redukujących jak

nieredukujących jest podobna do białka dzikiego (Rys. 24 i Rys. 15). Ponadto, podobnie jak w białku dzikim, na podstawie krzywej dysocjacji można wnioskować, że utworzone w warunkach redukujących kompleksy nukleoproteinowe są stabilniejsze niż w przypadku warunków nieredukujących. Różnice w otrzymanych wynikach pomiędzy warunkami redukującymi oraz nieredukującymi świadczą o wpływie obecnych w N-końcowej części białka reszt cysteinowych na zmianę aktywności badanego białka i wpływ na stabilność kompleksów HP1021-oriC2. Otrzymany wynik odbiega od wyniku otrzymanego w teście EMSA (Rozdział 4.7.1.2, Rys. 22), jednak na obecnym etapie badań nie można podać przyczyny rozbieżności (więcej w rozdziale Dyskusja).



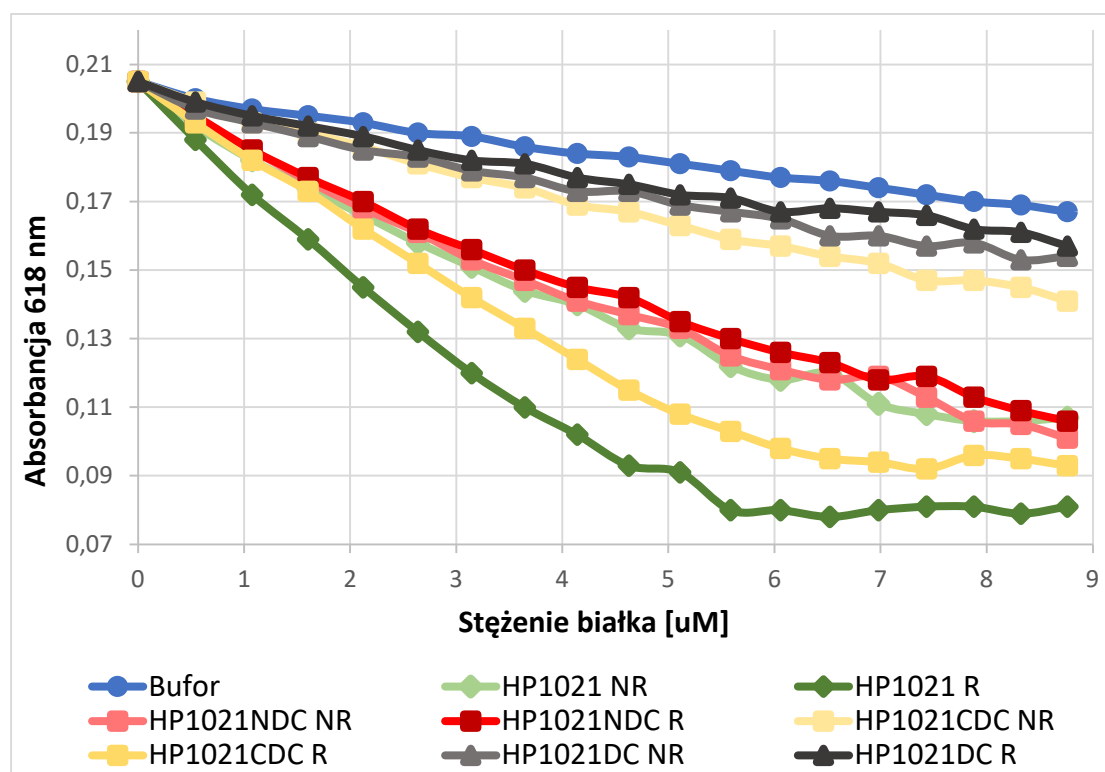
Rys. 24. Analiza wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021CDC metodą SPR. Kolorem czerwonym opisano wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko redukowano 5 mM TCEP.

4.8 Analiza wiązania jonów Zn²⁺ przez białko HP1021 oraz jego warianty

Zgodnie z danymi literaturowymi, znane są mechanizmy regulacji aktywności białek oparte o wiązanie jonów dwuwartościowych metali^{114,115}. Jony te wiązane są często przez reszty cysteinowe lub reszty cysteinowe i histydynowe (np. palec cynkowy)¹¹⁶. Białka posiadające motywy wiążące jony metali często zaangażowane są w regulację transkrypcji

genów. Ponieważ HP1021 posiada 6 reszt cysteinowych w swojej sekwencji, postanowiono zbadać zdolność HP1021 do wiązania jonów metali. Wybrano jony cynku jako jony mające najmniejszy wpływ na utlenianie białek, a często wpływające na regulację aktywności białek¹¹⁷. Jako metodę analizy oddziaływania HP1021-Zn²⁺ wybrano test konkurencyjny o jony cynku między białkiem odczynnikiem Zincon¹¹⁸. Odczynnik Zincon (Merck, 96440) tworzy z dwuwartościowymi jonami cynku niebieskie kompleksy, których maksimum absorpcji przypada dla fali o długości 618 nm. Dodanie białka wiążącego cynk do takiego kompleksu powoduje wiązanie cynku przez białko, co skutkuje rozpadem kompleksu Zincon-Zn²⁺ i zmianą absorpcji światła (Rozdział 3.12.).

W wyniku analizy wykazano wiązanie jonów cynku przez dziki wariant białka HP1021 (Rys. 25), przy czym w danym stężeniu stabilność wiązania jonów lub liczba związanych jonów cynku była większa w przypadku zredukowanego białka HP1021 w porównaniu do białka niezredukowanego.



Rys. 25. Wiązanie jonów cynku przez białko HP1021 oraz jego warianty. Pomiar wykonywano spektrofotometrycznie przy długości fali 618 nm stosując test konkurencyjny z odczynnikiem Zincon.

Wariant białka HP1021NDC również wiązał jony cynku, natomiast oddziaływanie to było niezależne od redukcji lub utlenienia białka, podobne do oddziaływania HP1021 z jonami Zn²⁺ w warunkach nieredukujących. Białko HP1021CDC w niewielkim stopniu wiązało jony cynku

w warunkach nieredukujących, natomiast redukcja białka powodowała wzrost powinowactwa do jonów Zn^{2+} . Białko HP1021DC, w którym wszystkie reszty cysteinowe zostały wymienione na reszty alanin, wykazywało niskie powinowactwo do jonów cynku niezależnie od warunków redoks. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że reszty cystein obecne w białku HP1021 są zaangażowane w oddziaływanie z jonami Zn^{2+} . Prawdopodobnie każda z domen oddziałuje z jonami cynku. Oddziaływanie domeny N-końcowej z Zn^{2+} jest zależne od stopnia zredukowania reszt cysteinowych obecnych w domenie N-końcowej (zredukowana forma białka HP1021CDC wiąże Zn^{2+} z wyższym powinowactwem), natomiast oddziaływanie C-domeny z jonami Zn^{2+} nie jest zależne od stopnia redukcji reszt cysteinowych tej domeny (Rys. 25).

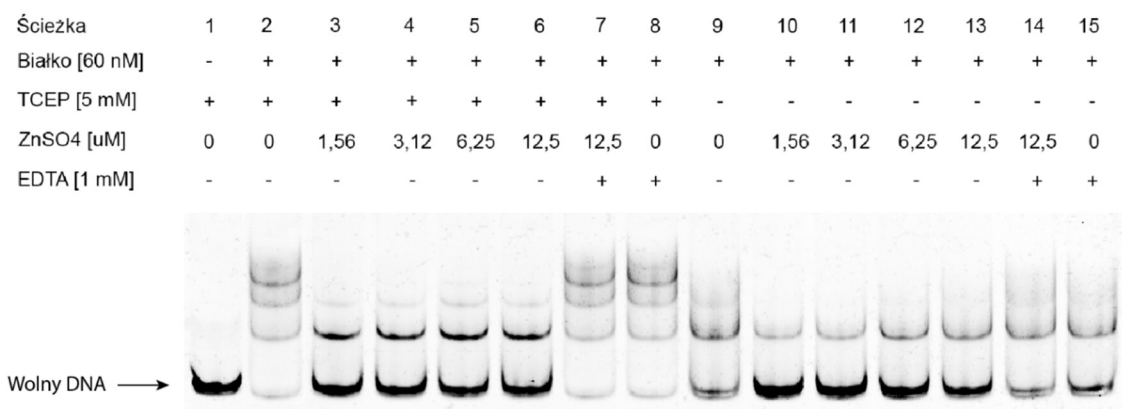
4.9 Analiza wiązania regionu *oriC2* przez HP1021 i jego muteiny w obecności jonów Zn^{2+}

Jak wykazały badania, HP1021 poza zdolnością do wiązania DNA (Rozdział 4.5, 4.7, ⁴⁰) wykazuje również zdolność do wiązania jonów cynku (Rozdział 4.9). Dlatego postanowiono zbadać jak wiązanie jonów Zn^{2+} wpływa na zdolność HP1021 do wiązania DNA. W badaniach wykorzystano wariant dziki białka HP1021 oraz jego muteiny HP1021DC, HP1021NDC i HP1021CDC. Wykorzystano ponownie techniki EMSA i SPR.

4.9.1 Badanie oddziaływania HP1021 i jego mutein z DNA w obecności jonów Zn^{2+} metodą EMSA

4.9.1.1 Oddziaływanie białka HP1021 z *oriC2*

Analizę prowadzono w celu określenia wpływu jonów cynku na wiązanie DNA przez białko HP1021. HP1021 w stężeniu 60 nM preinkubowano 5 minut na lodzie z jonami cynku o wzrastającym stężeniu w obecności lub bez reduktora TCEP [5mM], a następnie z fragmentem FAM-*oriC2* w temperaturze 37°C przez 30 minut. Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rozdział 3.11.1.)



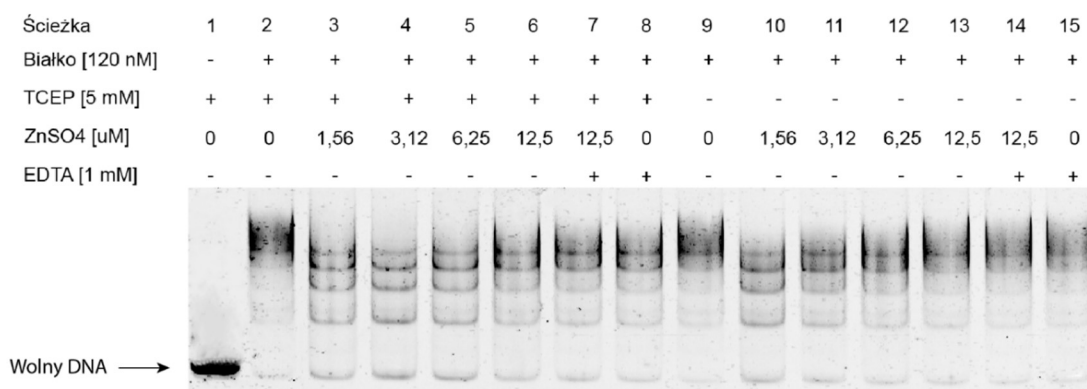
Rys. 26. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021 w obecności jonów cynku. Kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym.

Białko HP1021 w warunkach zredukowanych i utlenionych oddziałuje z DNA w sposób podobny jak opisano w rozdziale 4.5.1.1. Obecność jonów cynku powoduje zahamowanie wiązania *oriC2* przez utlenione i zredukowane białko HP1021, obserwane jako mniejsza liczba kompleksów białko-DNA oraz obecność większej ilości wolnego DNA w stosunku do oddziaływań bez obecności jonów. Przywrócenie białku aktywności wiązania DNA po dodaniu EDTA w próbkach kontrolnych świadczy o specyficznym działaniu dodanych jonów cynku, które w warunkach schelatowania przez EDTA przestają hamować oddziaływanie HP1021 z DNA. Można wnioskować, że wpływ jonów Zn²⁺ na białko zredukowane jest większy niż na białko niezredukowane ze względu na silniejsze wiązanie DNA przez białko zredukowane w porównaniu z białkiem nieredukowanym. Otrzymane wyniki są spójne z analizami wiązania jonów cynku przez białko HP1021, które oddziaływało z jonami cynku zarówno w formie utlenionej jak i zredukowanej (Rys. 25), i wskazują na hamujący wpływ obecności jonów cynku na wiązanie DNA przez białko HP1021 zarówno w warunkach redukujących jak i nieredukujących.

4.9.1.2 Oddziaływanie białka HP1021DC z *oriC2*

Analizę prowadzono w celu określenia wpływu jonów cynku na wiązanie DNA przez białko HP1021DC. Badane białko w stężeniu 120 nM preinkubowano na lodzie przez 5 minut z jonami cynku o wzrastającym stężeniu oraz z dodatkiem reduktora TCEP [5 mM] lub bez reduktora, a następnie przez 30 minut z fragmentem FAM-*oriC2* w temperaturze 37°C. Zastosowano wyższe stężenie HP1021DC niż HP1021 (Rozdział 4.10.1.1) ponieważ HP1021DC

wykazuje niższe powinowactwo do DNA niż HP1021. Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rozdział 3.11.1) (Rys. 27).

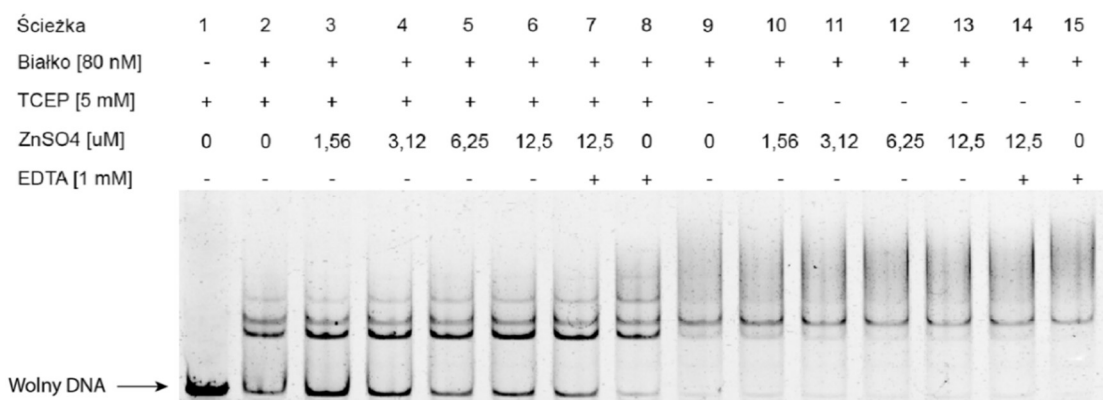


Rys. 27. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021DC w obecności jonów cynku. Kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym.

Białko HP1021DC oddziałuje z DNA podobnie jak opisano w rozdziale 4.5.1.2, wykazując podobne powinowactwo do DNA zarówno w warunkach redukujących jak i nieredukujących. Obecność jonów cynku powodowała nieznaczne zmniejszenie powinowactwa zredukowanego i niezredukowanego HP1021DC do DNA, obserwowane jako obecność większej ilości wolnego DNA oraz powstawanie 4-5 rodzajów kompleksów białko-DNA w miejscu wysokocząsteczkowych kompleksów tworzonych przy nieobecności Zn²⁺. Zaobserwowane zależności mogą być wynikiem subtelnych zmian środowiska reakcji spowodowanym obecnością ZnSO₄ albo oddziaływania Zn²⁺ z innymi resztami aminokwasowymi (np. histydynowymi, serynowymi¹¹⁹). Wyniki są spójne z analizami wiązania jonów cynku, w których HP1021DC w niewielkim stopniu wiązało jony cynku, niezależnie od warunków redoks środowiska (Rys. 25).

4.9.1.3 Oddziaływanie białka HP1021NDC z *oriC2*

Analiza miała na celu zbadanie wpływu obecności jonów cynku na wiązanie DNA przez białko HP1021NDC. HP1021NDC w stężeniu 80 nM preinkubowano na lodzie z jonami cynku o wzrastającym stężeniu w obecności [5 mM] lub bez reduktora TCEP, a następnie z fragmentem FAM-*oriC2* w temperaturze 37°C. Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rozdział 3.11.1) (Rys. 28).

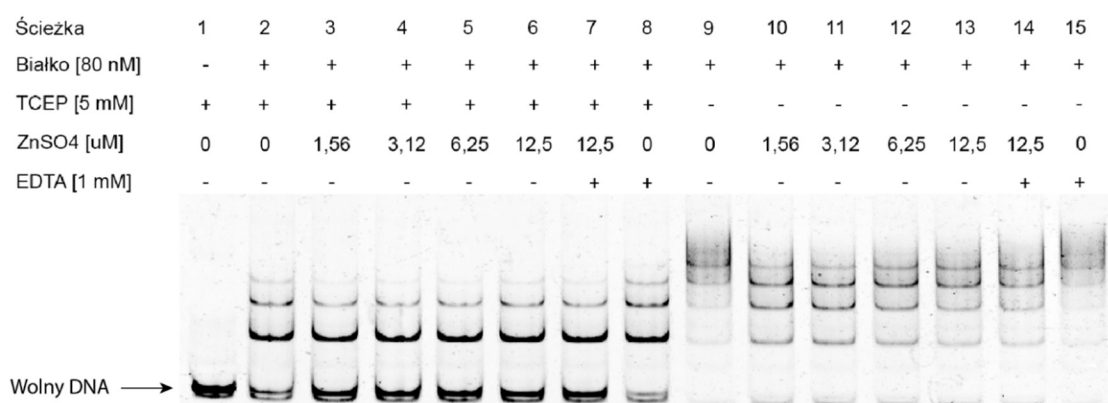


Rys. 28. Opóźniona migracja regionu FAM-*oriC2* związanego z białkiem HP1021NDC w obecności jonów cynku w 4% żelu poliakrylamidowym.

Białko HP1021NDC oddziaływało z *oriC2* podobnie jak pokazano w rozdziale 4.7.1.1. Nie zaobserwowano zależnych od obecności jonów cynku różnic w oddziaływaniu zredukowanego jak i niezredukowanego białka HP1021NDC z DNA. W żadnej z badanych próbek nie odnotowano zmniejszenia liczby powstających kompleksów białko-DNA ani przyrostu wolnego DNA. Otrzymane wyniki świadczą o braku wpływu jonów cynku na zdolność wiązania DNA przez białko HP1021NDC zarówno w przypadku zastosowania reduktora TCEP jak i bez reduktora.

4.9.1.4 Oddziaływanie białka HP1021CDC z *oriC2*

Badanie przeprowadzono w celu określenia wpływu obecności jonów cynku na zdolność wiązania DNA przez białko HP1021CDC. Badane białko HP1021CDC w stężeniu 80 nM preinkubowano na lodzie z wzrastającym stężeniem jonów cynku oraz z dodatkiem reduktora TCEP [5 mM] lub bez reduktora, a następnie z fragmentem FAM-*oriC2* w temperaturze 37°C. Powstałe kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym (Rozdział 3.11.1) (Rys. 29).



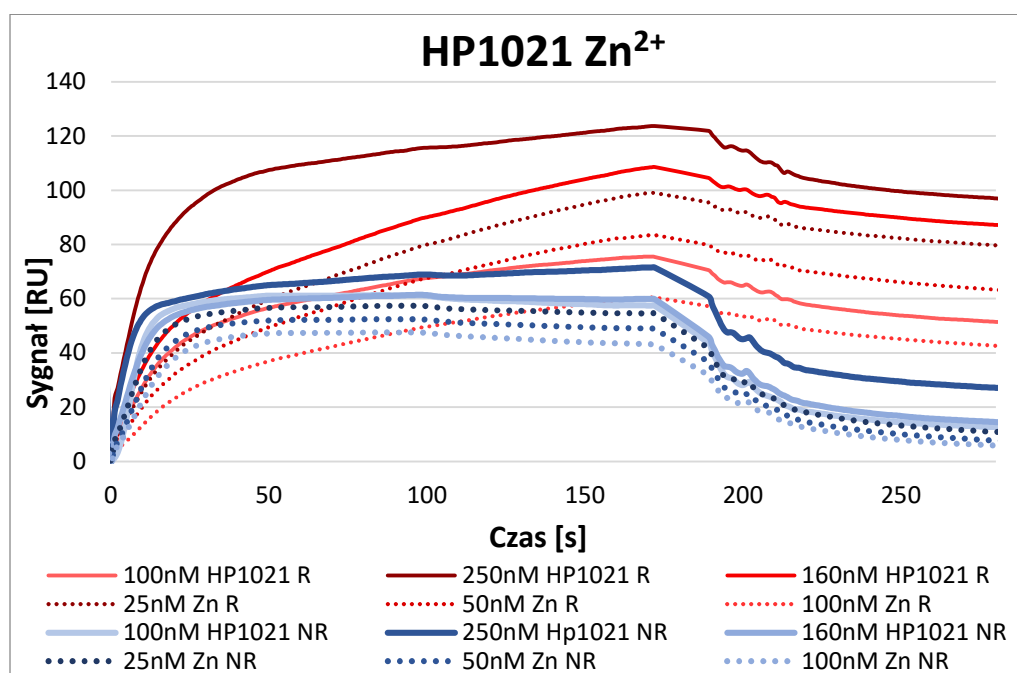
Rys. 29. Opóźniona migracja regionu FAM-*oriC2* związanego z białkiem HP1021CDC w obecności jonów cynku w 4% żelu poliakrylamidowym.

Powinowactwo zredukowanego i niezredukowanego białka HP1021CDC do DNA wykazano na podobnym poziomie jak w rozdziale 4.7.1.2. Obecność jonów cynku zarówno w warunkach redukujących jak i nieredukujących powodowała nieznaczne osłabienie powinowactwa białka HP1021 do DNA lub nie wpływała na to powinowactwo. Otrzymany wynik świadczy o słabym bezpośrednim wpływie jonów cynku na aktywność białka HP1021CDC w stosunku do wiązania DNA lub wpływie pośrednim ZnSO₄ na aktywność białka przez zmianę warunków środowiska reakcji.

4.9.2 Badanie oddziaływania HP1021 i jego mutein z DNA w obecności jonów Zn^{2+} metodą SPR

4.9.2.1 Analiza oddziaływania białka HP1021 z *oriC2* w obecności jonów Zn^{2+}

Analizę oddziaływania HP1021 z *oriC2* prowadzono jak opisano w rozdziale 3.11.2.2 z wykorzystaniem stałego stężenia białka równego 160 nM oraz wzrastającego stężenia Zn^{2+} . Dodatkowo zastosowano kontrolę wiązania HP1021 w postaci zredukowanego i nieredukowanego białka w trzech stężeniach (100, 160 i 250 nM) bez dodatku jonów cynku (Rys. 30).



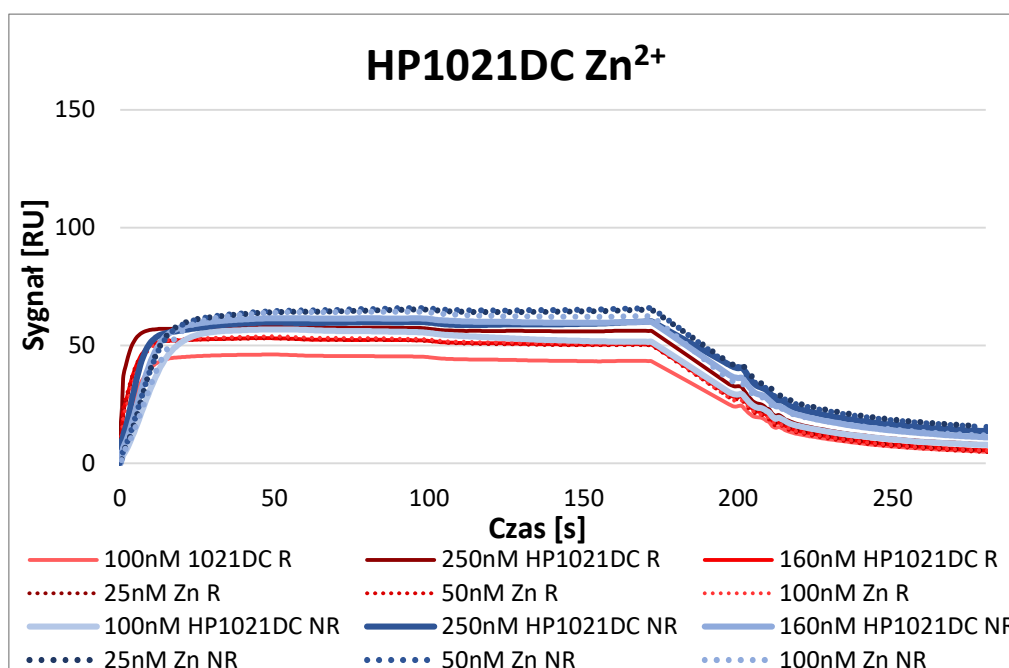
Rys. 30. Analiza SPR wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021 w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Liniją przerywaną oznaczono wiązanie HP1021 z DNA w obecności Zn^{2+} . Białko zredukowano 5 mM TCEP.

Zredukowane i nieredukowane HP1021 oddziaływało z *oriC2* podobnie jak zaprezentowano w rozdziale 4.5.2.1. W obecności jonów Zn^{2+} wiązanie zredukowanego HP1021 z *oriC2* było znacząco osłabione (do 91%, 77% i 55% wiązania HP1021 w obecności odpowiednio 25, 50 i 100 nM Zn^{2+}). Oddziaływanie niezredukowanego HP1021 w obecności Zn^{2+} było również słabsze, jednak ze względu na niższe powinowactwo niezredukowanego HP1021 do DNA, efekt osłabienia oddziaływania był w tym wypadku mniejszy niż dla białka zredukowanego (do 90%, 82% i 71% wiązania HP1021 w obecności odpowiednio 25, 50 i 100 nM Zn^{2+}). Wyniki analizy SPR i EMSA (Rozdział 4.9.1.1.) zgodnie wskazały na hamujący wpływ

jonów Zn^{2+} na oddziaływanie HP021 z DNA oraz wpływ warunków redoks na regulację aktywności HP1021 przez jony Zn^{2+} .

4.9.2.2 Oddziaływanie białka HP1021DC z *oriC2* w obecności Zn^{2+}

Analizę oddziaływania HP1021DC z *oriC2* przeprowadzono w podobnych warunkach jak w przypadku białka dzikiego HP1021 (Rozdział 4.10.2.1), zachowując takie same analizy kontrolne (Rys. 31).



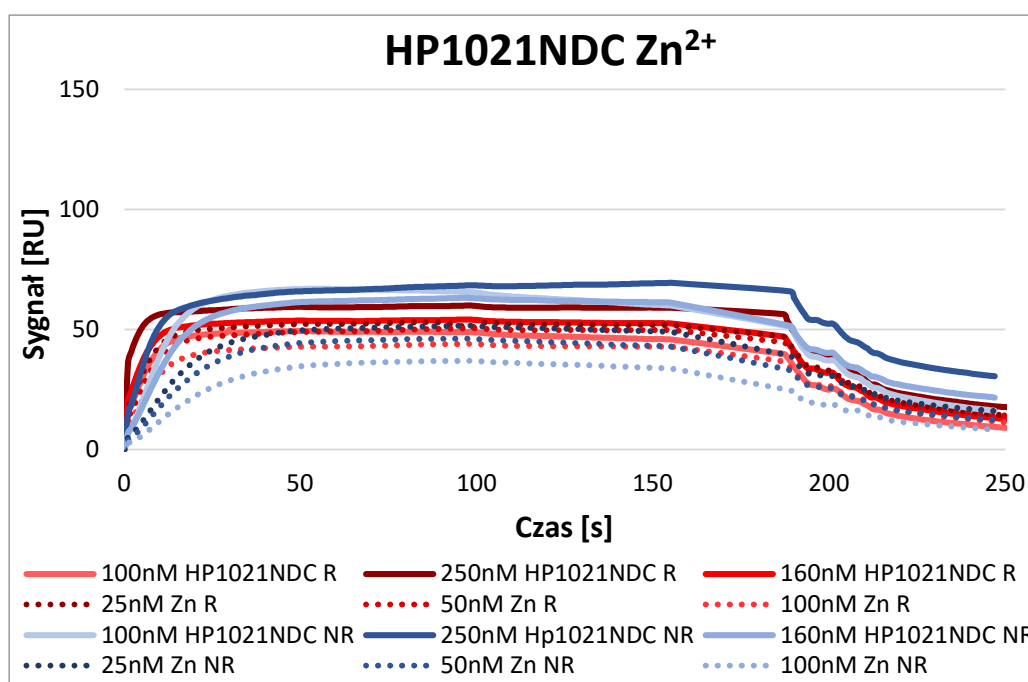
Rys. 31. Analiza SPR wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021DC w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linią przerywaną oznaczono dodatek jonów cynku. Białko zredukowano 5 mM TCEP.

Redukowane i nieredukowane HP1021DC oddziaływało z DNA podobnie jak opisano w rozdziale 4.5.2.2. HP1021DC, zarówno zredukowane jak i niezredukowane, w obecności Zn^{2+} oddziaływało z DNA podobnie jak HP1021DC w buforze bez jonów metalu. Otrzymane wyniki świadczą o braku wpływu jonów cynku na powinowactwo HP1021DC do *oriC2* niezależnie od zastosowanych warunków redoks. Otrzymane wyniki są spójne z wynikami testu EMSA, w którym efekt wpływu jonów na białko HP1021DC jest niewielki zarówno w przypadku warunków redukujących jak i nieredukujących. Wyniki są również spójne

z wynikami analizy wiązania Zn^{2+} przez HP1021DC (Rozdział 4.9.1.2.), w której wykazano brak lub słabe oddziaływanie HP1021DC z Zn^{2+} , niezależne od stanu redoks białka.

4.9.2.3 Oddziaływanie białka HP1021NDC z *oriC2* w obecności jonów Zn^{2+}

Analizę oddziaływania HP1021NDC przeprowadzono w analogicznych warunkach jak w przypadku białka dzikiego HP1021 (Rozdział 4.10.2.1) zachowując takie same próby kontrolne (Rys. 32).

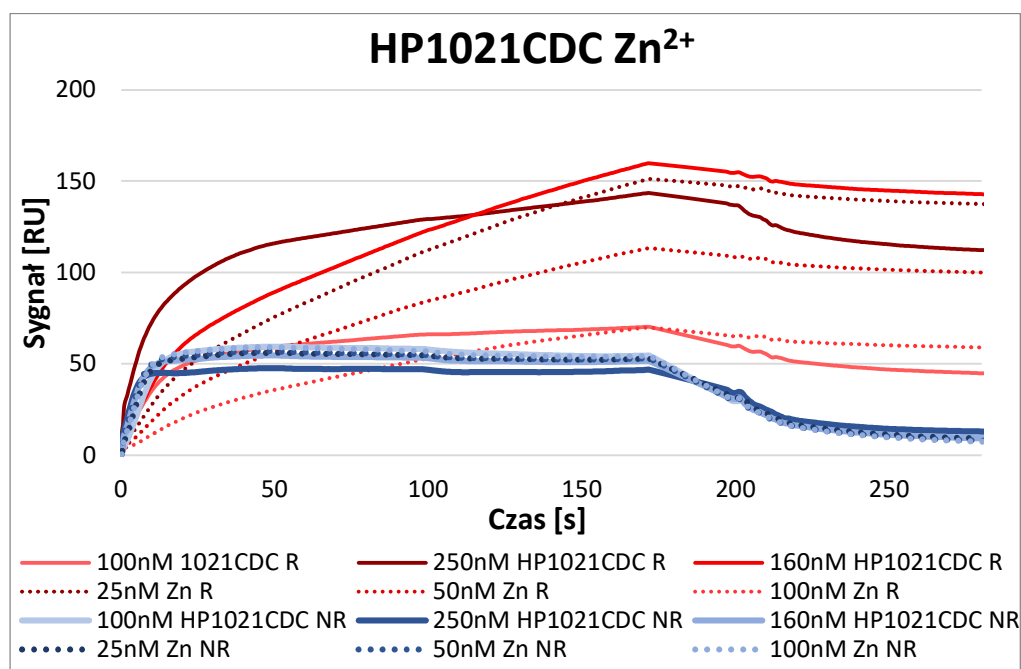


Rys. 32. Analiza SPR wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021NDC w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linią przerywaną oznaczono dodatek jonów cynku. Białko zredukowano 5 mM TCEP.

Białko HP1021NDC wiązało DNA podobnie jak przedstawiono w rozdziale 4.7.2.1. W przypadku białka HP1021NDC, podobnie jak w analizie EMSA (Rozdział 4.9.1.3.), zauważono niewielki wpływ lub brak wpływu jonów na aktywność białka w porównaniu z wpływem Zn^{2+} na białko HP1021.

4.9.2.4 Oddziaływanie białka HP1021CDC z *oriC2* w obecności jonów Zn^{2+}

Analizę oddziaływania HP1021CDC z *oriC2* przeprowadzono w podobnych warunkach jak w przypadku białka dzikiego HP1021 (Rozdział 4.10.2.1) zachowując takie same próby kontrolne (Rys. 33).



Rys. 33. Analiza SPR wiązania regionu *oriC2* przez białko HP1021CDC w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linią przerywaną oznaczono dodatek jonów cynku. Białko zredukowano 5 mM TCEP.

HP1021CDC oddziaływało z DNA podobnie jak przedstawiono w rozdziale 4.7.2.2. W obecności jonów Zn^{2+} wiązanie zredukowanego HP1021CDC do *oriC2* było znacząco osłabione (do 37% wiązania HP1021CDC bez jonów Zn^{2+}). W przypadku białka w warunkach nieredukujących nie zauważono wpływu jonów na aktywność HP1021CDC. Oddziaływanie jonów cynku zachodzi prawdopodobnie z resztami cystein w domenie N-końcowej, a wpływ ten jest zależny od warunków redoks. Otrzymany wynik odbiega od wyniku otrzymanego w teście EMSA (Rozdział 4.1.9.4, Rys. 29), jest jednak zgodny z wynikami analizy wiązania jonów Zn^{2+} (Rozdział 4.8). Na obecnym etapie badań nie można podać przyczyny rozbieżności (więcej w rozdziale Dyskusja).

Podsumowanie analiz oddziaływania HP1021 i jego mutein z DNA

Wyniki analiz oddziaływania HP1021 z *oriC2* wskazują na wpływ redukcji reszt cystein obecnych w białku dzikim na zdolność wiązania DNA – zredukowane białko z większym powinowactwem wiąże *oriC2* niż białko niezredukowane (Rys. 13 i Rys. 15). Z otrzymanych wyników wnioskować również można, że na oddziaływanie zależne od warunków redoks wpływ może mieć głównie domena N-końcowa białka, ponieważ w wiązanie muteiny posiadającej reszty cystein w N-końcowej domenie (HP1021CDC) było bardziej zależne od warunków redoks (Rys. 22 i Rys. 24) niż muteiny posiadającej reszty cystein w domenie C-końcowej (Rys. 21 i Rys. 23). Jony Zn^{2+} wpływały na oddziaływanie HP1021 z *oriC2* (Rys. 26 i Rys. 27), a oddziaływanie to było również zależne od obecności reszt cysteinowych (kompleksy HP1021DC-*oriC2* były stabilne w obecności Zn^{2+} , Rys. 27) i stanu redoks białka (Zn^{2+} destabilizowało wydajniej kompleksy tworzone przez zredukowane HP1021 niż przez białko niezredukowane, Rys. 26 i Rys. 30). Trudno jest natomiast postulować, która z domen HP1021 jest odpowiedzialna za regulację aktywności HP1021 zależną od jonów Zn^{2+} . Każda z domen wiąże jony Zn^{2+} (Rys. 25), ale ich wpływ na kompleksy tworzone przez muteiny z *oriC2* nie był jednoznaczny. Obserwowano nieznaczny wpływ lub wręcz brak wpływu Zn^{2+} na kompleksy HP1021NDC-*oriC2*, natomiast wpływ Zn^{2+} na kompleksy tworzone przez HP1021CDC był niejednoznaczny (wykazano wpływ na kompleksy zredukowanego i niezredukowanego HP1021CDC w analizie SPR, Rys. 33, natomiast nie wykazano wpływu w analizie EMSA, Rys. 29). Wyniki mogą wskazywać na złożoną zależność oddziaływania między domenami w celu przekazania sygnału redoks.

4.10 Przygotowanie zmutowanych szczepów *H. pylori* z upośledzonym szlakiem regulacji zależnym od białka HP1021

Charakterystyka białka HP1021 w warunkach *in vitro* wykazała, że białko to może być sensorem redoks i regulować transkrypcję genów w odpowiedzi komórek *H. pylori* na stres oksydacyjny. Dlatego w dalszych analizach wykorzystano lub przygotowano szczepy, w których upośledzono funkcję HP1021 przez:

1. delecję genu HP1021 (szczep N6 Δ HP1021, Tab. 3)

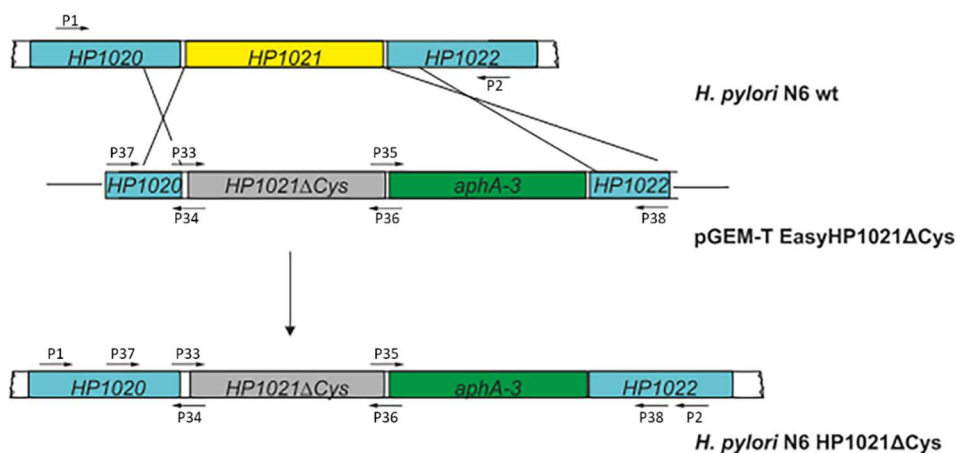
2. wprowadzenie mutacji w genie HP1021 skutkujących syntezą białka HP1021 w którym reszty cystein zamienione były na reszty alanin (N6 HP1021 Δ Cys) (Rozdział. 4.10, Tab. 3)

Przygotowano również szczep komplementacyjny HP1021 (Rozdział 4.11, Tab. 3).

Szczepy wykorzystano w analizach roli HP1021 w odpowiedzi *H. pylori* na stres oksydacyjny (Rozdział 4.11, 4.12, 4.13).

4.10.1 Przygotowanie zmutowanego szczepu N6 HP1021 Δ Cys

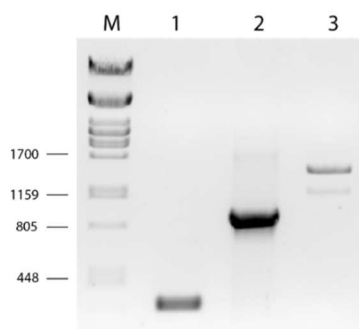
W celu zbadania wpływu reszt cysteinowych na aktywność białka HP1021 *in vivo* opracowano strategię przygotowania szczepu *H. pylori* N6 HP1021 Δ Cys, w którym syntezowane byłoby białko HP1021 z zamienionymi resztami cystein na reszty alanin (Tab. 3, Rys. 34). W tym celu przygotowano konstrukt DNA do wymiany dzikiego genu HP1021 na gen zmutowany na chromosomie *H. pylori* na drodze rekombinacji homologicznej na zasadzie podwójnego crossing-over (Rozdział 3.7.13.), a następnie przeprowadzono transformację komórek *H. pylori*, selekcję klonów zmutowanych szczepów oraz analizę wprowadzonych mutacji.



Rys. 34. Schemat wymiany dzikiego genu HP1021 na gen zmutowany, kodujący białko zawierające reszty alanin w miejscach reszt cystein.

4.10.2 Konstrukcja wektora pGEM1021Δcysaph-3

W celu otrzymania fragmentu genu *HP1021* posiadającego zmutowane kodony reszt cystein, na matrycy plazmidu pET28a(+)*NstrepHP1021DC* (Tab. 4) przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów P33/P36. Dodatkowo przygotowano fragmenty, będące ramionami homologii niezbędnymi do rekombinacji z chromosomem. W tym celu na matrycy genomowego DNA szczepu 26695 przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów P37/P34 oraz na matrycy plazmidu pTZ57R/ Δ HP1021 (Tab. 4) przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów P35/P38. Wszystkie otrzymane produkty rozdzielono w 1% żelu agarozowym (Rys. 35), wycięto i oczyszczono z żelu.

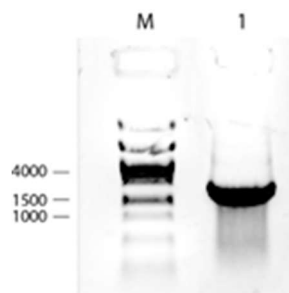


Rys. 35. Fragmenty powielone w reakcji PCR, które po oczyszczeniu wykorzystano do przeprowadzenia reakcji OE-PCR *HP1021Δcys*. M, wzorzec mas cząsteczkowych λ /*Pst*I [pz]; 1, fragment DNA otrzymany na matrycy genomowego DNA szczepu 26695 z wykorzystaniem starterów P33/P36. Spodziewana wielkość 380 pz; 2, fragment DNA otrzymany na matrycy plazmidu pET28a(+)*NstrepHP1021DC* z wykorzystaniem starterów P37/P34. Spodziewana wielkość 940 pz; 3, fragment DNA otrzymany na matrycy plazmidu pTZdeltaHP1021 z wykorzystaniem starterów P35/P38. Spodziewana wielkość około 1200 pz.

Kolejnym krokiem było połączenie otrzymanych fragmentów w reakcji OE-PCR z wykorzystaniem starterów P37/P38 (Rozdział 3.7.11). Otrzymany produkt rozdzielono elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym, a następnie wycięto i oczyszczono z żelu agarozowego. Otrzymany produkt wykorzystano do ligacji metodą klonowania TA z wykorzystaniem wektora pGEM-T Easy (Rozdział 3.1.3). Ligację prowadzono przez noc, a następnie mieszaninę ligacyjną transformowano komórki *E. coli* DH5 α (Rozdział 3.7.9). Stransformowane komórki wysiewano na podłoże LB z dodatkiem kanamycyny (Rozdział 3.7.12.1). W celu selekcji poprawnych konstruktów DNA, otrzymane klony sprawdzono w reakcji PCR, w której matrycą były zlizowane komórki wybranych kolonii transformantów. PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów P37/P38 (Rys. 36). Otrzymany produkt poddano reakcji sekwencjonowania. Po analizie wyników sekwencjonowania wybrano poprawne klony zawierające zmutowane geny, a następnie z jednego wyizolowano plazmid pGEM1021 Δ cysaph-3.

4.10.2.1 Transformacja komórek *H. pylori* i selekcja szczepów *H. pylori* HP1021 Δ Cys

Plazmidem pGEM1021 Δ cysaph-3 transformowano komórki *H. pylori* szczepu N6 (Rozdział 3.7.11). W celu selekcji zmutowanych szczepów wykorzystano podłoże CBA z dodatkiem kanamycyny. Klony wybrane podczas selekcji na podstawie oporności na kanamycynę zabezpieczono w postaci mrożonych zawiesin w pożywce BHI z glicerolem (Rozdział 3.7.13.1). Losowo wybrany klon poddano analizie sekwencji w obrębie zmutowanego genu kodującego białko HP1021DC z wykorzystaniem starterów P37 oraz P38. Analiza sekwencjonowania wykazała, że kodony reszt 27C, 51C, 56C, 238C, 270C zostały poprawnie zamienione, natomiast kodon reszty 216C pozostał niezmieniony. Na podstawie wyników analiz *in vitro* uznano, że zamiana 5 z 6 reszt cysteinowych będzie wystarczającym upośledzeniem funkcji białka i szczep ten wykorzystano w dalszych analizach. Uzyskany szczep *H. pylori* N6 HP1021 Δ Cys wykorzystano w dalszych analizach.



Rys. 36. Fragment DNA powielony w reakcji PCR na matrycy plazmidu pGEM1021Δcysaph-3. Wykorzystano startery P37/P38. Spodziewana wielkość produktu – ok. 2400 pz. M- wzorzec mas cząsteczkowych 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific; 10787018); 1 – Produkt PCR otrzymany na matrycy plazmidu pGEM1021Δcysaph-3.

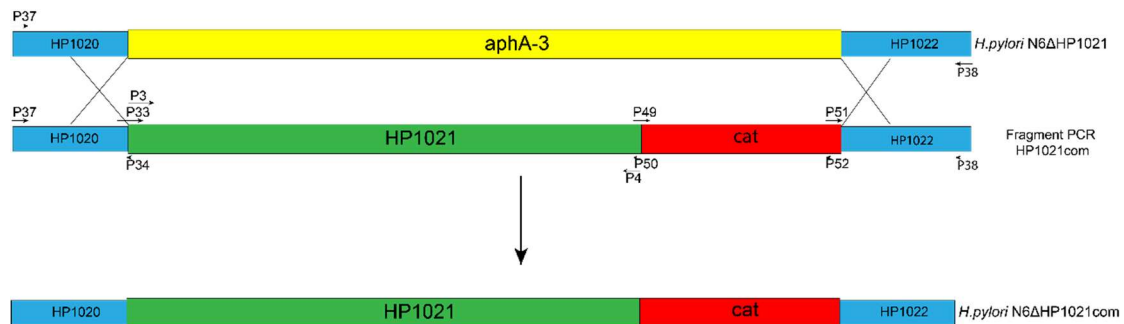
4.10.3 Przygotowanie szczepu komplementacyjnego N6ΔHP1021com

W trakcie pracy dysponowano zmutowanym szczepem *H. pylori* N6ΔHP1021, w którym gen *HP1021* został zastąpiony kasetą oporności na kanamycynę, otrzymanym na drodze delekcji genu *HP1021* w szczepie N6 *H. pylori*, analogicznie jak opisano w pracy⁴⁰ (Tab. 3). W celu oceny specyficzności otrzymanych wyników *in vivo* uzyskanych z wykorzystaniem szczepu *H. pylori* N6ΔHP1021, przygotowano szczep komplementacyjny, w którym przywrócono gen *HP1021* w szczepie zmutowanym *H. pylori* N6ΔHP1021 w natywnym locus. W tym celu przygotowano konstrukcję PCR oraz przeprowadzono rekombinację homologiczną (Rys. 37) w celu wprowadzenia genu *HP1021* do chromosomu *H. pylori* w locus natywnym genu *HP1021*.

4.10.3.1 Przygotowanie konstruktu DNA 1021cat do przywrócenia genu HP1021 na chromosomie

W celu przygotowania konstruktu DNA do wymiany homologicznej przygotowano w reakcji PCR cztery fragmenty DNA (Rys. 37): 1/ fragment HP1020 z wykorzystaniem starterów P37/P34 na matrycy pGEMHP1021Δcys; 2/ fragment HP1021 z wykorzystaniem starterów P33/P50 na matrycy genomowego DNA *H. pylori* N6; 3/ fragment cat z wykorzystaniem starterów P49/P52 na matrycy szczepu ΔpDZ¹²⁰; 4/ fragment HP1022 z wykorzystaniem starterów P51/P38 na matrycy pGEMHP1021Δcys. Kolejnym krokiem było połączenie otrzymanych fragmentów w reakcji OE-PCR z wykorzystaniem starterów P37 oraz P38 (Rozdział 3.7.11). Następnie otrzymany produkt PCR (HP1021com) wykorzystano do

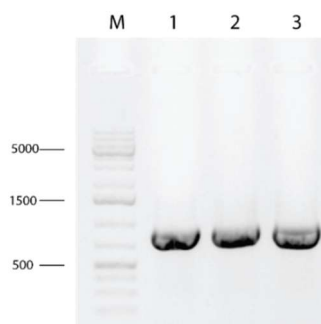
transformacji *H. pylori* N6Δ1021 (Rozdział 3.7.13.1). Do selekcji rekombinantów wykorzystano podłoże z dodatkiem chloramfenikolu.



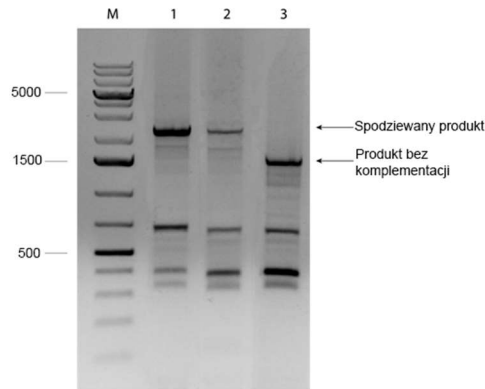
Rys. 37. Przygotowanie szczepu komplementacyjnego N6ΔHP1021com. Schemat wymiany genu oporności na kanamycynę, na gen kodujący białko HP1021 oraz gen oporności na chloramfenikol.

4.10.3.2 Weryfikacja poprawności przygotowania szczepu komplementacyjnego *H. pylori* N6Δ1021com

Z otrzymanych kolonii *H. pylori* opornych na chloramfenikol wyizolowano genomowy DNA, który następnie wykorzystano jako matrycę w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów P3/P4 w celu potwierdzenia obecności genu *HP1021* (Rys. 38) oraz starterów P37/P38 w celu potwierdzenia obecności genu *HP1021* w odpowiednim locus chromosomu (Rys. 39). Po weryfikacji poprawności rekombinacji, poprawność sekwencji wprowadzonego do chromosomu genu *HP1021* sprawdzono sekwencjonowaniem fragmentu DNA powielonego starterami P37/P38 w reakcji PCR.

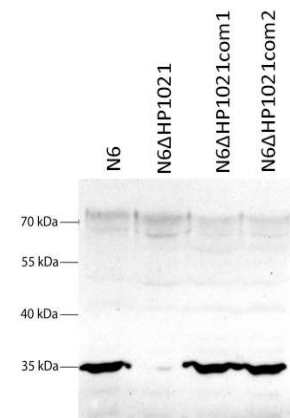


Rys. 38. Analiza fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR potwierdzająca obecność genu *HP1021* w otrzymanym zmutowanym szczepie komplementacyjnym N6ΔHP1021com. PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów P3/P4 na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego z otrzymanych uprzednio zmutowanych szczepów. Otrzymano produkt o pożądanej wielkości około 897 pz. M - wzorzec mas cząsteczkowych 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific; 10787018); 1,2,3 - fragmenty DNA otrzymane po reakcji PCR uzyskane na matrycy genomowego DNA izolowanego z trzech niezależnych kolonii uzyskanych po transformacji.



Rys. 39. Analiza fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR w celu oceny poprawności wprowadzonego na chromosomie bakteryjnym fragmentu w szczepie komplementacyjnym N6ΔHP1021com. PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów P37/P38 na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego z otrzymanych zmutowanych szczepów (Rys. 37). Otrzymano poprawnej wielkości (około 2200 pz) produkt PCR w przypadku klonów nr 1 i 2. Dodatkowe fragmenty DNA obecne na żelu są prawdopodobnie wynikiem niespecyficznego działania reakcji PCR. M: wzorzec mas cząsteczkowych 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific; 10787018); 1,2, fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR uzyskane na matrycy genomowego DNA izolowanego z dwóch niezależnych kolonii transformowanych szczepów 3, fragment PCR otrzymany na matrycy genomowego DNA szczepu dzikiego N6 (spodziewana wielkość około 1500 pz).

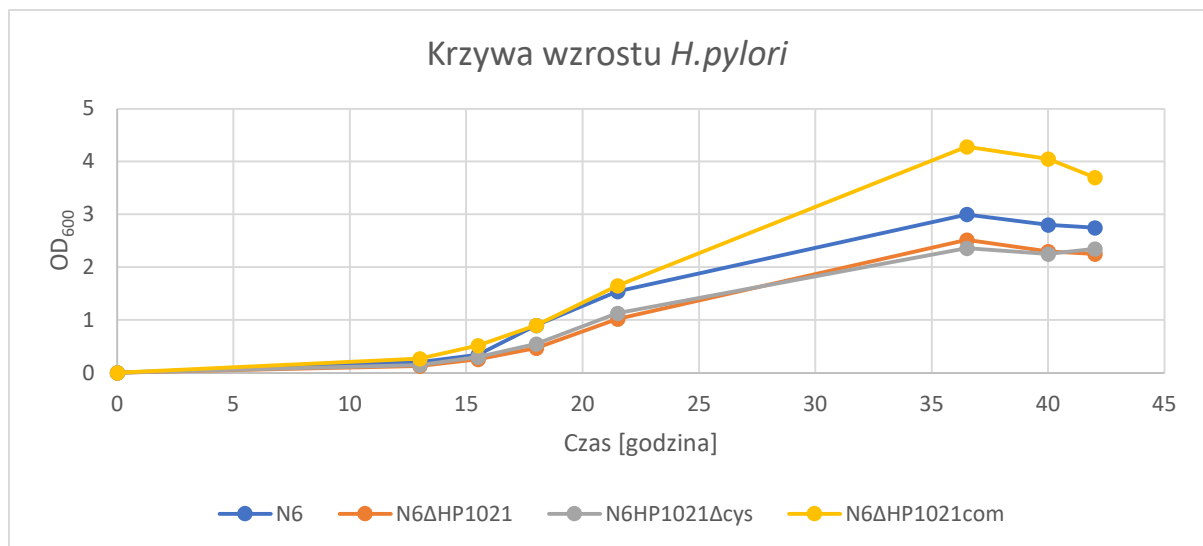
W otrzymanym szczepie komplementacyjnym N6ΔHP1021com zbadano również obecność oraz poziom syntezy białka HP1021 metodą Western Blotting (Rys. 40). Uzyskane wyniki wskazują na to, że ekspresja genu *HP1021* w szczepie komplementacyjnym N6ΔHP1021com została przywrócona oraz białko HP1021 jest syntezowane na podobnym poziomie jak w szczepie dzikim.



Rys. 40. Analiza syntezy białka HP1021 w szczepach *H. pylori* metodą Western Blotting. Wykorzystano królicze przeciwciała I-rzędowe anti-HP1021 oraz ośle przeciwciała II-rzędowe skierowane przeciwko króliczemu IgG (NA934V, Rozdział 3.3). Reakcję wywołano chemiluminescencyjnie. N6-szczep dziki *H. pylori*; N6ΔHP1021-szczep delecyjny genu *HP1021*; N6ΔHP1021com1, N6ΔHP1021com2 – szczep komplementacyjny genu *HP1021*.

4.11 Analiza wzrostu hodowli bakterii szczepu dzikiego *H. pylori* N6 oraz szczepów zmutowanych N6Δ1021, N61021Δcys oraz N6Δ1021com

Szczepy *H. pylori* ΔHP1021 charakteryzują się opóźnionym wzrostem w hodowli płynnej lub tworzeniem mniejszych kolonii w hodowli na podłożu stałym^{39,40}. W celu scharakteryzowania wpływu wprowadzonych mutacji na wzrost szczepów *H. pylori* N6: ΔHP1021, HP1021Δcys oraz ΔHP1021com, przeprowadzono analizę wzrostu hodowli na podłożu płynnym. Hodowle płynne *H. pylori* przygotowywane były jak opisano w rozdziale 3.6.2. Hodowle zaszczipiano do OD₆₀₀ = 0,005, a wzrost hodowli monitorowano prowadząc pomiary OD₆₀₀ hodowli w odstępach 2,5-3 godzin począwszy od 12 godziny trwania hodowli. Z otrzymanych danych wykreślono krzywą wzrostu (Rys. 41). Otrzymane wyniki świadczą o wolniejszym wzroście hodowli szczepów zmutowanych N6Δ1021 oraz N61021Δcys w porównaniu ze szczepem dzikim. Z otrzymanych danych wnioskować można również, że hodowla komórek szczepu komplementacyjnego N6ΔHP1021com po przywróceniu syntezy białka HP1021 rośnie szybciej niż hodowle szczepu N6ΔHP1021, co świadczy o przywróceniu aktywności czynników kontrolujących wzrost *H. pylori* zależnych od HP1021. Końcowo szczep N6ΔHP1021com osiąga wyższe wartości OD₆₀₀ niż szczep dziki N6, co trudno jest wytłumaczyć na podstawie dotychczas uzyskanych wyników (więcej w rozdziale Dyskusja).



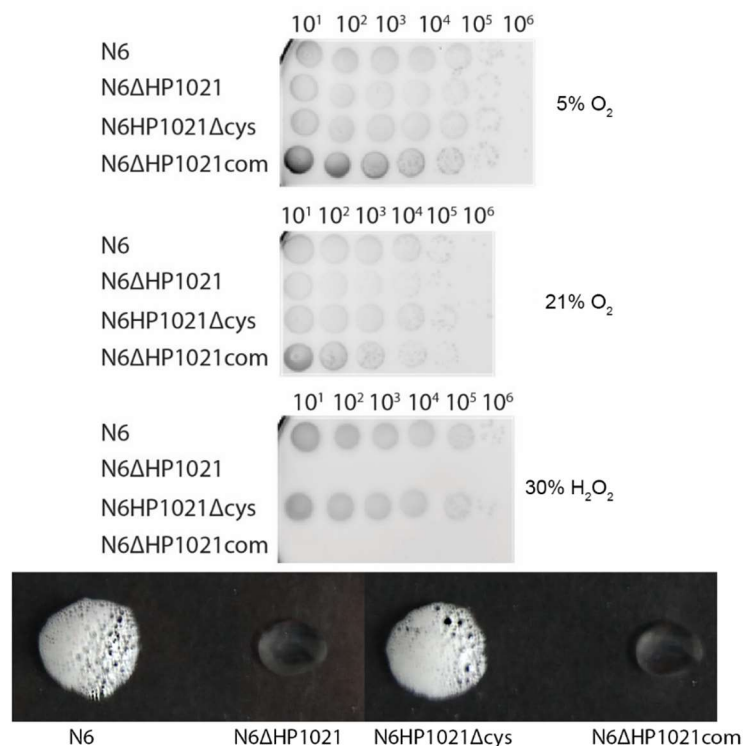
Rys. 41. Krzywe wzrostu hodowli badanych szczepów *H. pylori*. Hodowlę prowadzono przez okres 42 godzin. OD₆₀₀ hodowli wszystkich szczepów na początku wynosiło 0,005.

4.12 Analiza wpływu szoku oksydacyjnego na przeżywalność szczepów N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com *H. pylori*

Celem eksperymentu było określenie przeżywalności badanych szczepów N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com w warunkach szoku oksydacyjnego. Szok oksydacyjny wywoływany był przez poddanie *H. pylori* działaniu H₂O₂ lub inkubację hodowli w warunkach aerobowych. Hodowle płynne *H. pylori* przygotowywane były jak opisano w rozdziale 3.6.2. W dniu poprzedzającym analizę, hodowle przeszczepiano do OD₆₀₀ = 0,005. W dniu analizy każdy z hodowanych szczepów rozdzielano po 3 ml do probówek typu falcon przygotowując trzy identyczne serie szczepów: N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com. Następnie do jednej serii szczepów dodawano perhydroflu do stężenia 10 mM (seria 1), do pozostałych dwóch serii (seria 2 i 3) nie dodawano żadnych odczynników. Następnie hodowle serii 1 i 2 przeniesiono do warunków mikroaerofilnych (zamknięto w słojach i wymieniono atmosferę na mikroaerofilną), a serię 3 przeniesiono do warunków tlenu atmosferycznego. Wszystkie hodowle prowadzono przez 6 godzin w identycznych warunkach temperatury i wytrząsania (w tej samej wytrząsarce). Po zakończonej hodowli wykonano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń hodowli i każde rozcieńczenie wysiewano w objętości 5 μl w postaci mini-hodowli na płytkę z pożywką CBA z 10% krwią końską (Rys. 42A). Płytki hodowano kolejne 3 dni w warunkach mikroaerofilnych. Po upływie 3 dni analizowano wzrost hodowli na płytkach oceniając wzrost kolonii w mini-hodowlach wysianych z poszczególnych rozcieńczeń hodowli wyjściowej.

W przypadku hodowli w warunkach mikroaerofilnych obserwowano podobny wzrost wszystkich szczepów w zakresie rozcieńczeń 10¹-10⁶. W przypadku hodowli w warunkach tlenowych odnotowano obniżoną przeżywalność szczepu N6ΔHP1021, którą obserwowano dla zakresu rozcieńczeń 10¹-10⁴. W tych warunkach wzrost hodowli pozostałych szczepów obserwowano dla zakresu rozcieńczeń 10¹-10⁵. W przypadku hodowli szczepów po uprzednim kontakcie z perhydrolem odnotowano całkowity brak wzrostu szczepów N6ΔHP1021 oraz N6ΔHP1021com. Wzrost szczepów N6 oraz N6HP1021Δcys odnotowano na poziomie podobnym jak w przypadku warunków mikroaerofilnych. Otrzymane wyniki świadczą o braku zdolności do przeżycia szczepu delecyjnego N6ΔHP1021 w obecności 10 mM H₂O₂ w porównaniu ze szczepem dzikim. W przypadku szczepu komplementacyjnego, N6ΔHP1021com, odnotowano brak przeżywalności w obecności 10 mM H₂O₂, co może

sugerować wystąpienie dodatkowej mutacji powodującej uszkodzenie mechanizmu działania katalazy w tym szczepie, co również potwierdzono mikrobiologicznym testem katalazowym (Rys. 42B) (więcej w rozdziale Dyskusja).



Rys. 42. A Przeżywalność *H. pylori* szczepów N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com w warunkach stresu oksydacyjnego. Płynne hodowle bakteryjne inkubowano przez 6 godzin w różnych warunkach atmosfery (opisane z prawej strony rysunku), następnie przygotowano seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia hodowli, które wysiewano w objętości 5 μl na podłoże stałe w postaci mini-hodowli. Zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii bakteryjnych na płytkach inkubowanych 3 dni w warunkach mikroaerofilnych. **B** Mikrobiologiczny test katalazowy. 10 μl hodowli bakteryjnych o takim samym OD₆₀₀ naniesiono na szkiełko, a następnie dodano 10 μl 30% H₂O₂.

4.13 Analiza ekspresji wybranych genów w szczepach *H. pylori* N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com w warunkach stresu oksydacyjnego

Celem badań była analiza zmiany ekspresji wybranych genów, przypisanych do regulonu HP1021⁴¹ (Tab. 17), pod wpływem szoku oksydacyjnego. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano szczepy *H. pylori*: N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz szczep N6ΔHP1021com. Hodowle płynne *H. pylori* przygotowano jak opisano w rozdziale 3.6.2. Hodowlę właściwą zaszczepiano do OD₆₀₀ = 0,005 w przypadku szczepów N6, N6HP1021Δcys

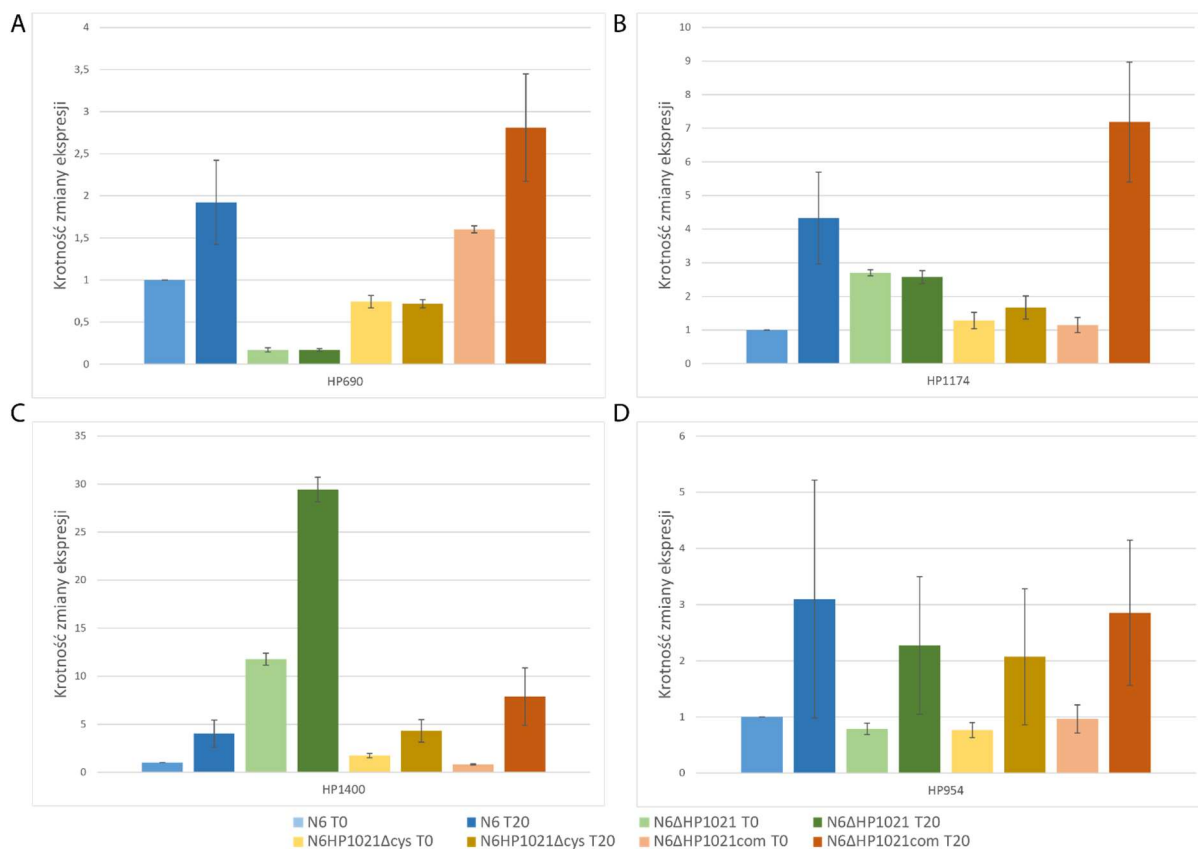
oraz N6 Δ HP1021com oraz do OD₆₀₀ = 0,01 w przypadku szczepu N6 Δ HP1021, i hodowano przez ok. 18 godzin do osiągnięcia przez hodowlę OD₆₀₀ = 0,8. Hodowle poddawano szokowi oksydacyjnemu w warunkach działania tlenu atmosferycznego przez 20 min. Próby hodowli pobierano przed szokiem oksydacyjnym oraz po 20 minutach szoku jak opisano w rozdziale 3.8.1. Z bakterii izolowano RNA zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 3.8.1. Wyizolowany materiał RNA wykorzystano jako matrycę do reakcji odwrotnej transkrypcji (Rozdział 3.8.2). Następnie na otrzymanych matrycach cDNA przeprowadzono reakcję RT-qPCR (Rozdział 3.8.3.) w celu zbadania ekspresji wybranych genów stosując odpowiednio zaprojektowane pary starterów (Tab. 17). Wybór genów poddanych analizie ekspresji przeprowadzony był w oparciu o dane literaturowe, które wstępnie wskazywały geny należące do regulonu HP1021 (Tab. 17).

Tab. 17. Geny badane w analizie RT-qPCR, znajdujące się przypuszczalnie w regulonie białka HP1021, wyznaczone na podstawie opublikowanych danych ⁴¹.

Gen	Nazwa	Funkcja		Startery do reakcji RT-qPCR*
HP0690	<i>fadA</i>	Acetylotransferaza acetyl koenzymu A	Aktywowany przez HP1021	P21 P22
HP1174	<i>gluP</i>	Transporter glukozy	Hamowany przez HP1021	P25 P26
HP1400	<i>fecA3</i>	Białko transportu żelaza	Hamowany przez HP1021	P19 P20
HP0954	<i>rdxA</i>	Nitroreduktaza NAD(P)H- zależna	Hamowany przez HP1021	P23 P24

*Sekwencje starterów podano w Tab. 5

Za gen referencyjny, którego ekspresja nie zmienia się w stosowanych warunkach hodowli, uznano gen 16S rRNA, który powielano z użyciem starterów P27/P28¹²¹. Wyniki przedstawiono jako krotność zmiany poziomu ekspresji badanego genu w warunkach stresu oksydacyjnego (T20) w stosunku do ekspresji tego genu w szczepie dzikim N6 w warunkach przed szokiem (N6 T0) (Rys. 43, Tab. 18). Otrzymane wyniki opracowano na podstawie trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (niezależnych hodowli prowadzonych w różnym czasie). Dla każdego powtórzenia przeprowadzono dwa powtórzenia techniczne reakcji qPCR.



Rys. 43. Analiza ekspresji genów HP0690 (A), HP1174 (B), HP1400 (C) oraz HP0954 (D) w warunkach mikroaerofilnych (T0) oraz w szoku oksydacyjnym (T20). Otrzymane wyniki porównywano z wynikami dla szczepu dzikiego N6 w czasie T0. Jako gen referencyjny o stałej ekspresji w badanych warunkach wykorzystano gen 16S rRNA.

Tab. 18. Zmiana transkrypcji genów pod wpływem stresu oksydacyjnego w szczepach N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys i N6ΔHP1021com. Krotność (FC, ang. fold change) określa wzrost lub spadek transkrypcji genów w stresie oksydacyjnym (T20) w porównaniu do szczepu dzikiego w warunkach mikroaerofilnych (T0). Odchylenie standardowe (OS) podane dla wartości uzyskanych w reakcji qPCR na matrycy cDNA przygotowanego z RNA izolowanego z 3 hodowli bakteryjnych. Pogrubioną czcionką zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności ($p \leq 0,05$), liczone w stosunku do wartości otrzymanych dla N6 T0. Wartości istotności przedstawione w Tab. 19.

Warunki	Szczep	HP0690		HP1174		HP1400		HP0954	
		FC	OS	FC	OS	FC	OS	FC	OS
T 0	N6	1	0	1	0	1	0	1	0
	N6ΔHP1021	0,2	0,02	2,7	0,09	11,8	0,63	0,8	0,10
	N6HP1021Δcys	0,7	0,07	1,3	0,24	1,7	0,23	0,8	0,13
	N6ΔHP1021com	1,6	0,04	1,1	0,23	0,8	0,06	1,0	0,25
T 20	N6	1,9	0,50	4,3	1,37	4,0	1,41	3,1	2,12
	N6ΔHP1021	0,2	0,02	2,6	0,19	29,4	1,28	2,3	1,22
	N6HP1021Δcys	0,7	0,05	1,7	0,34	4,3	1,17	2,1	1,21
	N6ΔHP1021com	2,8	0,64	7,2	1,78	7,9	2,99	2,8	1,29

Tab. 19. Wartość istotności statystycznej wyników RT-qPCR wyliczona na podstawie testu t-Studenta. Niebieskim tłem zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$, liczone w stosunku do wartości otrzymanych dla N6 T0. NO, nie oznaczono

warunki	szczep	HP690	HP1174	HP1400	HP954
T 0	N6	NO	NO	NO	NO
	N6ΔHP1021	4,60E-07	5,18E-06	7,67E-06	2,26E-02
	N6HP1021Δcys	3,79E-03	1,14E-01	5,46E-03	3,96E-02
	N6ΔHP1021com	1,41E-05	3,29E-01	7,96E-03	8,25E-01
T 20	N6	3,30E-02	1,34E-02	2,02E-02	1,62E-01
	N6ΔHP1021	9,22E-08	1,39E-04	2,76E-06	1,46E-01
	N6HP1021Δcys	5,89E-04	2,78E-02	8,03E-03	2,00E-01
	N6ΔHP1021com	7,98E-03	3,85E-03	1,64E-02	6,78E-02

Tab. 20. Zmiana transkrypcji genów pod wpływem stresu oksydacyjnego w szczepach N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys i N6ΔHP1021com. Krotność (FC, ang. fold change) określa wzrost lub spadek transkrypcji genów w danym szczepie w warunkach stresu tlenowego (T20) w odniesieniu do warunków mikroaerofilnych (T0). Wartości do policzenia krotności poziomów transkrypcji zaczerpnięto z Tab. 18. Wartości zbliżone do 1 świadczą o braku zmiany transkrypcji pod wpływem stresu oksydacyjnego. Pogrubioną czcionką zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności ($p \leq 0,05$), liczone w stosunku do wartości otrzymanych dla T0. Wartości istotności przedstawione w Tab. 21.

	HP0690	HP1174	HP1400	HP0954
Zmiana ekspresji T20/ T0	FC	FC	FC	FC
N6	1,9	4,3	4,0	3,1
N6ΔHP1021	1,0	0,9	2,5	2,9
N6HP1021Δcys	1,0	1,3	2,5	2,7
N6ΔHP1021com	1,8	6,3	9,6	2,9

Tab. 20. Wartość istotności statystycznej wyników RT-qPCR wyliczona na podstawie testu t-Studenta. Niebieskim tłem zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$, liczone w stosunku do wartości otrzymanych w warunkach T0 każdego z badanych szczepów.

szczep	HP690	HP1174	HP1400	HP954
N6	3,30E-02	1,34E-02	2,02E-02	1,62E-01
N6ΔHP1021	9,33E-01	3,57E-01	2,82E-05	1,04E-01
N6HP1021Δcys	6,75E-01	1,89E-01	6,69E-03	1,37E-01
N6ΔHP1021com	3,08E-02	4,32E-03	1,51E-02	6,79E-02

W szczepie dzikim N6 gen *HP0690* podlega wyższej transkrypcji w warunkach stresu oksydacyjnego niż w warunkach mikroaerofilnych (FC 1,9; Rys. 43; Tab. 18). Świadczy to o aktywacji transkrypcji genu pod wpływem warunków oksydacyjnych. W przypadku szczepu

delecyjnego N6 Δ HP1021, poziom transkrypcji *HP0690* w warunkach mikroaerofilnych jest niższy niż w szczepie N6 (FC 0,2) i pozostaje na obniżonym poziomie w stresie tlenowym (FC 0,2; Rys. 43; Tab. 18; Tab. 20). Świadczy to o kontroli ekspresji *HP0690* przez HP1021 zarówno w warunkach mikroaerofilnych jak i szoku tlenowego. Gen *HP0690* w szczepie N6HP1021 Δ cys w warunkach mikroaerofilnych podlega obniżonej transkrypcji w odniesieniu do szczepu dzikiego (FC 0,7; Rys. 43; Tab. 18) oraz, podobnie jak w szczepie N6 Δ HP1021, nie wykazano zmiany poziomu transkrypcji *HP0690* w odpowiedzi na stres tlenowy (FC 0,7; Rys. 43, Tab. 18 oraz Tab. 20). Wynik wskazuje na to, że regulacja HP1021 na drodze zależnej od reszt cystein jest istotna dla aktywności HP1021 i zapewnia właściwą kontrolę transkrypcji genu *HP0690* w stresie oksydacyjnym. W szczepie komplementacyjnym N6 Δ HP1021com w warunkach mikroaerofilnych transkrypcja genu *HP0690* jest wyższa niż w szczepie N6 (FC 1,6). Poziom transkrypcji genu w warunkach stresu tlenowego w szczepie N6 Δ HP1021com w porównaniu do transkrypcji w szczepie N6 w warunkach mikroaerofilnych jest wyższy (FC 2,8). Wzrost transkrypcji w szoku oksydacyjnym w szczepie N6 Δ HP1021com (FC 1,8, Tab. 20) i w szczepie N6 (FC 1,9, Tab. 20) jest podobny, co wskazuje na przywrócenie kontroli ekspresji *HP0690* zapewnianej przez HP1021.

W przypadku genu *HP1174* w szczepie dzikim N6 wykazano około czterokrotny wzrost poziomu transkrypcji pod wpływem działania stresu oksydacyjnego (FC 4,3; Rys. 43; Tab. 18; Tab. 20). Świadczy to o aktywacji transkrypcji genu pod wpływem warunków oksydacyjnych. W szczepie N6 Δ HP1021 poziom transkrypcji *HP1174* był podwyższony w stosunku do szczepu N6 (FC 2,7) i jednocześnie niezależny od działania stresu tlenowego (FC 2,6; Rys. 43; Tab. 18; Tab. 20). Świadczy to o kontroli ekspresji *HP1174* przez HP1021 zarówno w warunkach mikroaerofilnych jak i szoku tlenowego. Poziom transkrypcji *HP1174* w szczepie N6HP1021 Δ cys w warunkach mikroaerofilnych zbliżony był do poziomu transkrypcji w szczepie dzikim N6 (FC ok. 1,3), a wzrost transkrypcji w stresie oksydacyjnym nieznaczny (FC 1,7). Porównując zmianę ekspresji *HP1174* pod wpływem stresu w szczepie N6HP1021 Δ cys można stwierdzić, że zmiana wynosiła około 30% (FC 1,3; Tab. 20) i jest prawdopodobnie nieistotna biologicznie, szczególnie porównując ją do zmiany ekspresji w szczepie N6 (FC 4,3; Tab. 20). Wynik, podobnie jak w przypadku analizy ekspresji genu *HP0690*, wskazuje na to, że regulacja HP1021 na drodze zależnej od reszt cystein jest istotna dla aktywności HP1021 i zapewnia właściwą kontrolę transkrypcji genu *HP1174* w stresie oksydacyjnym. Poziom transkrypcji *HP1174* w szczepie N6 Δ HP1021com był podobny jak w przypadku szczepu

dzikiego N6 w warunkach mikroaerofilnych (FC 1,1; Rys. 43; Tab. 18), natomiast w warunkach stresu tlenowego transkrypcja genu w szczepie N6 Δ HP1021com wzrosła siedmiokrotnie w stosunku do szczepu N6 w warunkach mikroaerofilnych (FC 7,2; Rys. 43, Tab. 18). Pomimo różnic w wartościach zmian zachodzących pod wpływem stresu oksydacyjnego w szczepie N6 Δ HP1021com i N6 (Tab. 20), zależność zmiany poziomu transkrypcji od stresu oksydacyjnego została zachowana (wzrost transkrypcji w obu szczepach), co świadczy o przywróceniu funkcji genu *HP1021* w szczepie N6 Δ HP1021com.

W przypadku genu *HP1400* wykazano czterokrotny wzrost transkrypcji w szczepie dzikim N6 poddanym działaniu stresu tlenowego (FC 4,0; Rys. 43; Tab. 18; Tab. 20). Świadczy to o aktywacji transkrypcji genu pod wpływem warunków oksydacyjnych. Poziom transkrypcji w szczepie N6 Δ HP1021 w warunkach mikroaerofilnych kształtował się na poziomie około 12-krotnie wyższym niż w szczepie dzikim (FC 11,8), natomiast w warunkach stresu tlenowego, jego transkrypcja była prawie 30-krotnie wyższa niż w warunkach mikroaerofilnych w szczepie N6 (FC 29,4). Wzrost transkrypcji *HP1400* w stresie tlenowym w szczepie N6 Δ HP1021 był 2,5-krotny (FC 2,5; Tab. 20), jednak zmiana transkrypcji *HP1400* w szczepie N6 Δ HP1021 była wyższa niż w szczepie N6 (FC 4,0; Tab. 20). Wskazuje to na zależność transkrypcji genu *HP1400* od *HP1021*, zarówno w warunkach mikroaerofilnych jak i w stresie oksydacyjnym. W szczepie N6HP1021 Δ cys wykazano podwyższony poziom transkrypcji genu *HP1400* w warunkach mikroaerofilnych (FC 1,7; Tab. 18) i szoku oksydacyjnego (FC 4,3; Tab. 18). Zauważyć należy, że wzrost transkrypcji *HP1400* pod wpływem działania stresu tlenowego w szczepie N6HP1021 Δ cys był niższy niż wzrost transkrypcji w szczepie N6 w analogicznych warunkach (FC 2,5 w szczepie N6HP1021 Δ cys oraz FC 4,0 w szczepie N6; Tab. 20) i jednocześnie porównywalny do zmiany transkrypcji *HP1400* w szczepie N6 Δ HP1021 (FC 2,5; Tab. 20). Wskazuje to na możliwy udział dodatkowego regulatora w kontroli ekspresji genu *HP1400* (patrz Dyskusja). Szczep komplementacyjny N6 Δ HP1021com wykazywał podobny poziom transkrypcji genu *HP1400* w warunkach mikroaerofilnych jak szczep dziki N6 (FC 0,8). Transkrypcja *HP1400* w szczepie N6 Δ HP1021com pod wpływem działania stresu tlenowego była ponad 7-krotnie wyższa niż w warunkach mikroaerofilnych szczepu N6 (FC ok. 7,9), tym samym transkrypcja *HP1400* w szczepie N6 Δ HP1021com w warunkach stresu wzrosła około 10-krotnie (FC 9,6; Tab. 20). Pomimo różnic w wartościach zmian zachodzących pod wpływem stresu oksydacyjnego w szczepie N6 Δ HP1021com i N6, zależność zmiany poziomu transkrypcji

od stresu oksydacyjnego została zachowana (wzrost transkrypcji w obu szczepach), co świadczy o przywróceniu funkcji genu *HP1021* w szczepie N6Δ*HP1021*com.

W przypadku genu *HP0954* w warunkach mikroaerofilnych zaobserwowano nieznacznie obniżony poziom ekspresji genu w szczepie N6Δ*HP1021* (FC 0,8) i N6*HP1021*Δ*cys* (FC 0,8) w stosunku do szczepu N6 (Rys. 43; Tab. 18), ale zmiana prawdopodobnie nie ma znaczenia biologicznego. Nie wykazano natomiast żadnych istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu w warunkach stresu oksydacyjnego ani w szczepie N6 ani w zmutowanych szczepach (Rys. 43; Tab. 20). Świadczy to o braku zależności transkrypcji *HP0954* od aktywności regulatora *HP1021*.

Podsumowanie wyników analizy ekspresji genów:

Podsumowując uzyskane wyniki dotyczące ekspresji genów *HP0690*, *HP1174* i *HP1400* można stwierdzić, że są one zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi⁴¹: ekspresja genu *HP0690* jest aktywowana, a genów *HP1174* i *HP1400* hamowana przez białko *HP1021* w warunkach mikroaerofilnych (Rys. 43, Tab. 18). W analizie wykazano, że geny te podlegają kontroli w zależności od warunków redoks na drodze zależnej od *HP1021*, przy czym transkrypcja genów zostaje aktywowana w stresie oksydacyjnym (Rys. 43; Tab. 20).

5 Dyskusja wyników

Celem pracy doktorskiej było poznanie i wstępne scharakteryzowanie mechanizmu regulacji aktywności sierociego regulatora odpowiedzi HP1021.

W środowisku swojego bytowania komórki *H. pylori* są narażone na stres oksydacyjny generowany w głównym stopniu przez komórki gospodarza¹²². *H. pylori* posiadają zdolność przeciwdziałania skutkom stresu oksydacyjnego^{14,123,124}. Co więcej, *H. pylori* wykształciła mechanizmy zmieniające szlaki odpowiedzi układu odpornościowego w kierunku syntezy takich aktywnych cząsteczek, które potrafi wydajniej usuwać (np. hamuje szlaki prowadzące do syntezy tlenku azotu NO^{123,124}). Wydaje się, że *H. pylori* potrafi również wykorzystywać mechanizm obronny gospodarza, jakim jest produkcja reaktywnych form tlenu przez komórki odpornościowe, do zwiększenia swojego potencjału patogenności (ROS indukują powstawanie mutacji w DNA *H. pylori*, co sprzyja adaptacji bakterii do środowiska)^{125,126}. Biorąc pod uwagę stałe narażenie bakterii na działanie reaktywnych form tlenu, systemy zwalczania stresu oksydacyjnego u *H. pylori* wydają się być stosunkowo słabo rozwinięte. Jednym z głównych czynników biorących udział w odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny, którego dotychczas nie zidentyfikowano u *H. pylori*¹²⁷, jest obecność białka będącego sensorem stresu oksydacyjnego działającego na zasadzie sensora redoks. W powyższych badaniach, zmierzających do scharakteryzowania białka HP1021 wykazano, że białko to posiada pewne cechy charakterystyczne dla białek będących przełącznikami redoks.

Analiza sekwencji aminokwasowej HP1021 wykazała, że białko to zawiera sześć reszt cysteinowych: C27, C51, C56, C216, C238, i C270 (Rozdział 4.1; Rys. 5; Rys. 6). Reszty cystein zgrupowane są w dwóch domenach: C27, C51, C56 w domenie N-końcowej, która, jak wykazała analiza podobieństwa może mieć charakter regulatorowy, oraz C216, C238 i C270 w domenie C-końcowej zawierającej również motyw HTH wiążący DNA. Analizy nie wykazały, aby reszty cysteinowe w badanym białku tworzyły jeden ze znanych motywów cysteinowych. Z danych literaturowych wiadomo, że reszty cysteinowe białek ulegają utlenianiu, co może skutkować zmianami aktywności białka¹²⁸. Reszty cysteiny w białkach są również ważne dla stabilności i funkcji białek. Często biorą udział w tworzeniu mostków dwusiarczkowych, które stabilizują strukturę białek, a także mogą być zaangażowane w wiązanie jonów metali, takich

jak miedź, żelazo i cynk, co jest ważne dla ich funkcji. Dlatego takie reszty często są konserwatywne¹²⁹.

Ponadto, spośród wszystkich łańcuchów bocznych aminokwasów, reszty cysteiny są najbardziej podatne na utlenianie, ponieważ zawierają reaktywne atomy siarki¹³⁰. Anion siarki jest najsilniejszym nukleofilem i jest bogaty w elektrony, które można łatwo usunąć. Reaktywne formy tlenu (ROS) obejmują wolne rodniki ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2 \cdot^-$, $\text{RS}\cdot$ i $\text{ROO}\cdot$), związki nierodnikowe (H_2O_2 i ROOH) oraz reaktywne aldehydy i ketony. Utleniacze mogą bezpośrednio atakować szkielet białka, powodując fragmentację i zmiany konformacyjne w drugorzędowej i trzeciorzędowej strukturze białka. Dwusiarczek, dityrozyna i inne mostki międzycząsteczkowe indukowane przez utlenianie mogą powodować agregację białek i polimeryzację w celu zmiany ich właściwości proteolitycznych^{64,131}. Kolejnym czynnikiem utleniającym białka są reaktywne formy azotu RNS. Tlenek azotu może reagować z ponadtlenkiem ($\cdot\text{O}_2$), tworząc nadtlendioazotyn, który może nitrozylować reszty cystein i tyrozyny oraz utleniać reszty metionin, tryptofanu i fenyloalaniny¹³²⁻¹³⁴. Jednak utlenianie wywołane przez nadtlendioazotyn nie może prowadzić do powstania pochodnych karbonylowych¹³⁵. Funkcja białek zawierających grupę sulfhydrylową może być regulowana przez S-nitrozylację indukowaną tlenkiem azotu (NO). S-nitrozylacja to kowalencyjne przyłączenie grupy tlenu azotu do tiolowego łańcucha bocznego cysteiny¹³⁶.

Na podstawie wyników analizy sekwencji, która przewidywała domenową budowę białka i bipolarne rozmieszczenie reszt cysteinowych, postawiono hipotezę, iż obecność reszt cysteinowych może mieć znaczenie dla regulacji aktywności białka HP1021, a białko może być regulowane na drodze zależnej od stanu redoks. Wykazano, że poddanie rekombinowanego białka HP1021 działaniu tlenu atmosferycznego powoduje utlenianie reszt cysteinowych w białku, co skutkuje zmniejszeniem powinowactwa do DNA (Rozdziały 4.4.1 i 4.5.1.1, Rys. 11 i Rys. 13). Wykazano również, że zależność zmiany powinowactwa HP1021 do *ori2* w zależności od stanu redoks białka jest ściśle powiązana z obecnością reszt cysteinowych w białku HP1021, ponieważ oddziaływanie muteiny HP1021DC, w której reszty cystein zamieniono na reszty alanin, nie wykazywało zmian zależnych od warunków redoks środowiska (Rys. 14). Dalsze badania wykazały, że reszty cysteinowe białka HP1021 są utlenione w komórkach *H. pylori* w czasie poddania hodowli bakteryjnej działaniu tlenu

atmosferycznego (Rozdział 4.2, Rys. 7), co potwierdza hipotezę, że białko może być przełącznikiem redoks.

Wyniki przeprowadzonych analiz pokazują, że utlenione HP1021 nie traci całkowitej zdolności do wiązania DNA – oddziałuje z DNA z mniejszym powinowactwem, ale wciąż wiąże DNA. Wskazuje to na możliwość regulacji transkrypcji genów na zasadzie modelowania struktury DNA w miejscu wiązania dzięki zmianom w konformacji białka. Białkiem działającym w taki sposób jest np. białko SoxR *E. coli*, w przypadku którego wykazuje się stałą zdolność do wiązania z DNA, niezależnie od stopnia utlenienia klastra Fe-S obecnego w białku, lecz bez wpływu na ekspresję regulowanego genu. Taki wpływ odnotowuje się natomiast w momencie w którym dochodzi do utlenienia białka SoxR – zmiana konformacji białka wpływa na strukturę związanego DNA zmieniając ekspresję regulowanego genu⁷⁷ (Rozdział 1.5).

W badaniach *in vitro* wykazano tworzenie się wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych (Rozdział 4.4.1; Rys. 11), których utworzenie zmieniało aktywność białka w stosunku do wiązania regionu *oriC2*. Nie wykazano natomiast tworzenia się międzycząsteczkowych mostków disiarczkowych (Rozdział 4.4.1; Rys. 11). Dalsze badania są niezbędne aby wykazać, które z obecnych w białku reszt cystein biorą udział w kontrolowaniu aktywności HP1021. Zazwyczaj w białkach będących przełącznikami redoks, w regulację aktywności zaangażowane są jedna lub dwie z reszt cystein⁷⁵. Przykładowo, w białku OxyR bakterii *E. coli* występuje sześć reszt cystein, natomiast tylko dwie z nich, Cys199 i Cys208, są istotne w regulacji aktywności tego białka. Utlenienie Cys199 i Cys208 i utworzenie wewnątrzcząsteczkowego mostka disiarczkowego powoduje zmianę aktywności białka w wiązaniu DNA⁸⁸. Odmienne niż u *E. coli*, białko OxyR u *Deinococcus radiodurans* dochodzi do utlenienia tylko jednej reszty cysteiny, Cys210, z wytworzeniem kwasu sulfenowego, co powoduje zmianę aktywności białka¹³⁷. W przypadku białka HP1021 *H. pylori* jedna z reszt cystein (Cys27) jest aminokwasem konserwatywnym, obecnym w tej pozycji w białkach homologicznych innych gatunków Campylobacterota³³. Sytuacja ta może sugerować zaangażowanie opisywanej reszty cysteiny w regulację aktywności HP1021 oraz jego homologów w gatunkach spokrewnionych. Ponadto, jak wykazały analizy przewidywanej struktury (Rozdział 4.1; Rys. 6), białko HP1021 prawdopodobnie posiada budowę dwudomenową z bipolarnym rozmieszczeniem reszt cystein. Układ ten, w powiązaniu z wynikami wskazującymi na reaktywność domen (utlenianie/redukcja reszt cysteinowych

i wiązanie jonów Zn^{2+}) oraz zaburzenia mechanizmu regulacji białka w przypadku zamiany reszt cystein na reszty alaniny w jednej z domen (dyskusja poniżej), może sugerować, że każda z domen jest regulowana na zasadzie redoks lub dochodzi do interakcji pomiędzy domenami białka.

Wspomniany wcześniej wpływ utlenienia reszt cysteinowych na zdolność wiązania DNA przez białko HP1021 uzupełniono przeprowadzając badania w warunkach zarówno redukujących jak i nieredukujących z wykorzystaniem mutein HP1021: HP1021NDC i HP1021CDC pozbawionych reszt cystein tylko w poszczególnych domenach, odpowiednio N-końcowej i C-końcowej (Rozdział 4.5, Rozdział 4.7). Analizy te były zainspirowane wynikami przewidywań strukturalnych oraz doniesieniami o częstej dwudomenowej budowie białek będących sensorami tlenowymi⁷⁵. Badając aktywność tych białek odnotowano nieznaczny wpływ utlenienia reszt cystein obecnych w domenie C-końcowej na wzrost powinowactwa HP1021NDC do *oriC2* (Rozdział 4.7.1.1; Rozdział 4.7.2.1; Rys. 21; Rys. 23). Zaznaczyć należy, że jest to zależność odwrotna od obserwowanej dla białka dzikiego (Rys. 13; Rys. 15). Natomiast w przypadku obecności reszt cystein w domenie N-końcowej odnotowano znaczny wpływ stopnia utlenienia reszt cysteinowych na zdolność wiązania białka HP1021CDC z DNA (Rozdział 4.7.1.2; Rozdział 4.7.2.2; Rys. 22; Rys. 24). Niestety, wyniki uzyskane dwoma różnymi metodami dla tej muteiny znacznie różnią się od siebie. W przypadku testu EMSA wykazano zwiększenie powinowactwa białka do DNA w warunkach nieredukujących, odwrotnie niż dla białka dzikiego HP1021. Natomiast w eksperymencie z wykorzystaniem SPR, zwiększone powinowactwo białka do DNA obserwowano dla białka w warunkach redukujących. Trudno jest wyjaśnić zaobserwowane różnice w aktywności HP1021CDC na podstawie dotychczasowych badań. Prawdopodobnie mogą być one spowodowane różnymi warunkami w jakich przeprowadzane są oba eksperymenty oraz zaburzeniem regulacji aktywności muteiny na skutek usunięcia reszt cystein w domenie C-końcowej. Do największych różnic w warunkach analizy należą: różnica w czasie oddziaływania białka z DNA (180 s w SPR, w EMSA 30 min inkubacji, a następnie około 2 godzin rozdziatu), temperaturze reakcji (20°C w SPR, w EMSA 37°C podczas inkubacji przed nałożeniem na żel), obecnością EDTA w analizie EMSA (EDTA obecne w buforze do elektroforezy). Reszty cystein są bardzo reaktywne i wszystkie te zmiany warunków mogły wpłynąć na uzyskane wyniki. Ingerencja w strukturę białka, poprzez usunięcie trzech reszt cysteinowych, również może zaburzać aktywność białka,

podobnie jak zaburzyła redoks-zależną aktywność drugiej muteiny HP1021NDC (utleniona muteina oddziaływała z DNA z większym powinowactwem niż zredukowana). Mimo niejasności, uzyskane wyniki, poza wskazaniem wpływu każdej z domen na aktywności białka zależną od warunków redoks, mogą sugerować wzajemny wpływ domen skutkujący właściwą regulacją aktywności białka w odpowiedzi na stan redoks środowiska. Większe zmiany aktywności zależne od redoks zaobserwowane w przypadku białka HP1021CDC wskazują na regulatorowy charakter N-końcowej domeny, jak przewidywano na podstawie proponowanej struktury i homologii do innych białek redoks.

W trakcie badań doktorskich wykazano również zdolność białka HP1021 do wiązania jonów Zn^{2+} . Przeprowadzone badania wykazały zaangażowanie obecnych w badanym białku reszt cystein w wiązanie jonów cynku, przy czym na wiązanie jonów Zn^{2+} miał wpływ stan utlenienia reszt cysteinowych (Rozdział 4.8; Rys. 25). Oddziaływanie z jonami Zn^{2+} wpływało na powinowactwo HP1021 do DNA (Rozdział 4.9). Białko HP1021 wiąże jony cynku z różnym powinowactwem w zależności od stanu redoks – białko zredukowane wiąże Zn^{2+} z wyższym powinowactwem niż białko utlenione (Rys. 25). Wykazano, że w wiązanie jonów Zn^{2+} zaangażowane są dwie domeny HP1021, N- i C-końcowa, przy czym oddziaływanie każdej z domen z jonami Zn^{2+} ma odmienną charakterystykę redoks. Obecność utlenionych reszt cystein tylko w domenie N-końcowej (białko HP1021CDC) skutkuje słabszym powinowactwem białka do badanych jonów, natomiast zredukowanie reszt cysteinowych białka HP1021CDC zwiększa jego powinowactwo do jonów Zn^{2+} . Obecność reszt cystein tylko w domenie C-końcowej (białko HP1021NDC), skutkuje brakiem wpływu utleniania i redukcji reszt cysteinowych na zdolność wiązania jonów, przy czym białko HP1021NDC oddziałuje z jonami Zn^{2+} podobnie jak utlenione białko HP1021. Wyniki wskazują na to, że Zn^{2+} związany z domeną C-końcową może pełnić funkcję strukturalną, natomiast wiązanie Zn^{2+} z domeną N-końcową może pełnić rolę regulującą aktywność HP1021 w zależności od stanu redoks. Analizy oddziaływania HP1021 z DNA, szczególnie wyniki SPR, potwierdzają postawioną hipotezę. W przypadku białka HP1021NDC, niezależnie od warunków redoks, jony Zn^{2+} nie wpływały na powinowactwo białka do DNA (Rys. 28; Rys 32.), w przypadku białka HP1021CDC w analizie SPR zaobserwowano destabilizujący wpływ jonów Zn^{2+} na oddziaływanie białka z DNA, podobnie jak białka dzikiego, przy czym wpływ ten był większy w warunkach redukujących niż nieredukujących (Rys. 29; Rys. 33). W analizie EMSA nie obserwowano wpływu jonów Zn^{2+} na

powinowactwo HP1021CDC do DNA. Jednak warunki analizy (Dyskusja, str. 99) mogły wpłynąć na uzyskane wyniki. Podsumowując, przeprowadzone analizy sugerują, że mechanizm regulacji HP1021 może być zależny od wiązania jonu metalu tak, jak ma to miejsce w niektórych białkach będących przełącznikami redoks^{75,138}.

Nie ma pewności natomiast czy jony Zn^{2+} są jonami wiążącymi się *in vivo* z badanym białkiem. Jony cynku, żelaza lub klastry żelazowo siarkowe są często opisywane w połączeniu z białkami redoks. Przykładowo, w białku SoxR *E. coli* występuje klaster $[2Fe-2S]^{2+}$ związany z białkiem z udziałem czterech reszt cysteinowych. Białko, pozostając związane z DNA w regionie promotorowym regulowanego genu *soxS*, pozostaje nieaktywne do czasu utlenienia klastra, co skutkuje aktywacją białka i pobudzeniem transkrypcji regulowanego genu^{78,85}. W przypadku białka PerR u *B. subtilis*, dochodzi do wiązania zarówno Zn^{2+} w domenie C-końcowej jak i jonu Fe^{2+} , którego utlenienie powoduje inaktywację białka PerR⁷⁵. Opisanie mechanizmu w białku HP1021, opartego o wiązanie jonów metali, wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań w kierunku regulacji aktywności zależnej od jonów metali.

Utlenianie HP1021 jest procesem odwracalnym co wykazano poprzez zastosowanie reduktora DTT oraz TCEP (Rozdział 4.4.1) w warunkach *in vitro*. Jak wspomniano, wykazano również utlenianie białka w warunkach *in vivo* (Rozdział 4.2; Rys. 7). W eksperymencie tym, hodowle inkubowano w warunkach mikroaerofilnych, a następnie poddano działaniu tlenu atmosferycznego przenosząc je do warunków aerobowych. Ostatnim etapem było przeniesienie hodowli ponownie do warunków mikroaerofilnych. Analiza ta wykazała, że tylko część białka HP1021 obecnego w komórce powróciła do stanu zredukowanego. Oznaczało to, że komórki częściowo zwalczyły stres oksydacyjny natomiast nie udało się wykazać w jaki sposób dochodzi do reaktywacji białka HP1021. Jak wskazują dane literaturowe, niektóre z sensorów redoks są reaktywowane przez inne białka, głównie tioredoksyny. Inne takie białka, utleniane nieodwracalnie, są degradowane – przykładowo białko PerR *B. subtilis* jest degradowane przez Lon¹³⁹. W przypadku *H. pylori*, oba szlaki reaktywacji są możliwe. Obecne jest białko Trx¹⁴⁰ będące tioredoksyną, biorące udział w redukcji utlenionych białek. Obecna jest też proteaza Lon¹⁴¹. Na wstępnym etapie badań doktorskich, rozważano też udział proteazy HtrA w degradacji HP1021. HtrA jest periplazmatyczną proteazą serynową. Co ciekawe, geny kodujące oba białka znajdują się na jednym operonie, *htrA-ispdF-HP1021*¹⁴²,

a utlenione HP1021, w przeciwieństwie do zredukowanego HP1021, jest substratem dla proteazy HtrA (Szczepanowski i Zarzecka, dane nieopublikowane). W toku badań wykazano jednak, że proteoliza ma prawdopodobnie charakter nieswoisty, a poziom HP1021 w zmutowanych szczepach *htrA* jest podobny jak w szczepie dzikim¹⁴³. Co ciekawe, inaczej niż opisano dla wielu gatunków bakterii, w tym dla blisko spokrewnionego gatunku *C. jejuni*¹⁴⁴, zmutowane szczepy *htrA H. pylori* nie są bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny¹⁴⁵. Może to świadczyć o tym, że u *H. pylori* funkcję odpowiedzi na stres oksydacyjny przejęło białko HP1021.

Aby potwierdzić udział HP1021 w odpowiedzi na stres oksydacyjny, przeprowadzono analizy przeżywalności komórek *H. pylori* oraz analizę transkrypcji genów w warunkach stresu oksydacyjnego. Wykorzystano do tego celu szczep dziki *H. pylori* (N6) oraz jego zmutowane wersje: 1/ delecyjny N6 Δ HP1021, 2/ N6 HP1021 Δ Cys, w którym unieczynniono regulację redoks zależną od reszt cystein i 3/ N6 Δ HP1021com, szczep komplementacyjny służący jako kontrola przywrócenia funkcji genu i białka HP1021 w komórkach szczepu delecyjnego. Podczas analiz przeżywalności *H. pylori* w warunkach stresu oksydacyjnego okazało się, że szczep N6 Δ HP1021com jest tak samo wrażliwy na stres oksydacyjny jak szczep N6 Δ HP1021. Dalsze analizy wykazały, że powodem jest prawdopodobnie mutacja supresorowa, która unieczyniła gen katalazy *katA*. Wstępne analizy sekwencjonowania genomu szczepu N6 Δ HP1021 wykazały istnienie szeregu mutacji supresorowych, w tym w genie *katA* (Strapagiel i Lach; Biobank, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, dane nieopublikowane). Dlatego badania przeżywalności szczepu N6 Δ HP1021 nie są wiarygodne. Szczep N6 HP1021 Δ cys nie miał upośledzonej aktywności katalazowej w stosunku do szczepu dzikiego i wykazywał też podobną aktywność katalazową. Wskazuje to na brak istotnego wpływu redoks-zależnej regulacji HP1021 na ekspresję i aktywność katalazy. Dlatego postanowiono dokładniej zbadać wpływ HP1021 na ekspresję wybranych genów *H. pylori* pod wpływem stresu oksydacyjnego.

Według danych literaturowych, białko HP1021 kontroluje ponad 70 różnych genów⁴¹. W ramach pracy doktorskiej, wybrano 4 geny, wskazane uprzednio jako silnie regulowane przez obecność w komórce białka HP1021. Skupiono się na sprawdzeniu transkrypcji genów *HP0690*, *HP0954*, *HP1174* oraz *HP1400* w czasie wzrostu bakterii w warunkach mikroaerofilnych jak również działania stresu oksydacyjnego (hodowla w warunkach

aerobowych). Wyniki otrzymane w ramach przeprowadzonego eksperymentu potwierdzają wyniki opisywane przez Pflock i współautorów – zaobserwowano podobną zależność transkrypcji genów zależną od obecności białka HP1021 (Rozdział 4.13). W przypadku działania stresu oksydacyjnego odnotowano wzrost transkrypcji wszystkich badanych genów w szczepie dzikim, co wskazało na to, że geny te podlegają aktywacji na skutek stresu oksydacyjnego. W zmutowanym szczepie N6 Δ HP1021 nie zaobserwowano zmiany transkrypcji genów *HP0690* oraz *HP1174* w wyniku działania stresu, co potwierdza iż należą one do regulonu HP1021 i są regulowane przez HP1021 pod wpływem stresu oksydacyjnego. Co najważniejsze dla interpretacji wyników, regulacja transkrypcji *HP0690*, *HP1174* a także *HP1400* została przywrócona w szczepie komplementacyjnym N6 Δ HP1021com, co potwierdza rolę HP1021 w regulacji tych genów, nawet w sytuacji, gdy zaszyły w chromosomie szczepu N6 Δ HP1021, i w konsekwencji istnieją w szczepie N6 Δ HP1021com, mutacje supresorowe. W przypadku *HP1400* odnotowano podwyższoną transkrypcję w szczepie delecyjnym oraz jej znaczny wzrost w czasie działania stresu oksydacyjnego. Wyniki wskazują na zaangażowanie białka HP1021 w regulację transkrypcji tego genu, jednakże otrzymane wyniki dodatkowo sugerują zaangażowanie dodatkowych białek w regulację tego genu, takich jak NikR, w przypadku którego wykazano wpływ na transkrypcję genu *HP1400*^{146,147}. Gen *HP0954* był aktywowany w stresie oksydacyjnym zarówno w szczepie dzikim jak i mutantach HP1021, dlatego prawdopodobnie nie należy do regulonu HP1021. Szczep w którym unieczynniono reszty cystein, N6 *HP1021* Δ cys, charakteryzował się brakiem wzrostu poziomu transkrypcji genów *HP1174* oraz *HP0690* w warunkach stresu oksydacyjnego, co może świadczyć o zaangażowaniu reszt cystein obecnych w białku HP1021 na zmianę transkrypcji wspomnianych genów. Zmiany odnotowane dla tego szczepu oraz dane statystyczne mogą sugerować że to właśnie obecność reszt cystein w białku HP1021, a nie sama obecność białka, ma istotny wpływ na transkrypcję tych genów.

Wymagane są bardziej wnikliwe badania regulonu HP1021 jednakże wyniki prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej mogą wskazywać na przypuszczalne mechanizmy zwalczania stresu oksydacyjnego u bakterii *H. pylori*, które oparte są o geny kodujące transportery błonowe *HP1174* oraz *HP1400*. Transporter glukozy-galaktozowy, *HP1174*, transportuje glukozę na drodze mechanizmu zależnego od jonów Na^+ ¹⁴⁸ jednakże, metabolizm glukozy u *H. pylori* jest nadal słabo poznany^{149,150}. Dodatkowo, dane literaturowe

wskazują na zaangażowanie HP1174 w oporność bakterii na antybiotyki takie jak amoksylicyna czy tetracyklina oraz w tworzenie biofilmu bakteryjnego¹⁵¹. Sugeruje się, że transkrypcja genu *HP1174* jest zależna od czynnika $\sigma 54$ jak również zwiększa się w czasie działania stresu kwasowego na komórkę bakteryjną¹⁵¹. Jak wykazały badania (Rys. 43B) transkrypcja genu *HP1174* wzrasta w czasie działania stresu tlenowego oraz jest stale podwyższona w przypadku szczepu delecyjnego genu *HP1021* co może sugerować że białko HP1021 wzmaga pobieranie glukozy przez komórki *H. pylori* w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Podobny mechanizm wykazano w przypadku bakterii *E. coli* u której dochodzi do wzrostu ekspresji genów *ptsG* oraz *pgi* w stresie tlenowym, odpowiedzialnych za transport glukozy do komórki. HP1400 (*fecA3*) jest białkiem zaangażowanym w transport jonów niklu. Transkrypcja genu *HP1400* hamowana jest przez NikR w obecności jonów Ni^{2+} ¹⁵². NikR jest regulatorem plejotropowym zależnym od jonów niklu (Rozdział 1.4.1. 44). Szlaki regulacyjne zależne od NikR pozwalają bakterii *H. pylori* utrzymać homeostazę jonów niklu¹⁵³. Dodatkowo, NikR bezpośrednio reguluje homeostazę jonów żelaza hamując ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za pobieranie jonów żelaza, w tym białko Fur^{44,146}. Poprzez to białko NikR wpływa również na magazynowanie jonów żelaza oraz aktywność enzymów zależnych od żelaza⁴⁴. Kontrolowanie homeostazy wymienionych jonów jest niezmiernie ważne, szczególnie podczas działania stresu oksydacyjnego⁴⁸. Jako że NikR obniża ekspresję genów odpowiedzialnych za transport jonów żelaza, można postulować, że podczas działania stresu tlenowego, zwiększona ekspresja genu *HP1400* będzie powodować znacznie zwiększone pobieranie jonów niklu przez bakterię *H. pylori* co z kolei skutkować będzie pobudzeniem białka NikR do zachowania homeostazy żelaza poprzez hamowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za pobieranie żelaza. Rolą HP1021 w tym mechanizmie może być hamowanie nadmiernego pobierania jonów niklu przez komórki *H. pylori*.

Białka homologiczne do HP1021 syntezowane są również u innych bakterii z typu *Campylobacterota*, przy czym rola tych regulatorów u innych gatunków nie jest znana. Jednakże, u innych gatunków bakterii należących do *Campylobacterota* wykazano dotychczas obecność innych sensorów stresu tlenowego. W przypadku bakterii *C. jejuni* scharakteryzowane zostały dwa białka będące sensorami tlenowymi. Pierwszym z nich jest białko CosR należące do rodziny regulatorów OmpR. Białko to jest ważne dla przeżywalności bakterii a badania mutantów delecyjnych genu *cosR* wykazały obecność w regulacji *cosR*

około 90 genów zaangażowanych w różne funkcje komórkowe¹⁵⁴. Badania proteomiczne pokazują, że w przypadku poddania bakterii działaniu O_2^- występuje obniżona ekspresja genu *cosR* co może sugerować jego zaangażowanie w odpowiedzi na stres oksydacyjny¹⁵⁵. W szczególności wykazano że białko CosR wiąże się w regionie promotorowym genu *katA*, a delecja genu *cosR* skutkuje zredukowaną aktywnością katalazową¹⁵⁴. Wykazano również, że CosR negatywnie reguluje ekspresję genów *sodB* oraz *dps*¹⁵⁶.

Kolejnym sensorem tlenu *C. jejuni* jest białko PerR opisywane jako Peroxide-sensing Regulator. Białko to należy do rodziny Fur i kontroluje ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym¹⁵⁷. PerR *C. jejuni* hamuje ekspresje szeregu genów takich jak *katA*, *ahpC*, *trxB* czy *dps*, a jego delecja skutkuje silną nadwrażliwością bakterii na obecność nadtlenu wodoru¹⁵⁸. Wykazano, że jony żelaza hamują transkrypcję *perR* co może sugerować istnienie mechanizmu autoregulacji¹⁵⁹. Ponadto białko to może mieć wpływ na zdolność kolonizacji, gdyż delecja *perR* powoduje spadek tej zdolności w przypadku *C. jejuni*¹⁶⁰. Nie zidentyfikowano genu *perR* u *H. pylori*, natomiast obecność genu/białka PerR wykazano u *H. hepaticus*, gatunku spokrewnionego z *H. pylori*.

W świetle wyników otrzymanych w ramach pracy doktorskiej proponuje się mechanizm działania białka HP1021 na zasadzie sensora redoks. Zmiana konformacji spowodowana utlenianiem białka, poprzez powstanie wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych, skutkuje zmianą powinowactwa do wiązania DNA w regionach promotorowych regulowanych genów z wykorzystaniem motywu HTH obecnego w białku. Związanie w regionie promotorowym powoduje aktywację lub zahamowanie transkrypcji genów regulowanych przez badane białko w odpowiedzi na stres tlenowy, któremu poddana jest w swoim środowisku bytowania bakteria *H. pylori*. Jednakże otrzymane wyniki nie wykluczają również istnienia szlaków w których białko HP1021 bierze udział pośredni. Ponadto, możliwa jest regulacja opisywanego białka zarówno poprzez utlenianie reszt cystein jak i wiązanie jonów Zn^{2+} (lub jonów innego metalu będącego naturalnym ligandem tego białka) jak również występowania obu tych czynników jednocześnie. Prawdopodobny wydaje się mechanizm oparty na sile powinowactwa do wiązania konkretnego regionu promotorowego którego regulacja dodatkowo odbywa się przez wiązanie przez białko jonu metalu.

6 Wnioski

1. HP1021 jest regulatorem ekspresji genów, którego oddziaływanie z DNA *in vitro* jest kontrolowane przez dwa czynniki: warunki redoks i wiązanie jonów Zn^{2+} .
2. *In vitro* utlenienie HP1021 lub związanie jonów Zn^{2+} do zredukowanego białka zmniejsza jego powinowactwo do DNA, co może sugerować podobny mechanizm regulacji aktywności w komórkach *H. pylori*.
3. W regulacji aktywności HP1021 na drodze redoks i oddziaływania z jonami Zn^{2+} *in vitro* istotną rolę odgrywają reszty cystein białka.
4. Reszty cystein HP1021 podlegają utlenieniu w komórkach *H. pylori* pod wpływem stresu oksydacyjnego.
5. HP1021 kontroluje ekspresję genów *fadA*, *fecA3* i *gluP* w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Wskazuje to na udział HP1021 w kontroli ekspresji genów w odpowiedzi na stres oksydacyjny, a także na udział FadA, FecA3 i GluP w zwalczaniu stresu oksydacyjnego w komórkach *H. pylori*.
6. HP1021 jest prawdopodobnie sensorem redoks, który uczestniczy w kontroli odpowiedzi *H. pylori* na stres oksydacyjny na drodze regulacji transkrypcji genów.

7 Piśmiennictwo

1. Marshall, B. J. & Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 323, 1311–1315 (1984).
2. Kayali, S. *et al.* *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. *Acta Biomed* 89, 72–76 (2018).
3. Blaser, M. J. & Atherton, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* 113, 321–333 (2004).
4. Moss, S. F. & Malfertheiner, P. *Helicobacter* and Gastric Malignancies. *Helicobacter* 12, 23–30 (2007).
5. Warren, J. R. & Marshall, B. Microbiology 1,2. *Lancet* 1273–1275 (1983).
6. Hooi, J. K. Y. *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 153, 420–429 (2017).
7. Diaconu, S., Predescu, A., Moldoveanu, A., Pop, C. S. & Fierbințeanu-Braticevici, C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. *J. Med. Life* 10, 112–117 (2017).
8. Hathroubi, S., Servetas, S. L., Windham, I., Merrell, D. S. & Ottemann, K. M. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. (2018) doi:10.1128/MMBR.
9. Baj, J. *et al.* *Helicobacter pylori* Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells* 10, 27 (2020).
10. Loh, J. T., Beckett, A. C., Scholz, M. B. & Cover, T. L. High-salt conditions alter transcription of *Helicobacter pylori* genes encoding outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 86, (2018).
11. Ansari, S. & Yamaoka, Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter* 22, e12386 (2017).
12. Krulwich, T. A., Sachs, G. & Padan, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* vol. 9 330–343 (2011).
13. De Reuse, H., Vinella, D., Cavazza, C. & Fischer, W. Common themes and unique proteins for the uptake and trafficking of nickel, a metal essential for the virulence of *Helicobacter pylori*. (2013) doi:10.3389/fcimb.2013.00094.
14. Flint, A., Stintzi, A. & Saraiva, L. M. Oxidative and nitrosative stress defences of *Helicobacter* and *Campylobacter* species that counteract mammalian immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 938–960 (2016).

15. Robinson, K., Letley, D. P. & Kaneko, K. The human stomach in health and disease: Infection strategies by *Helicobacter pylori*. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. 400 1–26 (Springer Verlag, 2017).
16. Gobert, A. P. & Wilson, K. T. Human and *Helicobacter pylori* interactions determine the outcome of gastric diseases. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. 400 27–52 (Springer Verlag, 2017).
17. Slauch, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol. Microbiol.* 80, 580–583 (2011).
18. DeLeo, F. R., Allen, L. A., Apicella, M. & Nauseef, W. M. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J. Immunol.* 163, 6732–40 (1999).
19. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424 (2007).
20. Handa, O., Naito, Y. & Yoshikawa, T. *Helicobacter pylori*: A ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflammation Research* vol. 59 997–1003 (2010).
21. Joseph, B. & Beier, D. Global Analysis of Two-Component Gene Regulation in *H. pylori* by Mutation Analysis and Transcriptional Profiling. in *Methods in Enzymology* vol. 423 514–530 (Academic Press Inc., 2007).
22. Sachs, G., Scott, D. R. & Wen, Y. Gastric infection by *Helicobacter pylori*. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 13, 540–546 (2011).
23. Capra, E. J. & Laub, M. T. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 325–347 (2012).
24. Waidner, B., Melchers, K., Stahler, F. N., Kist, M. & Bereswill, S. The *Helicobacter pylori* CrdRS Two-Component Regulation System (HP1364/HP1365) Is Required for Copper-Mediated Induction of the Copper Resistance Determinant CrdA. *J. Bacteriol.* 187, 4683–4688 (2005).
25. Hung, C.-L. *et al.* The CrdRS two-component system in *Helicobacter pylori* responds to nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* 97, 1128–1141 (2015).
26. Panthel, K., Dietz, P., Haas, R. & Beier, D. Two-component systems of *Helicobacter pylori* contribute to virulence in a mouse infection model. *Infect. Immun.* 71, 5381–5 (2003).
27. Niehus, E. *et al.* Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 52, 947–961

- (2004).
28. Schär, J., Sickmann, A. & Beier, D. Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 187, 3100–9 (2005).
 29. Pflock, M., Kennard, S., Finsterer, N. & Beier, D. Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *J. Biotechnol.* 126, 52–60 (2006).
 30. Forsyth, M. H., Cao, P., Garcia, P. P., Hall, J. D. & Cover, T. L. Genome-wide transcriptional profiling in a histidine kinase mutant of *Helicobacter pylori* identifies members of a regulon. *J. Bacteriol.* 184, 4630–5 (2002).
 31. McGee, D. J., Radcliff, F. J., Mendz, G. L., Ferrero, R. L. & Mobley, H. L. *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J. Bacteriol.* 181, 7314–22 (1999).
 32. Beier, D. & Frank, R. Molecular Characterization of Two-Component Systems of *Helicobacter pylori*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* vol. 182 www.biokemi.su.se/-server (2000).
 33. Schär, J., Sickmann, A. & Beier, D. Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 187, 3100–3109 (2005).
 34. Pellicciari, S. *et al.* Insight into the essential role of the *Helicobacter pylori* HP1043 orphan response regulator: Genome-wide identification and characterization of the DNA-binding sites. *Sci. Rep.* 7, 1–15 (2017).
 35. Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. Growth phase-dependent regulation of target gene promoters for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 184, 4800–4810 (2002).
 36. Olekhovich, I. N. *et al.* Mutations to Essential Orphan Response Regulator HP1043 of *Helicobacter pylori* Result in Growth-Stage Regulatory Defects Pathogenesis. *Infect. Immun.* 81, 1439–1449 (2013).
 37. Olekhovich, I. N., Vitko, S., Valliere, M. & Hoffmana, P. S. Response to metronidazole and oxidative stress is mediated through homeostatic regulator hsra (hp1043) in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 196, 729–739 (2014).
 38. Vannini, A., Roncarati, D. & Danielli, A. The cag-pathogenicity island encoded CncR1 sRNA oppositely modulates *Helicobacter pylori* motility and adhesion to host cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3151–3168 (2016).

39. McDaniel, T. K., DeWalt, K. C., Salama, N. R. & Falkow, S. New Approaches for Validation of Lethal Phenotypes and Genetic Reversion in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 6, 15–23 (2001).
40. Donczew, R. *et al.* The atypical response regulator HP1021 controls formation of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex. *Mol. Microbiol.* 95, 297–312 (2015).
41. Pflock, M. *et al.* The orphan response regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* regulates transcription of a gene cluster presumably involved in acetone metabolism. *J. Bacteriol.* 189, 2339–2349 (2007).
42. Pflock, M. *et al.* Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J. Bacteriol.* 188, 3449–3462 (2006).
43. De Pina, K., Desjardin, V., Mandrand-Berthelot, M. A., Giordano, G. & Wu, L. F. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 670–4 (1999).
44. Contreras, M., Thiberge, J.-M., Mandrand-Berthelot, M.-A. & Labigne, A. Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 49, 947–63 (2003).
45. Jones, M. D., Li, Y. & Zamble, D. B. Acid-responsive activity of the *Helicobacter pylori* metalloregulator NikR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 8966–8971 (2018).
46. Delany, I. *et al.* Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol. Microbiol.* 46, 1107–22 (2002).
47. Bijlsma, J. J. E. *et al.* The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect. Immun.* 70, 606–611 (2002).
48. Haley, K. P. & Gaddy, J. A. Metalloregulation of *Helicobacter pylori* physiology and pathogenesis. *Front. Microbiol.* 6, 1–14 (2015).
49. Fischer, F. *et al.* Characterization in *Helicobacter pylori* of a Nickel Transporter Essential for Colonization That Was Acquired during Evolution by Gastric *Helicobacter* Species. *PLoS Pathog.* 12, (2016).
50. Butcher, L. D., Den Hartog, G., Ernst, P. B. & Crowe, S. E. REVIEW Oxidative Stress Resulting From *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3, 316–322 (2017).
51. Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. & Kist1, M. Purification of *Helicobacter pylori* Superoxide Dismutase and Cloning and Sequencing of the Gene.

- Infection and Immunity* (1993).
52. Esposito, L. *et al.* The crystal structure of the superoxide dismutase from *Helicobacter pylori* reveals a structured C-terminal extension. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784, 1601–1606 (2008).
 53. Pesci, E. C., Cottle, D. L. & Pickett, C. L. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 62, 2687–94 (1994).
 54. Harris, A. G. & Hazell, S. L. Localisation of *Helicobacter pylori* catalase in both the periplasm and cytoplasm, and its dependence on the twin-arginine target protein, KapA, for activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 283–289 (2003).
 55. Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P. & Rovira, C. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 11751–11761 (2009).
 56. Harris, A. G., Beckhouse, A. G., Hinds, F. E., Kolesnikow, T. & Hazell, S. L. Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated ‘KatA-associated protein’, KapA (HP0874). *Microbiology* 148, 3813–3825 (2002).
 57. Harris, A. G. & Hazell, S. L. Localisation of *Helicobacter pylori* catalase in both the periplasm and cytoplasm, and its dependence on the twin-arginine target protein, KapA, for activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 283–289 (2003).
 58. Lekmeechai, S. *et al.* *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles protect the pathogen from reactive oxygen species of the respiratory burst. *Front. Microbiol.* 9, (2018).
 59. Baker, L. M. S., Raudonikiene, A., Hoffman, P. S., Poole, L. B. & Carolina, N. Essential Thioredoxin-Dependent Peroxiredoxin System from *Helicobacter pylori*: Genetic and Kinetic Characterization. *J. Bacteriol.* 183, 1961–1973 (2001).
 60. Wood, Z. A., Schröder, E., Robin Harris, J. & Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40 (2003).
 61. Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G. & Ursini, F. A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 763–780 (2011).
 62. Nelson, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 79, 947–964 (2011).

63. Tonello, F. *et al.* The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol. Microbiol.* 34, 238–246 (1999).
64. Montecucco, C. & de Bernard, M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect.* 5, 715–21 (2003).
65. Wang, G., Hong, Y., Olczak, A., Maier, S. E. & Maier, R. J. Dual Roles of *Helicobacter pylori* NapA in inducing and combating oxidative stress. *Infect. Immun.* 74, 6839–46 (2006).
66. Wang, G., Alamuri, P., Zafri Humayun, M., Taylor, D. E. & Maier, R. J. The *Helicobacter pylori* MutS protein confers protection from oxidative DNA damage. *Mol. Microbiol.* 58, 166–176 (2005).
67. Wang, G., Alamuri, P., Humayun, M. Z., Taylor, D. E. & Maier, R. J. The *Helicobacter pylori* MutS protein confers protection from oxidative DNA damage. *Mol. Microbiol.* 58, 166–176 (2005).
68. Imlay, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776 (2008).
69. Flint, A., Stintzi, A. & Saraiva, L. M. Oxidative and nitrosative stress defences of *Helicobacter* and *Campylobacter* species that counteract mammalian immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* 025, 938–960 (2016).
70. O'Rourke, E. J. *et al.* Pathogen DNA as target for host-generated oxidative stress: Role for repair of bacterial DNA damage in *Helicobacter pylori* colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 2789–2794 (2003).
71. Wang, G., Lo, L. F., Forsberg, L. S. & Maier, R. J. *Helicobacter pylori* Peptidoglycan Modifications Confer Lysozyme Resistance and Contribute to Survival in the Host. *MBio* 3, e00409-12 (2012).
72. Wang, G., Olczak, A., Forsberg, L. S. & Maier, R. J. Oxidative Stress-induced Peptidoglycan Deacetylase in *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 284, 6790–6800 (2009).
73. Austin, C. M., Wang, G. & Maier, R. J. Aconitase functions as a pleiotropic posttranscriptional regulator in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 197, 3076–3086 (2015).
74. Artymiuk, P. J., Green, J., Quail, M. A., Tang, Y. & Guest, J. R. *Escherichia coli*

- aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology* 148, 1027–1037 (2002).
75. Hillion, M. & Antelmann, H. Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biological Chemistry* vol. 396 415–444 (2015).
 76. Greenberg, J. T. & Demple, B. A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J. Bacteriol.* 171, 3933–3939 (1989).
 77. Seo, S. W., Kim, D., Szubin, R. & Palsson, B. O. Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Rep.* 12, 1289–1299 (2015).
 78. Hidalgo, E., Leautaud, V. & Demple, B. The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. *EMBO J.* 17, 2629–2636 (1998).
 79. Griffith, K. L., Shah, I. M. & Wolf, R. E. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol. Microbiol.* 51, 1801–1816 (2004).
 80. Shah, I. M. & Wolf, R. E. Inhibition of Lon-dependent degradation of the *Escherichia coli* transcription activator SoxS by interaction with ‘soxbox’ DNA or RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 60, 199–208 (2006).
 81. Shah, I. M. & Wolf, R. E. Sequence requirements for Lon-dependent degradation of the *Escherichia coli* transcription activator SoxS: Identification of the SoxS residues critical to proteolysis and specific inhibition of in vitro degradation by a peptide comprised of the N-terminal 21 amino acid residues. *J. Mol. Biol.* 357, 718–731 (2006).
 82. Pomposiello, P. J. & Demple, B. Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* 19, 109–114 (2001).
 83. Amábile-cuevas, C. F. & Demple, B. Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: Two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 19, 4479–4484 (1991).
 84. Hidalgo, E., Bollinger, J. M., Bradley, T. M., Walsh, C. T. & Demple, B. Binuclear [2Fe-2S] Clusters in the *Escherichia coli* SoxR Protein and Role of the Metal Centers in Transcription. *J. Biol. Chem.* 270, 20908–20914 (1995).

85. Hidalgo, E. & Dimple, B. An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J.* 13, 138–46 (1994).
86. Watanabe, S., Kita, A., Kobayashi, K. & Miki, K. Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4121–4126 (2008).
87. Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S. & Ames, B. N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41, 753–62 (1985).
88. Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. Activation of the OxyR Transcription Factor by Reversible Disulfide Bond Formation. *Science (80-)*. 279, 1718–1722 (1998).
89. Storz, G., Tartaglia, L. & Ames, B. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science (80-)*. 248, 189–194 (1990).
90. Maret, W. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 8 1419–1441 (2006).
91. Kumsta, C. & Jakob, U. Redox-regulated chaperones. *Biochemistry* vol. 48 4666–4676 (2009).
92. Graf, P. C. F. *et al.* Activation of the Redox-regulated Chaperone Hsp33 by Domain Unfolding. *J. Biol. Chem.* 279, 20529–20538 (2004).
93. Tomb, J. F. *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* vol. 388 539–547 (1997).
94. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580 (1983).
95. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130 (1986).
96. Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179–207 (1980).
97. Ferrero, R. L., Cussac, V., Courcoux, P. & Labigne, A. Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J. Bacteriol.* 174, 4212–4217 (1992).
98. Tomb, J. F. *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547 (1997).
99. Donczew, R., Jaworski, P., Nowaczyk, M., Klajner, M. & Weigel, C. *Helicobacter pylori*

- orisome as a model to study assembly of the initiation complex on bipartite origins. 2015 (2015).
100. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59 (1989).
 101. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
 102. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
 103. Denoncin, K., Nicolaes, V., Cho, S.-H., Leverrier, P. & Collet, J.-F. Protein Disulfide Bond Formation in the Periplasm: Determination of the In Vivo Redox State of Cysteine Residues. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 966 325–336 (2013).
 104. Deng, X. *et al.* Proteome-wide quantification and characterization of oxidation-sensitive cysteines in pathogenic bacteria. *Cell Host Microbe* 13, 358–370 (2013).
 105. Pace, N. J. & Weerapana, E. Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs. *Biomolecules* vol. 4 419–434 (2014).
 106. Jeong, K.-W. *et al.* Backbone Dynamics of an Atypical Orphan Response Regulator Protein, *Helicobacter pylori* 1043. *Mol. Cells* 35, 158–165 (2013).
 107. Narasimhan, G. *et al.* Mining protein sequences for motifs. *J. Comput. Biol.* 9, 707–720 (2002).
 108. Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 80 148–157 (2015).
 109. Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1528–1535 (2007).
 110. Chen, W. *et al.* Intramolecular Disulfide Bond between Catalytic Cysteines in an Intein Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2500–2503 (2012).
 111. Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. & Selvin, P. R. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry 1. <http://www.idealibrary.com> (1999).
 112. Lees, W. J. & Whitesides, G. M. Equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions: a coherent, corrected set. *J. Org. Chem.* 58, 642–647 (1993).

113. Donczew, R. *et al.* The atypical response regulator HP1021 controls formation of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex. *Mol. Microbiol.* 95, 297–312 (2015).
114. Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y. & Gouaux, E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437, 215–223 (2005).
115. Page, M. J. & Di Cera, E. Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. *Physiological Reviews* vol. 86 1049–1092 (2006).
116. Klug, A. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 213–231 (2010).
117. Cassandri, M. *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell death Discov.* 3, 17071 (2017).
118. Kocyla, A., Pomorski, A. & Krężel, A. Molar absorption coefficients and stability constants of Zincon metal complexes for determination of metal ions and bioinorganic applications. *J. Inorg. Biochem.* 176, 53–65 (2017).
119. Trzaskowski, B., Adamowicz, L. & Deymier, P. A. A theoretical study of zinc(II) interactions with amino acid models and peptide fragments. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 133–137 (2008).
120. Zawilak-Pawlik, A. *et al.* Establishment of serine protease htrA mutants in *Helicobacter pylori* is associated with secA mutations. *Sci. Rep.* 9, 1–13 (2019).
121. Pellicciari, S., Vannini, A., Roncarati, D. & Danielli, A. The allosteric behavior of Fur mediates oxidative stress signal transduction in *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol.* 6, 840 (2015).
122. Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I. & Sastre, J. Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 104 75–103 (2017).
123. Gobert, A. P. & Wilson, K. T. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: A blessing in disguise. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 105 16–27 (2017).
124. Gobert, A. P. & Wilson, K. T. The Immune Battle against *Helicobacter pylori* Infection: NO Offense. *Trends in Microbiology* vol. 24 366–376 (2016).
125. Gobert, A. P. & Wilson, K. T. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: A blessing in disguise. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 105 16–27 (2017).

126. Linz, B. *et al.* A mutation burst during the acute phase of *Helicobacter pylori* infection in humans and rhesus macaques. *Nat. Commun.* 5, 4165 (2014).
127. Flint, A., Stintzi, A. & Saraiva, L. M. Oxidative and nitrosative stress defences of *Helicobacter* and *Campylobacter* species that counteract mammalian immunity. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 40 938–960 (2016).
128. Wang, Y., Yang, J. & Yi, J. Redox sensing by proteins: Oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 16 649–657 (2012).
129. Marino, S. M. & Gladyshev, V. N. Cysteine Function Governs Its Conservation and Degeneration and Restricts Its Utilization on Protein Surfaces. *J. Mol. Biol.* 404, 902–916 (2010).
130. Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. in *Drug Metabolism Reviews* vol. 32 307–326 (Drug Metab Rev, 2000).
131. Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M. & Laville, E. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.* 73, 536–543 (2006).
132. Beckman, J. S., Chen, J. u. n., Ischiropoulos, H. & Crow, J. P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 233, 229–240 (1994).
133. Ischiropoulos, H. & Al-Mehdi, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* 364, 279–282 (1995).
134. Berlett, B. S., Friguet, B., Yim, M. B., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylation: Relevance to signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1776–1780 (1996).
135. Tien, M., Berlett, B. S., Levine, R. L., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7809–7814 (1999).
136. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 6 150–166 (2005).
137. Chen, H. *et al.* A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with

- one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 3, (2008).
138. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. Zinc through the Three Domains of Life research articles. *J. Proteome Res.* 3173–3178 (2006).
 139. Ahn, B. E. & Baker, T. A. Oxidization without substrate unfolding triggers proteolysis of the peroxide-sensor, PerR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E23–E31 (2016).
 140. Windle, H. J., Fox, Á., Eidhin, D. N. & Kelleher, D. The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 275, 5081–5089 (2000).
 141. Tu, I. F. *et al.* Lon Protease Affects the RdxA Nitroreductase Activity and Metronidazole Susceptibility in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 19, 356–366 (2014).
 142. Tegtmeyer, N. *et al.* Characterisation of worldwide *Helicobacter pylori* strains reveals genetic conservation and essentiality of serine protease HtrA. *Mol. Microbiol.* 99, 925–944 (2016).
 143. Zarzecka, U., Harrer, A., Zawilak-Pawlik, A., Skórko-Glonek, J. & Backert, S. Chaperone activity of serine protease HtrA of *Helicobacter pylori* as a crucial survival factor under stress conditions. *Cell Commun. Signal.* 17, 161 (2019).
 144. Bæk, K. T., Vegge, C. S., Skórko-Glonek, J. & Brøndsted, L. Different Contributions of HtrA Protease and Chaperone Activities to *Campylobacter jejuni* Stress Tolerance and Physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 57–66 (2011).
 145. Zarzecka, U. *et al.* Properties of the HtrA Protease From Bacterium *Helicobacter pylori* Whose Activity Is Indispensable for Growth Under Stress Conditions. *Front. Microbiol.* 10, (2019).
 146. Vannini, A. *et al.* Comprehensive mapping of the *Helicobacter pylori* NikR regulon provides new insights in bacterial nickel responses. *Sci. Rep.* 7, (2017).
 147. Muller, C. *et al.* Hierarchical regulation of the NikR-mediated nickel response in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research* vol. 39 7564–7575 (2011).
 148. Psakis, G. *et al.* The sodium-dependent D-glucose transport protein of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 71, 391–403 (2009).
 149. Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L. & Mégraud, F. Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 642–674 (1999).
 150. Park, S. A., Ko, A. & Lee, N. G. Stimulation of growth of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* by atmospheric level of oxygen under high carbon dioxide tension. *BMC Microbiol.* 11, 96 (2011).

151. Ge, X. *et al.* Bifunctional Enzyme spot Is Involved in Biofilm Formation of *Helicobacter pylori* with Multidrug Resistance by Upregulating Efflux Pump Hp1174 (glup). *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, (2018).
152. Muller, C. *et al.* Hierarchical regulation of the NikR-mediated nickel response in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research* vol. 39 7564–7575 (2011).
153. Ernst, F. D. *et al.* NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect. Immun.* 74, 6821–6828 (2006).
154. Hwang, S., Zhang, Q., Ryu, S. & Jeon, B. Transcriptional regulation of the cmeABC multidrug efflux pump and the KatA catalase by cosR in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 194, 6883–6891 (2012).
155. Garénaux, A. *et al.* Role of the Cj1371 periplasmic protein and the Cj0355c two-component regulator in the *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 response to oxidative stress caused by paraquat. *Res. Microbiol.* 159, 718–726 (2008).
156. Hwang, S., Kim, M., Ryu, S. & Jeon, B. Regulation of oxidative stress response by CosR, an essential response regulator in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 6, (2011).
157. Dubbs, J. M. & Mongkolsuk, S. Peroxide-Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria. in *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* 587–602 (John Wiley & Sons, Inc., 2016). doi:10.1002/9781119004813.ch56.
158. Butcher, J., Handley, R. A., van Vliet, A. H. M. & Stintzi, A. Refined analysis of the *Campylobacter jejuni* iron-dependent/independent Fur- and PerR-transcriptomes. *BMC Genomics* 16, 498 (2015).
159. Kim, M., Hwang, S., Ryu, S. & Jeon, B. Regulation of perR expression by iron and PerR in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 193, 6171–8 (2011).
160. Palyada, K. *et al.* Characterization of the oxidative stress stimulon and PerR regulon of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics* 10, 481 (2009).

Wykaz skrótów:

AMS - Kwas 4-acetamido-4'-maleimidyllostilbene-2,2'-disulfonowy

APS – Nadsiarczan amonu

BCIP - Fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu

β -MeOH – Betamerkaptoetanol

CV – Objętość kolumny

DNA - Kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA – Wersenian disodu

EMSA – Metoda opóźnionej migracji w żelu poliakrylamidowym

FAM – 6-karboksyfluoresceina

IPTG - Izopropyl β -D-1-tiogalaktopiranozyd

NADPH - Fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NBT – Błękit nitrotetrazolowy

pz – Pary zasad

RNA - Kwas rybonukleinowy

RNS – Reaktywne formy azotu

ROS – Reaktywne formy tlenu

SDS – Dodecylosiarczan sodowy

SPR – Powierzchniowy rezonans plazmonów

TCA – Kwas trójchlorooctowy

TCE - 2,2,2-Trichloroetanol

TEMED - N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina

8 Spis tabel

Tab. 1. Reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNS).....	11
Tab. 2. Szczepy <i>E. coli</i> wykorzystywane w pracy doktorskiej.....	23
Tab. 3. Szczepy <i>H. pylori</i> wykorzystywane w pracy doktorskiej.....	23
Tab. 4. Wektory wykorzystywane w pracy doktorskiej.....	24
Tab. 5. Oligonukleotydy stosowane w pracy doktorskiej.....	26
Tab. 6. Bufory i roztwory.....	28
Tab. 7. Podłoża mikrobiologiczne	29
Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR (na 50 μ l).	34
Tab. 9. Skład żelu rozdzielającego (5 ml).	39
Tab. 10. Skład żelu zagęszczającego.....	40
Tab. 11. Roztwory wykorzystywane w technice Western Blotting.....	41
Tab. 12. Roztwory do izolacji białek rekombinowanych.	43
Tab. 13. Roztwory wykorzystywane w metodzie EMSA.	43
Tab. 14. Przygotowanie fragmentów DNA stosowanych w SPR.....	44
Tab. 15. Bufory SPR.....	45
Tab. 16. Bufor AMS.	46
Tab. 17. Geny badane w analizie RT-qPCR, znajdujące się przypuszczalnie w regulonie białka HP1021, wyznaczone na podstawie opublikowanych danych ⁴¹	92
Tab. 18. Zmiana transkrypcji genów pod wpływem stresu oksydacyjnego w szczepach N6, N6 Δ HP1021, N6HP1021 Δ cys i N6 Δ HP1021com. Krotność (FC, ang. fold change) określa wzrost lub spadek transkrypcji genów w stresie oksydacyjnym (T20) w porównaniu do szczepu dzikiego w warunkach mikroaerofilnych (T0). Odchylenie standardowe (OS) podane dla wartości uzyskanych w reakcji qPCR na matrycy cDNA przygotowanego z RNA izolowanego z 3 hodowli bakteryjnych. Pogrubioną czcionką zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności ($p \leq 0,05$), liczone w stosunku do wartości otrzymanych dla N6 T0. Wartości istotności przedstawione w Tab. 19.	93
Tab. 19. Wartość istotności statystycznej wyników RT-qPCR wyliczona na podstawie testu t-Studenta. Niebieskim tłem zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$, liczone w stosunku do wartości otrzymanych dla N6 T0. NO, nie oznaczono	94
Tab. 20. Wartość istotności statystycznej wyników RT-qPCR wyliczona na podstawie testu t-Studenta. Niebieskim tłem zaznaczono wyniki istotne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$, liczone w stosunku do wartości otrzymanych w warunkach T0 każdego z badanych szczepów.	94

9 Spis Rysunków

Rys. 1. Schemat działania wybranych czynników stresowych na <i>H. pylori</i> w miejscu bytowania. Opis w tekście.	12
Rys. 2. Wybrane mechanizmy regulacji <i>ArsRS/NikR/Fur</i> w odpowiedzi na niskie pH. Opis schematu znajduje się w rozdziałach 1.4.1 i 1.4.2. ^{48,49}	15
Rys. 3. (A) Mechanizm aktywacji białka <i>SoxR</i> i <i>SoxS</i> . Utlenienie białka <i>SoxR</i> powoduje zmianę jego konformacji. Tylko utlenione białko <i>SoxR</i> aktywują transkrypcję genu <i>soxS</i> . (B) Aktywacja genu <i>soxS</i> poprzez białko <i>SoxR</i> . Aktywacja transkrypcji przez utlenione białko <i>SoxR</i> prowadzi do aktywacji transkrypcji kolejnych genów. Na podstawie: ⁸²	19
Rys. 4. Mechanizm aktywacji białka <i>OxyR</i> . Obecność nadtlenu wodoru powoduje utworzenie mostków disiarczkowych prowadząc do związania białka <i>OxyR</i> do regionów promotorowych docelowych genów i aktywację transkrypcji. Na podstawie: ⁸²	20
Rys. 5. Sekwencja aminokwasowa białka <i>HP1021</i> . Kolorem żółtym zaznaczono występujące w białku reszty cystein. Kolorem czerwonym oznaczono motyw <i>HTH</i> wiążący DNA. Motyw <i>HTH</i> przewidziano wykorzystując program <i>Gym 2.0</i> ¹⁰⁷ .	48
Rys. 6. Przewidywana struktura białka <i>HP1021</i> otrzymana przy użyciu programu <i>Phyre2</i> . Analiza modelu wskazuje na dwudomenową budowę białka <i>HP1021</i> . Domena N-końcowa połączona jest z domeną C-końcową za pośrednictwem alfa-helisy, co zapewnia prawdopodobnie ruchliwość domen względem siebie. Kolorem żółtym zaznaczone są występujące w białku reszty cysteinowe (<i>C27</i> , <i>C51</i> , <i>C56</i> , <i>C216</i> , <i>C238</i> oraz <i>C270</i>). Motyw <i>HTH</i> , oznaczony na czerwono, znajduje się w domenie C-końcowej (Rys. 1).	48
Rys. 7. Znakowanie białka <i>HP1021</i> odczynnikami <i>AMS</i> <i>in vivo</i> . Hodowlę bakteryjną poddano działaniu tlenu atmosferycznego i pobierano próbki w czasie stresu (szczep <i>N6</i> : po 5 i 60 minutach; szczep <i>26695</i> : po 5, 10 i 60 minutach), a następnie przeniesiono do warunków mikroaerofilnych na czas 3 godzin. Próbkę z <i>DTT</i> służyła kontroli w celu utrzymania warunków redukujących środowiska (odczynnika <i>DTT</i> dodano do hodowli kontrolnej przed szokiem oksydacyjnym).	49
Rys. 8. Analiza etapów oczyszczania białka <i>HP1021</i> . Białko o przewidywanej masie 36,7 kDa izolowano z komórek <i>E. coli</i> <i>BL21</i> niosących plazmid <i>pET28a(+)</i> <i>NstrepHP1021</i> ; analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu <i>SDS-PAGE</i> zawierającym <i>TCE</i> , żel wizualizowano z wykorzystaniem metody <i>StainFree</i> oraz urządzenia <i>GelDoc</i> . Wzorzec mas cząsteczkowych – <i>Pierce Unstained protein MW Marker</i> nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją <i>IPTG</i> ; Indukowane – lizat komórek po indukcji <i>IPTG</i> ; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożę; Elucja 2-6 - frakcje eluowane z kolumny buforem z <i>destiobiotyną</i> ; strzałką zaznaczono rekombinowane białko <i>HP1021</i> .	52
Rys. 9. Analiza trawienia genu <i>HP1021DC</i> zamplifikowanego z użyciem starterów <i>P53</i> i <i>P54</i> na matrycy <i>pET28a(+)</i> <i>NstrepHP1021DC</i> . Do trawienia wykorzystano enzymy <i>BamHI</i> oraz <i>Ascl</i> ze względu na wprowadzone miejsca restrykcyjne podczas mutacji. <i>M</i> , wzorzec mas cząsteczkowych <i>Lambda/PstI</i> [pz]; 1,2, reakcja trawienia amplikonów <i>HP1021DC</i> , powstałych na matrycy dwóch różnych klonów <i>E. coli</i> niosących plazmid <i>pET28a(+)</i> <i>NstrepHP1021DC</i> . Strzałkami z prawej strony oznaczono spodziewane wysokości produktów trawienia. Prążek DNA widoczny powyżej 829 pz jest niedotrawionym substratem reakcji trawienia.	53
Rys. 10. Analiza etapów izolacji białka <i>HP1021DC</i> . Białko o masie około 36 kDa izolowano z komórek <i>E. coli</i> <i>BL21</i> <i>pET28HPNStrep1021DC</i> ; analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu <i>SDS-PAGE</i> zawierającym <i>TCE</i> , żel wizualizowano z wykorzystaniem metody <i>StainFree</i> oraz urządzenia <i>GelDoc</i> . Wzorzec mas cząsteczkowych – <i>Pierce Unstained protein MW Marker</i> nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją <i>IPTG</i> ; Indukowane – lizat komórek po indukcji <i>IPTG</i> ; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożę; Elucja 2-6 - frakcje eluowane z kolumny buforem z <i>destiobiotyną</i> ; strzałką zaznaczono rekombinowane białko <i>HP1021DC</i> .	54
Rys. 11. Analiza redukcji białka <i>HP1021</i> przez czynniki redukujące <i>DTT</i> i <i>TCEP</i> . Rozdział elektroforetyczny <i>SDS-PAGE</i> w żelu 10% z dodatkiem <i>TCE</i> . Ścieżka 1 – <i>Marker mas cząsteczkowych</i> ; <i>Pierce Unstained MW Marker</i> nr. kat. 26610 Ścieżka 2 – białko <i>HP1021</i> nietraktowane czynnikiem redukującym; Ścieżki 3-9 – białko <i>HP1021</i> traktowane czynnikiem redukującym zgodnie z opisem nad żelem.	55
Rys. 12. Sekwencja <i>oriC2</i> z zaznaczonymi bokсами wiżanymi przez białko <i>HP1021</i> . Na podstawie ⁴⁰ .	57
Rys. 13. Opóźniona migracja regionu <i>FAM-oriC2</i> związanego z białkiem <i>HP1021</i> w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.	57

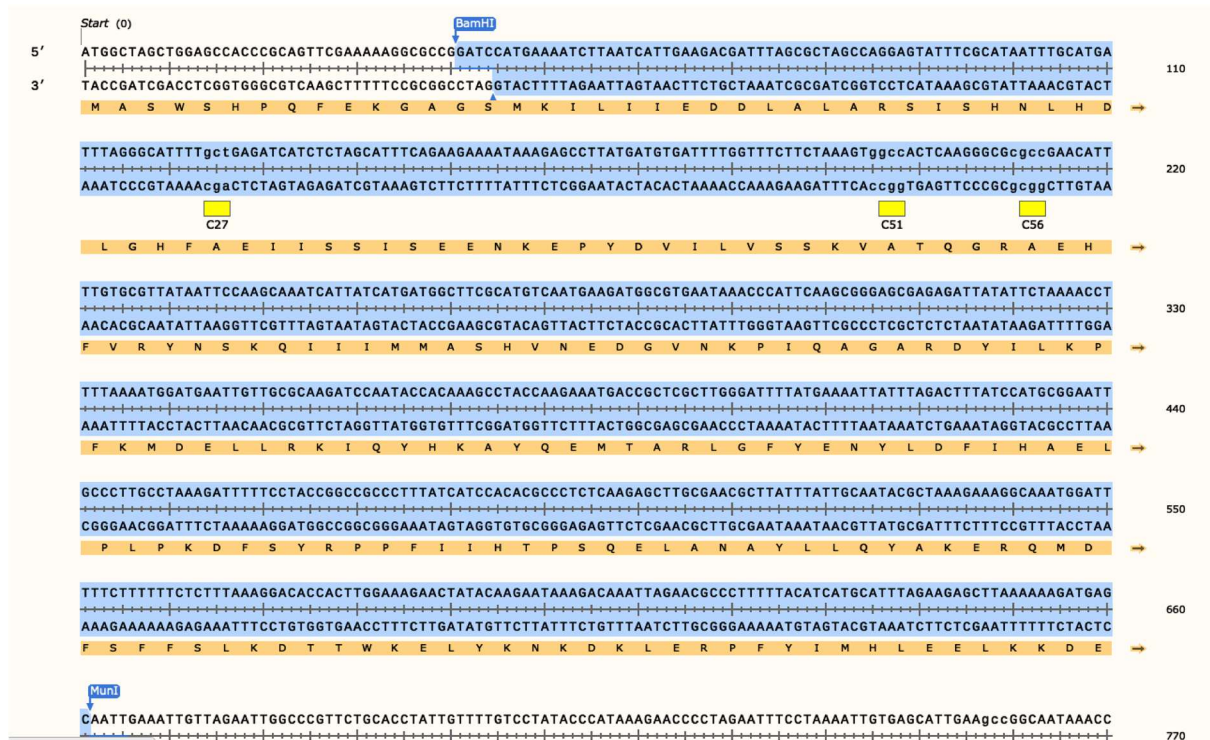
Rys. 14. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021DC w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.....	58
Rys. 15. Analiza SPR wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko (R) zredukowano 5 mM TCEP.	61
Rys. 16. Analiza wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021DC metodą SPR. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko zredukowano 5 mM TCEP.	62
Rys. 17. Analiza trawienia Ascl genu HP1021NDC zamplifikowanego z użyciem starterów P53 i P54 na matrycy pET28a(+) <i>Nstrep</i> HP1021NDC. Do trawienia wykorzystano enzym Ascl ze względu na wprowadzenie miejsca trawienia dla tego enzymu podczas wprowadzania mutacji w kodonach kodujących reszty cysteinowe C52 i C56. M: wzorzec mas cząsteczkowych λ /PstI [pz]; 1,2, fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR na matrycy dwóch niezależnych klonów zawierających plazmid pET28a(+) <i>HP1021NDC</i> trawione enzymem Ascl; 3, nietrawiony fragment DNA uzyskany na matrycy pET28a(+) <i>Nstrep</i> HP1021. Strzałkami z prawej strony oznaczono spodziewane wielkości produktów trawienia. Prążek DNA widoczny powyżej 851 pz jest niedotrawionym substratem reakcji trawienia.	63
Rys. 18. Analiza izolacji białka HP1021NDC. Białko o masie około 36 kDa izolowano z komórek <i>E. coli</i> BL21 pET28 <i>Nstrep</i> HP1021NDC. Analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu SDS-PAGE zawierającym TCE, żel wizualizowano z wykorzystaniem metody StainFree oraz urządzenia GelDoc (Rozdział 3.9.2). Wzorzec mas cząsteczkowych – Pierce Unstained protein MW Marker nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją IPTG; Indukowane – lizat komórek po indukcji IPTG; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Zawiesina – komórki po dezintegracji z użyciem sonikatora; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożo; Elucja 2-5 - frakcje eluowane z kolumny buforem z destiobiotyną; strzałką zaznaczono rekombinowane białko HP1021NDC.	64
Rys. 19. Analiza trawienia NaeI genu HP1021CDC zamplifikowanego z użyciem starterów P53 i P54 na matrycy pET28a(+) <i>Nstrep</i> HP1021CDC. Do trawienia wykorzystano enzym NaeI ze względu na wprowadzenie miejsca trawienia dla tego enzymu podczas wprowadzania mutacji w kodonie kodującym resztę cysteinową C238. M: wzorzec mas cząsteczkowych λ /PstI [pz]; 1,2: fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR na matrycy dwóch niezależnych klonów zawierających plazmid pET28a(+) <i>HP1021CDC</i> trawione enzymem NaeI ; 3: Nietrawiony fragment DNA uzyskany na matrycy pET28a(+) <i>Nstrep</i> HP1021. Strzałkami z prawej strony oznaczono spodziewane wielkości produktów trawienia. Prążek DNA widoczny powyżej 850 pz jest niedotrawionym substratem reakcji trawienia.	65
Rys. 20. Analiza izolacji białka HP1021CDC. Białko o masie około 36 kDa izolowano z komórek <i>E. coli</i> BL21 pET28 <i>Nstrep</i> HP1021CDC. Analizę otrzymanych frakcji prowadzono w 10% żelu SDS-PAGE zawierającym TCE, żel wizualizowano z wykorzystaniem metody StainFree oraz urządzenia GelDoc (Rozdział 3.9.2). Wzorzec mas cząsteczkowych – Pierce Unstained protein MW Marker nr. kat. 26610; Nieindukowane – lizat komórek przed indukcją IPTG; Indukowane – lizat komórek po indukcji IPTG; Supernatant – frakcja białek rozpuszczalnych po lizie i wirowaniu; Zawiesina – komórki po dezintegracji z użyciem sonikatora; Przed kolumną – frakcja przed nałożeniem na złożo; Elucja 2-5 - frakcje eluowane z kolumny buforem z destiobiotyną; strzałką zaznaczono rekombinowane białko HP1021CDC.....	66
Rys. 21. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021NDC w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.....	67
Rys. 22. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021CDC w 4% żelu poliakrylamidowym. Ścieżka 1: wolny DNA; Ścieżki 2-7: kompleksy białko-DNA.....	68
Rys. 23. Analiza wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021NDC metodą SPR. Kolorem czerwonym opisano wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko zredukowano 5 mM TCEP.	70
Rys. 24. Analiza wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021CDC metodą SPR. Kolorem czerwonym opisano wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Białko zredukowano 5 mM TCEP.	71
Rys. 25. Wiązanie jonów cynku przez białko HP1021 oraz jego warianty. Pomiary wykonywano spektrofotometrycznie przy długości fali 618 nm stosując test konkurencyjny z odczynnikiem Zincon.....	72

Rys. 26. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021 w obecności jonów cynku. Kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym.	74
Rys. 27. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021DC w obecności jonów cynku. Kompleksy rozdzielano w 4% żelu poliakrylamidowym.	75
Rys. 28. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021NDC w obecności jonów cynku w 4% żelu poliakrylamidowym.	76
Rys. 29. Opóźniona migracja regionu FAM-oriC2 związanego z białkiem HP1021CDC w obecności jonów cynku w 4% żelu poliakrylamidowym.	77
Rys. 30. Analiza SPR wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021 w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linia przerywaną oznaczono wiązanie HP1021 z DNA w obecności Zn ²⁺ . Białko zredukowano 5 mM TCEP.	78
Rys. 31. Analiza SPR wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021DC w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linia przerywaną oznaczono dodatek jonów cynku. Białko zredukowano 5 mM TCEP.	79
Rys. 32. Analiza SPR wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021NDC w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linia przerywaną oznaczono dodatek jonów cynku. Białko zredukowano 5 mM TCEP.	80
Rys. 33. Analiza SPR wiązania regionu oriC2 przez białko HP1021NDC w obecności jonów cynku. Kolorem czerwonym zaznaczono wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach redukujących (R), kolorem niebieskim wykresy oddziaływania białka z DNA w warunkach nieredukujących (NR). Linia przerywaną oznaczono dodatek jonów cynku. Białko zredukowano 5 mM TCEP.	81
Rys. 34. Schemat wymiany dzikiego genu HP1021 na gen zmutowany, kodujący białko zawierające reszty alanin w miejscach reszt cystein.	84
Rys. 35. Fragmenty powielone w reakcji PCR, które po oczyszczeniu wykorzystano do przeprowadzenia reakcji OE-PCR HP1021Δcys. M, wzorzec mas cząsteczkowych λ/PstI [pz]; 1, fragment DNA otrzymany na matrycy genomowego DNA szczepu 26695 z wykorzystaniem starterów P33/P36. Spodziewana wielkość 380 pz; 2, fragment DNA otrzymany na matrycy plazmidu pET28a(+)/NstrepHP1021DC z wykorzystaniem starterów P37/P34. Spodziewana wielkość 940 pz; 3, fragment DNA otrzymany na matrycy plazmidu pTZdeltaHP1021 z wykorzystaniem starterów P35/P38. Spodziewana wielkość około 1200 pz.	84
Rys. 36. Fragment DNA powielony w reakcji PCR na matrycy plazmidu pGEM1021Δcysaph-3. Wykorzystano startery P37/P38. Spodziewana wielkość produktu – ok. 2400 pz. M- wzorzec mas cząsteczkowych 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific; 10787018); 1 – Produkt PCR otrzymany na matrycy plazmidu pGEM1021Δcysaph-3.	86
Rys. 37. Przygotowanie szczepu komplementacyjnego N6ΔHP1021com. Schemat wymiany genu oporności na kanamycynę, na gen kodujący białko HP1021 oraz gen oporności na chloramfenikol.	87
Rys. 38. Analiza fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR potwierdzająca obecność genu HP1021 w otrzymanym zmutowanym szczepie komplementacyjnym N6ΔHP1021com. PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów P3/P4 na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego z otrzymanych uprzednio zmutowanych szczepów. Otrzymano produkt o pożądanej wielkości około 897 pz. M - wzorzec mas cząsteczkowych 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific; 10787018); 1,2,3 - fragmenty DNA otrzymane po reakcji PCR uzyskane na matrycy genomowego DNA izolowanego z trzech niezależnych kolonii uzyskanych po transformacji.	87
Rys. 39. Analiza fragmentów DNA uzyskanych w reakcji PCR w celu oceny poprawności wprowadzonego na chromosomie bakteryjnym fragmentu w szczepie komplementacyjnym N6ΔHP1021com. PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów P37/P38 na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego z otrzymanych zmutowanych szczepów (Rys. 37). Otrzymano poprawnej wielkości (około 2200 pz) produkt PCR w przypadku klonów nr 1 i 2. Dodatkowe fragmenty DNA obecne na żelu są prawdopodobnie wynikiem niespecyficzności reakcji PCR. M: wzorzec mas cząsteczkowych 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific; 10787018); 1,2, fragmenty DNA otrzymane w reakcji PCR uzyskane na matrycy genomowego DNA izolowanego z dwóch niezależnych kolonii transformowanych szczepów 3, fragment PCR otrzymany na matrycy genomowego DNA szczepu dzikiego N6 (spodziewana wielkość około 1500 pz).	88

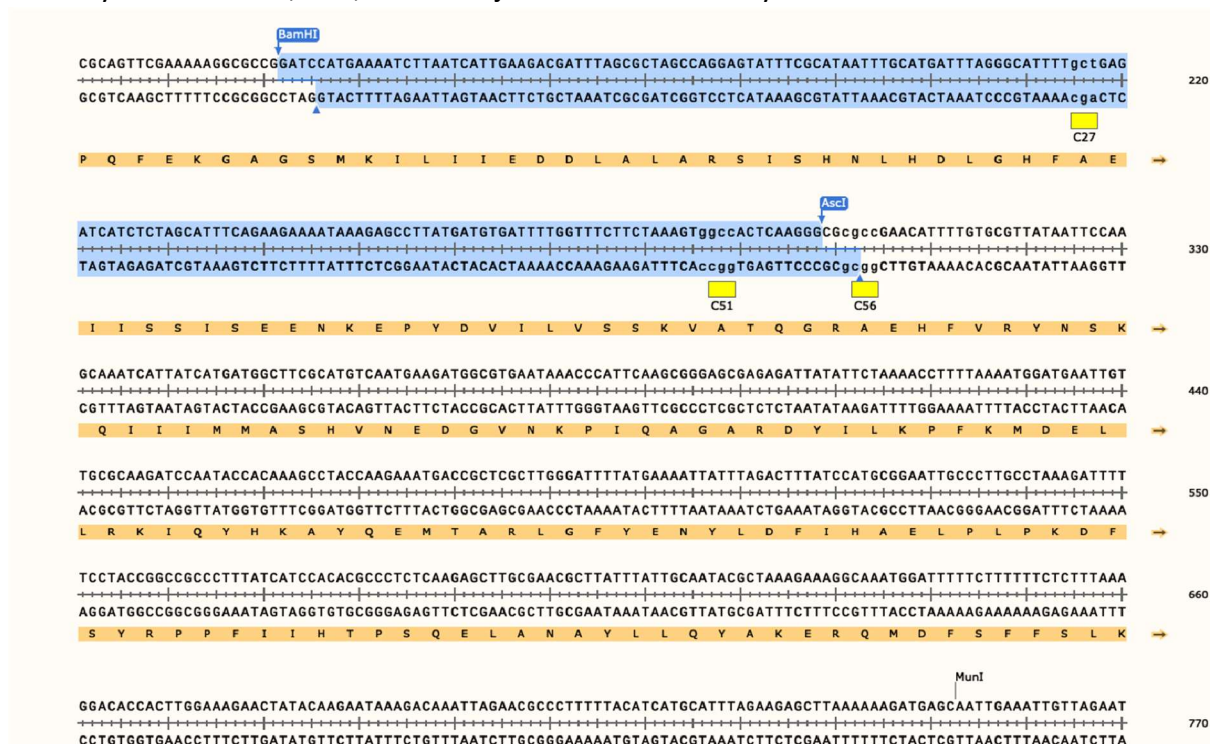
Rys. 40. Analiza syntezy białka HP1021 w szczepach <i>H. pylori</i> metodą Western Blotting. Wykorzystano królicze przeciwciało I-rzędowe anti-HP1021 oraz ośle przeciwciało II-rzędowe skierowane przeciwko króliczym IgG (NA934V, Rozdział 3.3). Reakcję wywołano chemiluminescencyjnie. N6-szczep dziki <i>H. pylori</i> ; N6ΔHP1021-szczep delecyjny genu HP1021; N6ΔHP1021com1, N6ΔHP1021com2 – szczep komplementacyjny genu HP1021.	88
Rys. 41. Krzywe wzrostu hodowli badanych szczepów <i>H. pylori</i> . Hodowlę prowadzono przez okres 42 godzin. OD ₆₀₀ hodowli wszystkich szczepów na początku wynosiło 0,005.	89
Rys. 42. A Przeżywalność <i>H. pylori</i> szczepów N6, N6ΔHP1021, N6HP1021Δcys oraz N6ΔHP1021com w warunkach stresu oksydacyjnego. Płynne hodowle bakteryjne inkubowano przez 6 godzin w różnych warunkach atmosfery (opisane z prawej strony rysunku), następnie przygotowywano seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia hodowli, które wysiewano w objętości 5 μl na podłoże stałe w postaci mini-hodowli. Zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii bakteryjnych na płytkach inkubowanych 3 dni w warunkach mikroaerofilnych. B Mikrobiologiczny test katalazowy. 10 μl hodowli bakteryjnych o takim samym OD ₆₀₀ naniesiono na szkiełko, a następnie dodano 10 μl 30% H ₂ O ₂	91
Rys. 43. Analiza ekspresji genów HP0690 (A), HP1174 (B), HP1400 (C) oraz HP0954 (D) w warunkach mikroaerofilnych (T0) oraz w szoku oksydacyjnym (T20). Otrzymane wyniki porównywano z wynikami dla szczepu dzikiego N6 w czasie T0. Jako gen referencyjny o stałej ekspresji w badanych warunkach wykorzystano gen 16S rRNA.	93

10 Załączniki

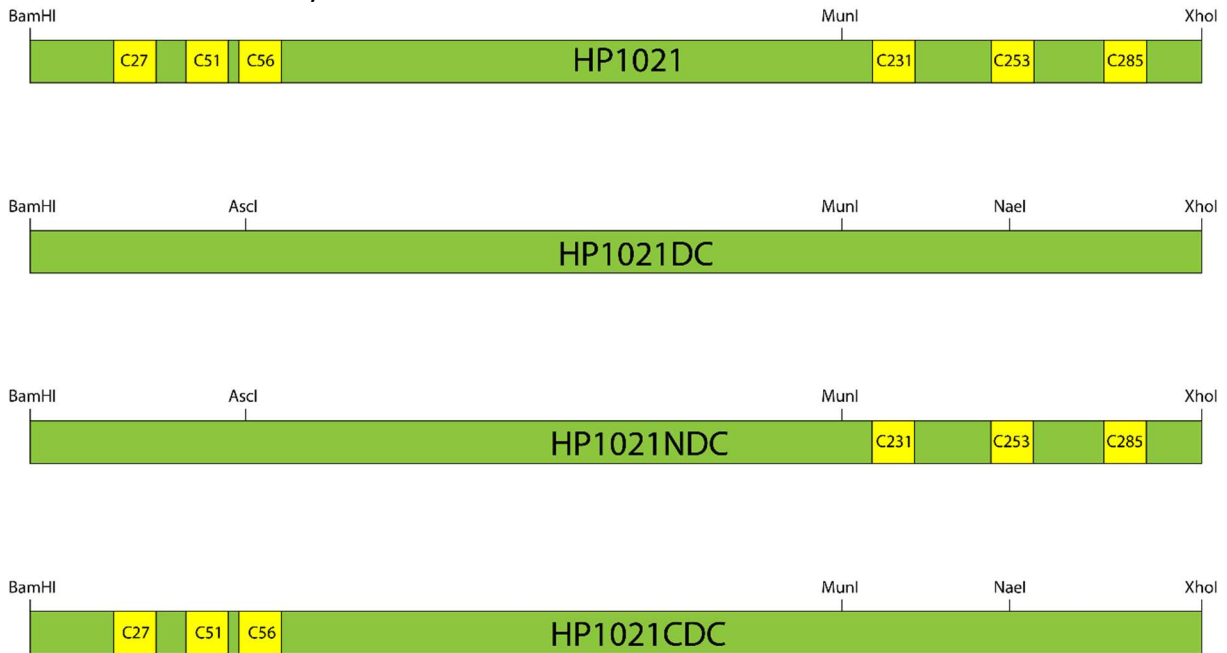
10.1 Załącznik 1. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C27, C51, C56 z miejscami trawienia enzymów BamHI oraz MunI.



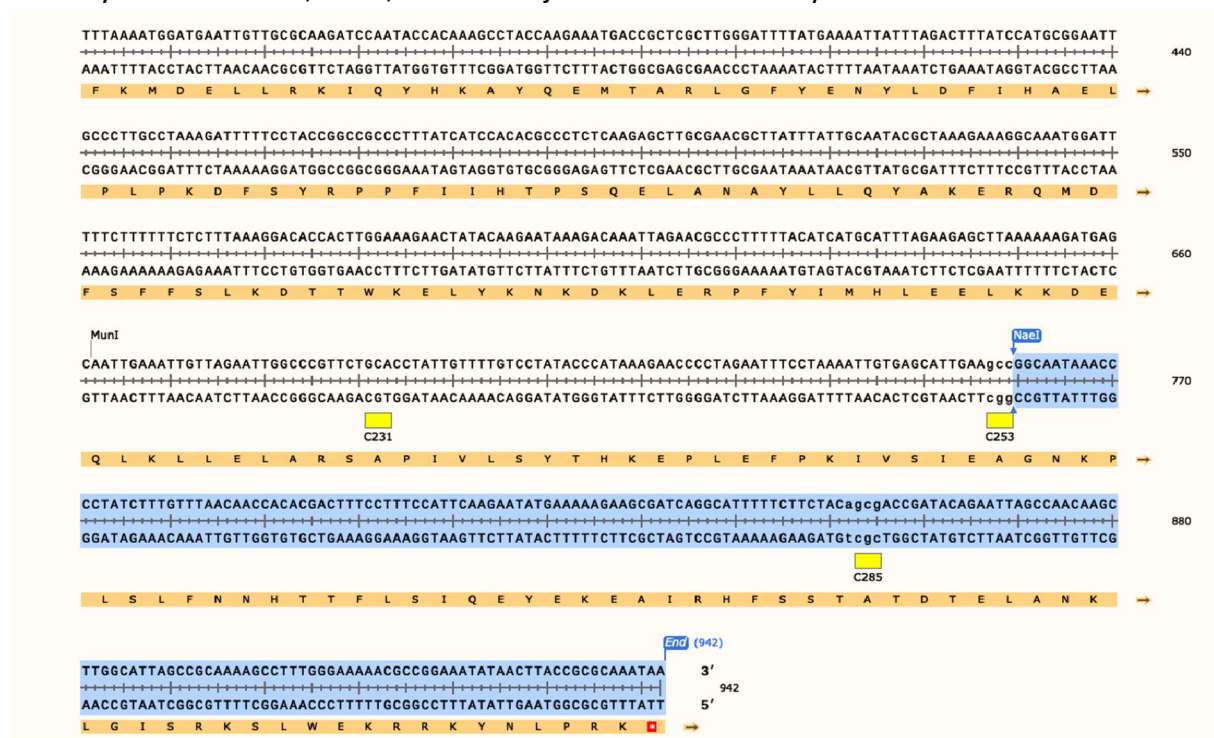
10.2 Załącznik 2. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C27, C51, C56 z miejscami trawienia enzymów BamHI oraz AscI.



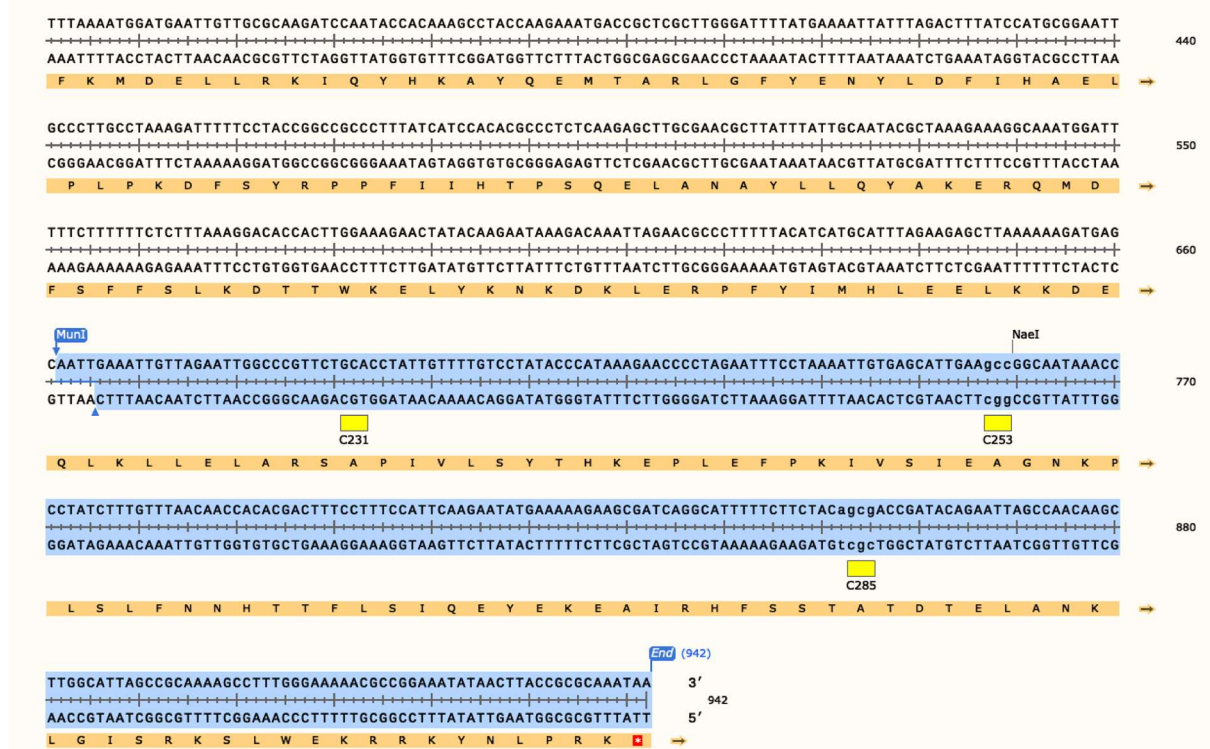
10.3 Załącznik 3. Schemat białka dzikiego HP1021 oraz jego mutein z zaznaczeniem obecności reszt cystein w strukturze białka.



10.4 Załącznik 4. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C231, C253, C285 z miejscami trawienia enzymu NaeI.



10.5 Załącznik 5. Fragment sekwencji genu HP1021 zawierającego zmutowane kodony cysteinowe C231, C253, C285 z miejscami trawienia enzymów Muni oraz NaeI.



10.6 Załącznik 6. A Sekwencja *oriC2* z zaznaczonymi miejscami wiązania białka HP1021 B Sekwencja fragmentu genu *HP0180* (B).

A **Sekwencja *OriC2***

AGGCTTATGAAAAAGCGTTTCATTCACTTCTTTTCAAATCCCACAACCCCCCTAAAACCCACACCTCTAAAG
 CTTTTAT **HP1021 box** TGTTCATTCCATCCATTCACGCCCTACTACT **HP1021 box** GTTACTAATTATTATTAATTAAGT **HP1021 box** GTTACTTATC
 TATAACCTATTTATGACTTTTACTAAACCTTTTTTTAAGCTATAATCCAAAATCTAAAATAAAAAGGAATAAG

B **Sekwencja fragmentu *HP0180***

CTCTATTTTGAAAACCCCTATTTTCAGGCTTTTGGAGTTTTTAGGCTCTAGTTTTATCCACCCCTTTGGATT
 GATTGGTTAGTCCCAGATAGCTTTTTTTCTTATAGCGTGTTTAGAGTGGATAAATTATCGCTAGGGCTTGT
 TTTTTGGCTTGCATTTTTTTGAGCACTAAACCATTGAAAAAATATAG