



**Uniwersytet
Gdański**

Wydział Biologii
Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Patrycja Ambroziak

Translokon SEC jako mediator odpowiedzi
komórki na zaburzenie
pozacytoplazmatycznej homeostazy
u bakterii *Helicobacter pylori*

Translocon SEC as a mediator of the cellular
response to disruption of the extracytoplasmic
homeostasis in the bacterium *Helicobacter pylori*

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. dr hab. Joanna Skórko-Glonek
Promotor pomocniczy: dr inż. Donata Figaj
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej

GDAŃSK 2025

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi,
Pani prof. dr hab. Joannie Skórko-Glonek,
za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki,
ogrom poświęconego czasu, a także cierpliwość, wyrozumiałość i motywację,
dzięki którym możliwe było zrealizowanie niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję również Promotorowi pomocniczemu,
Pani dr inż. Donacie Figaj,
za pomoc w realizacji doświadczeń laboratoryjnych,
codzienne wsparcie i dobre słowo.*

*Serdecznie dziękuję Pracownikom i Doktorantom
Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego
za dzielenie się doświadczeniem
oraz za codzienną życzliwość i atmosferę sprzyjającą pracy.*

Finansowanie

Niniejsza praca powstała dzięki dofinansowaniu udzielonemu przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach grantu NCN OPUS 20, 2020/39/B/NZ2/00359, pt. “Współpraca pomiędzy pozacytoplazmatycznym systemem kontroli jakości białek i translokonem SEC w procesie eksportu białek u bakterii *Helicobacter pylori*” oraz NCN PRELUDIUM 22, 2023/49/N/NZ2/01073, pt. “Wpływ zaburzenia pozacytoplazmatycznej homeostazy na poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC u bakterii *Helicobacter pylori*.”

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE.....	10
1.1. Streszczenie.....	10
1.2. Abstract	12
2. Stosowane skróty	14
3. Wstęp	17
3.1. Systemy sekrecji białek u bakterii Gram-ujemnych	17
3.2. Dwuetapowe systemy sekrecji u bakterii Gram-ujemnych.....	22
3.2.1. System sekrecji typu II (T2SS, ang. <i>Type 2 Secretion System</i>).....	22
3.2.2. System sekrecji typu V (T5SS, ang. <i>Type 5 Secretion System</i>).....	22
3.2.3. System sekrecji typu VIII (T8SS, ang. <i>Type VIII Secretion System</i>)	24
3.2.4. System sekrecji typu IX (T9SS, ang. <i>Type IX Secretion System</i>)	24
3.3. Sekrecja i transport lipoprotein	26
3.4. Proces translokacji białek zależny od systemu SEC	27
3.5. Białko SecA	29
3.5.1. Struktura białka SecA.....	30
3.5.1.1. Budowa, organizacja i funkcja domen w białku SecA	30
3.5.1.2. Stopień oligomeryzacji SecA.....	33
3.5.2. Ligandy białka SecA	34
3.5.3. Mechanizm działania białka SecA	36
3.6. Regulacja poziomu ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC.....	36
3.7. Bakterie <i>Helicobacter pylori</i>	37
3.7.1. System SEC u bakterii <i>H. pylori</i>	39
3.7.2. System Lol u bakterii <i>H. pylori</i>	40
3.7.3. Mechanizmy odpowiedzi na stres u bakterii <i>H. pylori</i>	41
3.7.4. Pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości białek u <i>H. pylori</i>	42
4. Cel pracy	47
5. Materiały.....	48
5.1. Oligonukleotydy.....	48
5.2. Szczepy bakteryjne.....	58
5.3. Plazmidy.....	59
5.4. Enzymy restrykcyjne.....	61
5.5. Podłoża mikrobiologiczne.....	61

5.6. Antybiotyki	63
5.7. Złoża chromatograficzne.....	64
5.8. Peptydy i preparaty białkowe.....	64
5.9. Przeciwciała	64
5.10. Bufory i roztwory	66
5.11. Odczynniki, materiały i aparatura	70
6. Metody	76
6.1. Warunki hodowli bakteryjnych.....	76
6.1.1. Hodowla bakterii <i>E. coli</i>	76
6.1.2. Sporządzanie konserw szczepów <i>E. coli</i>	76
6.1.3. Hodowla <i>H. pylori</i> na podłożu stałym.....	76
6.1.4. Hodowla <i>H. pylori</i> w podłożu płynnym	76
6.1.5. Sporządzanie konserw szczepów <i>H. pylori</i>	77
6.2. Wyznaczenie krzywych wzrostu szczepów <i>H. pylori</i>	77
6.3. Transformacja komórek <i>H. pylori</i>	77
6.4. Transformacja komórek bakteryjnych metodą chlorkową.....	78
6.4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych	78
6.4.2. Transformacja.....	78
6.5. Izolacja plazmidowego DNA	78
6.6. Izolacja genomowego DNA z bakterii <i>H. pylori</i>	79
6.7. Sekwencjonowanie genomu bakterii <i>H. pylori</i>	79
6.8. Sekwencjonowanie DNA	80
6.9. Reakcja PCR (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)	80
6.10. Reakcja PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków - OE-PCR (ang. <i>overlap extension polymerase chain reaction</i>)	81
6.11. Kolonijna reakcja PCR - selekcja mutantów przez analizę PCR przy wykorzystaniu kolonii bakteryjnych	82
6.12. Trawienie DpnI	83
6.13. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	83
6.14. Analiza ekspresji genów <i>H. pylori</i>	84
6.14.1. Izolacja RNA	84
6.14.2. Trawienie DNazą.....	84
6.14.3. Odwrotna transkrypcja	85

6.14.4. Ilościowa reakcja PCR (qPCR ang. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)	86
6.15. Elektroforeza agarozowa DNA	88
6.16. Izolacja DNA z żelu agarozowego	88
6.17. Przygotowanie lizatów bakteryjnych do rozdziłu SDS-PAGE	88
6.18. Jednokierunkowa elektroforeza poliakrylamidowa białek z SDS (SDS-PAGE).....	89
6.19. Zymografia kazeinowa	90
6.20. Barwienie żeli błękitem brylantowym Coomassie.....	90
6.21. Analiza białek metodą immunoblotingu	90
6.22. Nadprodukcja białka SecA w systemie ekspresyjnym <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	91
6.23. Oczyszczanie białka SecA z wykorzystaniem metod chromatograficznych	91
6.23.1. Oczyszczanie metodą metalopowinowactwa na złożu Ni ²⁺ -NTA Agarose w warunkach natywnych	91
6.23.2. Oczyszczanie metodą sączenia molekularnego na złożu Superdex 200	92
6.23.3. Analiza produktów oczyszczania metodą spektrometrii mas.....	93
6.24. Dializa białek	93
6.25. Oznaczanie stężenia białka	93
6.25.1. Metoda czerni amidowej	93
6.25.2. Metoda densytometryczna	94
6.25.3. Metoda Bradford	94
6.26. Analiza struktury białka SecA <i>H. pylori</i>	94
6.26.1. Technika dichroizmu kołowego	94
6.26.1.1. Pomiar widm w dalekim UV far-UV CD	94
6.26.1.2. Oznaczanie stabilności termicznej SecA	95
6.26.2. Oznaczanie stopnia oligomeryzacji metodą ultrawierowania analitycznego	96
6.27. Przygotowanie wielowarstwowych liposomów (MLV, ang. <i>multilammellar vesicles</i>).....	96
6.28. Optymalizacja warunków do oznaczania aktywności ATPazowej.....	97
6.29. Oznaczanie aktywności ATPazowej białka SecA i mutein SecA.....	98
6.30. Analiza powinowactwa białek SecA do liposomów	100
6.31. Zbadanie wpływu mutacji genu <i>secA</i> na fizjologię komórek <i>H. pylori</i>	101
6.31.1. Analiza stopnia oporności szczepów <i>H. pylori</i> na wybrane antybiotyki metodą dyskowo-dyfuzyjną.....	101
6.31.2. Ocena stopnia autoaglutynacji komórek <i>H. pylori</i>	101

6.31.3. Ocena przepuszczalności błony <i>H. pylori</i> zewnętrznej względem dodecylsulfanu sodu (SDS).....	101
6.31.4. Pomiary aktywności γ -glutamylotransferazy (gGT)	102
6.32. Analiza przeżywalności komórek <i>H. pylori</i> w warunkach stresowych	102
7. Wyniki	104
7.1. Uzyskanie preparatów oczyszczonych wariantów SecA	104
7.1.1. Uzyskanie plazmidów ekspresyjnych niosących geny kodujące zmutowane białka SecA.....	104
7.1.2. Uzyskanie preparatów oczyszczonych białek SecA.....	107
7.2. Analiza struktury II-rzędowej białka SecA <i>H. pylori</i>	111
7.2.1. Badanie zmian w strukturze II-rzędowej białka SecA i mutein SecA <i>H. pylori</i>	112
7.2.2. Badanie stabilności termicznej białka SecA i mutein SecA <i>H. pylori</i>	113
7.2.3. Analiza stopnia oligomeryzacji białka SecA i mutein SecA <i>H. pylori</i>	114
7.3. Analiza wiązania białek SecA do liposomów	118
7.4. Oznaczenie aktywności ATPazowej białka SecA i mutein SecA <i>H. pylori</i>	119
7.4.1. Optymalizacja warunków do oznaczania aktywności ATPazowej	120
7.4.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy ATP przez różne warianty białka SecA.....	122
7.5. Konstrukcja szczepów <i>H. pylori</i> zawierających mutacje punktowe w rejonie C-końcowym genu <i>secA</i>	127
7.5.1. Delecja fragmentu C-końcowego genu <i>secA</i> z przerwaniem ciągłości operonu	128
7.5.2. Przywrócenie niezmutowanego genu <i>htrA</i> w szczepach z mutacjami supresorowymi w <i>secA</i>	131
7.5.3. Analiza poziomu białka SecA w zmutowanych szczepach <i>H. pylori</i>	134
7.5.4. Komplementacja <i>secA</i> w miejscu plastyczności	135
7.5.5. Analiza poziomu ekspresji genów <i>secA</i> i <i>lolF</i> w zmutowanych szczepach <i>H. pylori</i>	137
7.5.6. Sekwencjonowanie genomów szczepów <i>H. pylori</i> <i>secAR837K</i> , <i>H. pylori</i> <i>secAC841Y</i> i <i>H. pylori</i> <i>secAC852Y</i>	141
7.6. Zbadanie wpływu mutacji genu <i>secA</i> na fizjologię komórek <i>H. pylori</i>	143
7.6.1. Ocena stopnia autoaglutynacji zmutowanych szczepów <i>secA</i> <i>H. pylori</i>	143
7.6.2. Ocena wrażliwości szczepów <i>H. pylori</i> na niskie stężenia dodecylsulfanu sodu (SDS) – test przeżywalności na podłożu stałym.....	144

7.6.3. Ocena wrażliwości zmutowanych szczepów <i>H. pylori</i> na tetracyklinę i amoksyycynę metodą dyskowo-dyfuzyjną	145
7.6.4. Oznaczanie wydajności sekrecji γ -glutamylotransferazy (gGT) w zmutowanych szczepach <i>H. pylori</i>	147
7.6.5. Analiza poziomu ekspresji genu <i>ggt</i> oraz ilości białka gGT w zmutowanych szczepach <i>H. pylori</i>	148
7.6.6. Analiza poziomu ekspresji genu <i>cagA</i> oraz ilości białka CagA w zmutowanych szczepach <i>H. pylori</i>	150
7.7. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC u <i>H. pylori</i> w odpowiedzi na warunki stresowe	152
7.7.1. Optymalizacja warunków do badania ekspresji genów <i>H. pylori</i> w odpowiedzi na stres	153
7.7.2. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC w odpowiedzi na stres	154
8. Dyskusja.....	157
8.1. Biochemiczna charakterystyka białka SecA <i>H. pylori</i>	158
8.1.1. Analizy strukturalne	161
8.1.2. Analiza aktywności	164
8.2. Wpływ mutacji w genie <i>secA</i> na cechy fenotypowe <i>H. pylori</i>	166
8.3. Wpływ czynników stresogennych na poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC.....	172
9. PODSUMOWANIE.....	176
10. Literatura.....	178

1. STRESZCZENIE

1.1. Streszczenie

Eksport białek z cytoplazmy jest kluczowym procesem u bakterii, zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie komórek, w tym biosyntezę błon, tworzenie struktur powierzchniowych i oddziaływanie z organizmem gospodarza w przypadku szczepów patogennych lub symbiotycznych. Większość białek bakteryjnych przeznaczonych do eksportu poza cytoplazmę jest translokowana przez błonę wewnętrzną za pośrednictwem systemu SEC. System ten składa się z dwóch głównych komponentów: cytoplazmatycznego białka SecA oraz kanału SecYEG w błonie wewnętrznej. SecA pełni podwójną rolę w procesie translokacji: (1) działa jako ATPaza i poprzez hydrolizę ATP dostarcza energii do translokacji substratów białkowych przez kanał SecYEG, (2) uczestniczy w rekrutacji i dostarczaniu substratów białkowych do kanału SecYEG. Funkcjonowanie systemu SEC zostało najlepiej zbadane u modelowej bakterii *Escherichia coli*, natomiast w przypadku *Helicobacter pylori*, jednego z najpowszechniejszych bakteryjnych patogenów człowieka, wiedza w tym zakresie jest ograniczona. Jednym z głównych czynników wirulencji *H. pylori* jest białko HtrA, które stanowi też istotny element pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek u bakterii Gram-ujemnych. Wyniki przeprowadzonych wcześniej badań, dotyczących białka HtrA *H. pylori* wskazały, że letalny efekt braku funkcjonalnej proteazy HtrA u tej bakterii może być suprymowany przez mutacje w C-końcowej części białka SecA. Pozwoliło to postawić hipotezę zakładającą istnienie mechanizmu regulującego funkcjonowanie translokonu SEC w odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny. Mechanizm ten mógłby polegać zarówno na zmianie efektywności działania poszczególnych komponentów SEC jak i na modulacji zawartości składników kompleksu tego translokonu, co może doprowadzić do zmian w tempie eksportu białek z cytoplazmy.

Celem tej pracy doktorskiej była weryfikacja powyższej hipotezy poprzez: (1) biochemiczną charakterystykę białka SecA *H. pylori* i jego wariantów z mutacjami w rejonie C-końcowym, (2) określenie wpływu mutacji w genie *secA* na fenotyp bakterii oraz (3) zbadanie poziomu ekspresji genów kodujących główne elementy systemu SEC w warunkach stresu błonowego i peryplazmatycznego.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono charakterystykę biochemiczną białka SecA *H. pylori*, którego właściwości do tej pory nie były opisane w literaturze. Analizy obejmowały aktywność ATP-azową, właściwości strukturalne białka i jego stabilność termiczną. Uzyskane wyniki pozwoliły na porównanie SecA *H. pylori* z jego homologiem z *E. coli*. Wykazano istotne zmiany w strukturze czwartorzędowej i stabilności cząsteczek: SecA *H. pylori* występował głównie jako monomer, podczas gdy SecA *E. coli* tworzy głównie dimery. Ponadto białko SecA z *H. pylori* charakteryzuje się wyższą stabilnością termiczną niż SecA z *E. coli*. Wyniki te mogą wskazywać na odmienne strategie regulacji funkcjonowania systemu SEC w obu gatunkach. Następnie przeanalizowano fenotypy *H. pylori* z mutacjami *secA* w rejonie kodującym C-końcową domenę SecA. Stwierdzono, że obecność mutacji może wpływać na właściwości powierzchni komórek oraz obniżać ich wrażliwość na antybiotyk tetracyklinę. Szczególnie wyraźne efekty dotyczyły mutacji zaburzających miejsce wiązania metalu (C841Y, C852Y), które prowadziły do podwyższonej aktywności ATP-azowej białka SecA i zwiększonej autoaglutynacji komórek *H. pylori*. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zaburzeń eksportu wydzielanego czynnika wirulencji, białka gGT.

W kolejnym etapie zbadano wpływ czynników stresogennych działających na błony i przestrzeń peryplazmatyczną na ekspresję genów kodujących komponenty translokony SEC. Analizy wykazały zmiany w poziomie transkryptów, szczególnie w przypadku genów *secY*, *secE* i *secG*, kodujących elementy kanału SecYEG.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, że system SEC u *H. pylori* odgrywa istotną rolę w odpowiedzi bakterii na stres błonowy i peryplazmatyczny. Mutacje w genie *secA* wpływają na aktywność katalityczną SecA, zmieniają fenotyp bakterii, a ekspresja genów kodujących komponenty translokony podlega regulacji pod wpływem czynników środowiskowych. Wyniki te potwierdzają przypuszczenie, że modulacja translokacji białek przez system SEC może stanowić element adaptacyjnej odpowiedzi *H. pylori* na stres komórkowy. Równolegle dokonano pierwszej biochemicznej charakterystyki SecA *H. pylori*, ujawniającej różnice w stosunku do homologu z *E. coli*, co podkreśla unikatowe cechy tego patogenu.

1.2. Abstract

Protein export is a key process in bacteria, ensuring proper functioning of cells, including membrane biosynthesis, formation of surface structures, and interactions with the host organism in both pathogenic and symbiotic species. Most bacterial proteins destined for export are translocated from the cytoplasm via the SEC system. This system comprises two main components: the cytoplasmic SecA protein and the SecYEG channel located in the inner membrane. SecA plays a dual role in the translocation process: (1) it acts as an ATPase and, through ATP hydrolysis, provides the energy required for translocating protein substrates across the SecYEG channel, and (2) it participates in the recruitment and delivery of protein substrates to the SecYEG channel. The functioning of the SEC system has been studied most extensively in the model bacterium *Escherichia coli*, whereas in the case of *Helicobacter pylori*, one of the most common bacterial pathogens in humans, knowledge in this respect is limited. One of the major virulence factors of *H. pylori* is the HtrA protein, which is also an important component of the extracytoplasmic protein quality control system in Gram-negative bacteria. Previous studies on *H. pylori* HtrA demonstrated that the lethal effect of the absence of a functional HtrA protease can be suppressed by mutations in the *secA* gene in the region encoding the C-terminal domain of SecA. This observation led to the hypothesis that the activity of the SEC translocon may be regulated in response to extracytoplasmic stress. Such a mechanism could involve both alterations in the efficiency of individual SEC components and modulation of the abundance of translocon components, resulting in changes in the rate of protein export from the cytoplasm.

The aim of this thesis was to verify this hypothesis by (1) performing a biochemical characterization of *H. pylori* SecA and its mutated C-terminal variants, (2) determining the impact of the *secA* mutations on the bacterial phenotype, and (3) analyzing the expression levels of genes encoding major SEC system components under conditions of membrane and periplasmic stress.

The first part of the study involved a biochemical characterization of *H. pylori* SecA, which has not been previously reported in the literature. The analyses included ATPase activity, structural properties, and thermal stability. The results enabled a comparison between *H. pylori* SecA and its *E. coli* homologue. Significant differences

in quaternary structure and molecular stability were observed: *H. pylori* SecA was present mainly as a monomer, whereas *E. coli* SecA predominantly formed dimers. Moreover, *H. pylori* SecA displayed higher thermal stability than its *E. coli* homologue. These findings suggest that the two species employ different strategies to regulate SEC system activity.

Subsequently, the phenotypes of *H. pylori* strains carrying mutations in the C-terminal region of SecA were analyzed. It was found that such mutations can alter cell surface properties and decrease bacterial sensitivity to the antibiotic tetracycline. The most pronounced effects were associated with mutations disrupting the metal-binding site (C841Y, C852Y), which resulted in elevated ATPase activity of SecA and increased autoagglutination of *H. pylori* cells. However, no disturbances in the export of the secreted virulence factor, gGT protein, were observed.

In the next stage, the effect of stress factors targeting the membranes and the periplasmic space on the expression of genes encoding SEC translocon components was examined. The analyses revealed transcriptional changes, particularly for *secY*, *secE*, and *secG*, which encode the structural elements of the SecYEG channel.

In summary, this study demonstrates that the SEC system in *H. pylori* plays an important role in the bacterial response to membrane and periplasmic stress. Mutations in *secA* affect the catalytic activity of SecA and influence bacterial phenotypes, while the expression of genes encoding SEC components is regulated by environmental factors. These findings support the hypothesis that modulation of protein translocation via the SEC system is part of the adaptive response of *H. pylori* to cellular stress. Furthermore, this work provides the first biochemical characterization of *H. pylori* SecA, uncovering significant differences from its *E. coli* homologue and highlighting unique features of this pathogen.

2. Stosowane skróty

- 2HF (ang. *two helix finger*)
- aa - reszta aminokwasowa
- ABC (ang. *ATP-binding cassette transporters*)
- APS (ang. *ammonium persulfate*) - nadsiarczan amonu
- ATP - adenozynt trifosforan
- A_x - absorbancja mierzona przy długości fali x
- BAM (ang. *β -barrel assembly machinery*) - kompleks biorący udział w inkorporacji białek w błonę zewnętrzną
- BHI (ang. *brain heart infusion*)
- BSA (ang. *bovine serum albumin*) - albumina surowicy bydlęcej
- CD (ang. *circular dichroism*) - dichroizm kołowy
- CFU (ang. *colony forming units*) - jednostki tworzące kolonie
- CTT (ang. *C-terminal tail*)
- dNTP - deoksynukleozydo-5'-trifosforan
- DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*) - dimetylosulfotlenek
- DTT (ang. *1,4-dithio-DL-threitol*) - ditiotreitól
- FCS (ang. *fetal calf serum*) - płodowa surowica cielęca
- FLD (ang. *flexible linker domain*)
- GTP – guanozyno-5'-trifosforan
- HSD (ang. *helix scaffold domain*)
- HWD (ang. *helical wing domain*)
- IM (ang. *inner membrane*) - błona wewnętrzna
- IPTG (ang. *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) - izopropyl- β -d-1-tiogalaktopiranozyd
- IRA1 (ang. *intramolecular regulator of ATPase I*)
- k_{kat} - stała katalityczna, liczba cząsteczek substratu przekształcanych przez pojedynczą cząsteczkę enzymu w jednostce czasu
- K_m – stała Michaelisa
- kpz - kilo par zasad
- LH (ang. *linker helix*)
- LPS - lipopolisacharyd

- LUV (ang. *large unilamellar vesicles*)
- MBD (ang. *metal binding domain*)
- MLV (ang. *Multilamellar Vesicles*) - wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe
- mRNA (ang. *messenger RNA*) - matrycowy RNA
- NBD1 (ang. *nucleotide binding domain*)
- NBD2 (ang. *nucleotide binding domain*)
- IRA2 (ang. *intramolecular regulator of ATPase 2*)
- OD_x (ang. *optical density*) - gęstość optyczna mierzona przy długości fali x
- OM (ang. *outer membrane*) - błona zewnętrzna
- OMP (ang. *outer membrane protein*) - białko błony zewnętrznej
- PBS (ang. *phosphate buffered saline*) - roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem
- PCR (ang. *polymerase chain reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy
- PPXD (ang. *preprotein cross-linking domain*)
- PSKJB - pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości białek
- rpm (ang. *revolutions per minute*) – obroty na minutę
- SDS (ang. *sodium dodecyl sulfate*) – dodecylosiarczan sodowy
- SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) - elektroforeza w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem SDS
- SEC (ang. *general secretion pathway*) – system sekrecji białek zależny od translokonu SEC
- SRP (ang. *signal recognition particle*) – cząsteczki rozpoznawające sygnał
- T1SS (ang. *Type I secretion system*) – system sekrecji typu I
- T2SS (ang. *Type II secretion system*) – system sekrecji typu II
- T3SS (ang. *Type III secretion system*) – system sekrecji typu III
- T4SS (ang. *Type IV secretion system*) – system sekrecji typu IV
- T5SS (ang. *Type V secretion system*) – system sekrecji typu V
- T6SS (ang. *Type VI secretion system*) – system sekrecji typu VI
- T8SS (ang. *Type VIII secretion system*) – system sekrecji typu VIII
- T9SS (ang. *Type IX secretion system*) – system sekrecji typu IX
- TAT (ang. *twin arginine translocation*) – system transportu oparty na obecności sekwencji arginin

- TEMED (ang. *N, N, N, N'*-tetramethylethylenediamine) – N, N, N, N'-tetrametylenodiamina
- T_m (ang. *melting temperature*)- temperatura topnienia
- tRNA (ang. *transfer RNA*) – RNA transportujące
- U - jednostka aktywności enzymu
- VAR (ang. *variable region*)
- V_{max} - maksymalna szybkość reakcji

Stosowane skróty nazw reszt aminokwasowych:

- A (Ala) – alanina
- C (Cys) – cysteina
- D (Asp) – kwas asparaginowy
- E (Glu) – kwas glutaminowy
- F (Phe) – fenyloalanina
- G (Gly) – glicyna
- H (His) – histydyna
- I (Ile) – izoleucyna
- M (Met) – metionina
- N (Asn) – asparagina
- P (Pro) – prolina
- Q (Gln) – glutamina
- R (Arg) – arginina
- S (Ser) – seryna
- T (Thr) – treonina
- W (Trp) – tryptofan
- Y (Tyr) – tyrozyna
- V (Val) – walina

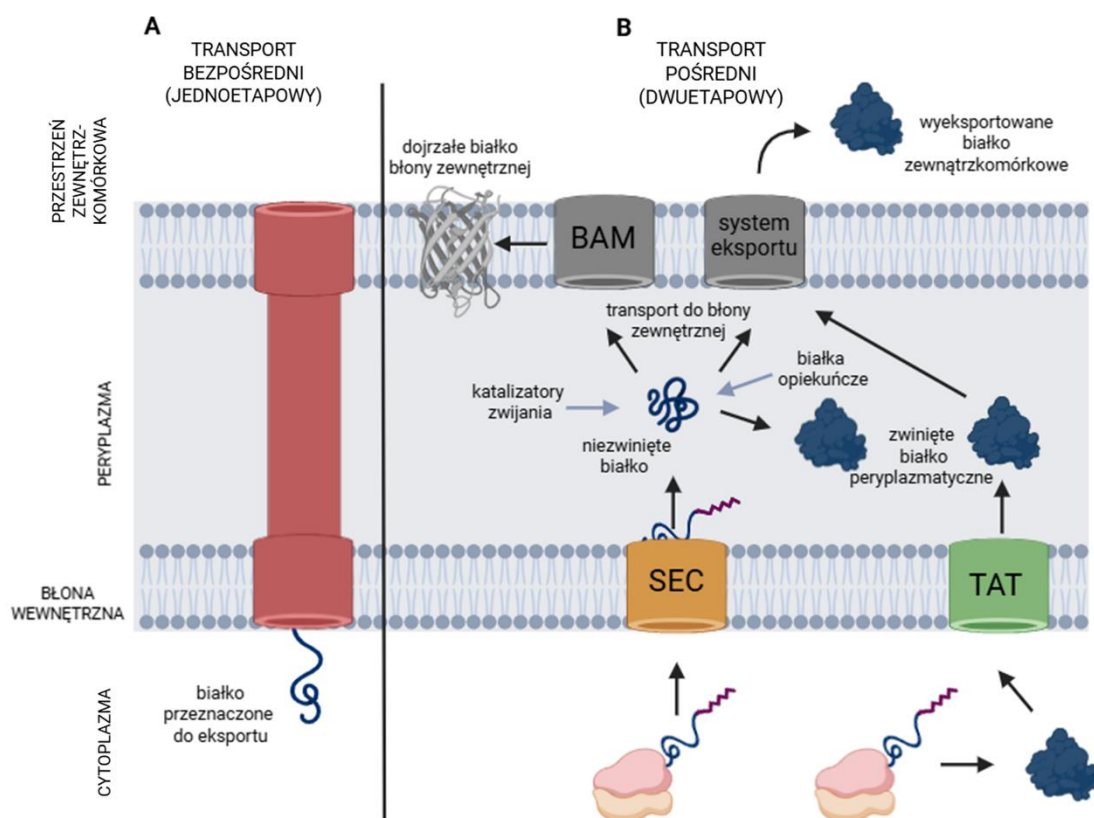
3. Wstęp

3.1. Systemy sekrecji białek u bakterii Gram-ujemnych

Uważa się, że około 30% białek wytwarzanych przez modelową Gram-ujemną bakterię, *Escherichia coli*, jest wydzielanych poza cytoplazmę [1]. Eksport białek jest kluczowym procesem u bakterii, zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie komórek, w tym biosyntezę błon, tworzenie struktur powierzchniowych i odpowiednie oddziaływanie z organizmem gospodarza w przypadku szczepów patogennych lub symbiotycznych [2]. Bakterie Gram-ujemne charakteryzują się złożoną strukturą powłok komórkowych, które obejmują błonę wewnętrzną (cytoplazmatyczną) (IM, ang. *inner membrane*) oraz zewnętrzną (OM, ang. *outer membrane*), które są od siebie oddzielone przestrzenią peryplazmatyczną zawierającą cienką warstwę peptydoglikanu [3]. Ze względu na tak złożoną strukturę bakterie Gram-ujemne wykorzystują dedykowane systemy transportu umożliwiające transport białek z cytoplazmy do błon komórkowych, przestrzeni peryplazmatycznej, środowiska zewnętrznego, a także do komórek gospodarza [2,4]. Wiele z tych systemów odgrywa kluczową rolę w patogenezie, antybiotykooporności czy adaptacji do stresu środowiskowego (Tabela 1). Ze względu na mechanizm, istnieją dwie główne strategie transportu białek u bakterii Gram-ujemnych:

- transport bezpośredni (jednoetapowy) - białka są wydzielane z cytoplazmy bezpośrednio na zewnątrz komórki lub do komórki gospodarza (omijając peryplazmę) przy użyciu dedykowanych systemów sekrecji (np. systemy sekrecji typu 1, 3 lub 4) [5,6] (Rycina 1)
- transport pośredni (dwuetapowy) - białka najpierw transportowane są przez błonę wewnętrzną (przy użyciu systemów SEC lub TAT). Po wnikięciu do peryplazmy rozwinięte białka zyskują natywną strukturę przy pomocy białek opiekuńczych i katalizatorów zwijania. Białka, których ostateczną lokalizacją jest błona zewnętrzna lub środowisko zewnętrzne pozostają w peryplazmie w stanie niezwinionym i są utrzymywane w odpowiedniej konformacji przez peryplazmatyczne białka opiekuńcze, po czym są wbudowywane do błony zewnętrznej przy udziale kompleksu BAM (ang. *β -barrel assembly machinery*) albo eksportowane na zewnątrz komórki przez systemy sekrecji (np. systemy sekrecji typu 2, 5, 8 lub 9) [7,8] (Rycina 1).

Substraty przeznaczone do translokacji przez systemy SEC i TAT zawierają N-końcowe sekwencje sygnałowe, które są odcinane w trakcie lub po translokacji. Główną różnicą między tymi systemami jest stan konformacyjny transportowanego białka - system TAT przenosi substraty w formie zwiniętej, podczas gdy substraty SEC są translokowane w formie rozwiniętej [7].



Rycina 1. Strategie transportu białek u bakterii Gram-ujemnych. **A.** Transport bezpośredni (jednoetapowy) - białka są transportowane z cytoplazmy bezpośrednio na zewnątrz komórki. **B.** Transport pośredni (dwuetapowy) - nowo zsyntetyzowane białka są transportowane przez błonę wewnętrzną do peryplazmy za pomocą systemów SEC (białka niezwinęte) lub TAT (białka zwinięte). W peryplazmie białka niezwinęte zyskują natywną konformację w obecności katalizatorów zwijania. Białka, których ostateczną destynacją jest błona zewnętrzna lub przestrzeń zewnątrzkomórkowa pozostają rozwinięte i są utrzymywane w odpowiedniej konformacji przez peryplazmatyczne białka opiekuńcze, a następnie eksportowane na zewnątrz komórki przez wyspecjalizowane systemy eksportu lub włączane do błony zewnętrznej przez system BAM. Schemat wykonany na podstawie [9].

Najważniejsze systemy sekrecji zidentyfikowane u bakterii Gram-ujemnych to typy od I do VI, a także typy VIII i IX. Przegląd systemów sekrecji białek zidentyfikowanych u bakterii Gram-ujemnych przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Systemy sekrecyjne u bakterii Gram-ujemnych.

Typ	Mechanizm transportu	Blony przekraczane przez substrat podczas sekrecji	Substraty/funkcje	Literatura
Typ I (T1SS, ang. <i>Type I Secretion System</i>)	jednoetapowy kanał transportera ABC (ang. <i>ATP-binding cassette transporters</i>)	błona wewnętrzna i zewnętrzna	toksyny, enzymy	[10,11]
Typ II (T2SS, ang. <i>Type II Secretion System</i>)	dwuetapowy translokacja przez pseudopilus	błona wewnętrzna (SEC/TAT), peryplazma, błona zewnętrzna	zwinięte białka, enzymy, toksyny; bierze udział w pozyskiwaniu składników odżywczych i patogenezie	[12,13]
Typ III (T3SS, ang. <i>Type III Secretion System</i>)	jednoetapowy typ iniekcyjny	błona wewnętrzna, błona zewnętrzna, błona komórki gospodarza	białka efektorowe dla komórek gospodarza; transport czynników wirulencji do komórki gospodarza	[2,14]

Typ IV (T4SS, ang. <i>Type IV Secretion System</i>)	jednoetapowy translokacja za pośrednictwem pilusa przez obie błony	błona wewnętrzna, błona zewnętrzna, błona komórki gospodarza	transfer DNA, białka efektorowe; bierze udział w koniugacji i wirulencji	[15,16]
Typ V (T5SS, ang. <i>Type V Secretion System</i>)	dwuetapowy autotransporter	błona wewnętrzna (SEC), błona zewnętrzna	adhezyny, toksyny, proteazy; sekrecja poprzez kanał w β-baryłce błony zewnętrznej	[17,18]
Typ VI (T6SS, ang. <i>Type VI Secretion System</i>)	jednoetapowy struktura przypominająca kurczliwy ogonek fagowy	błona wewnętrzna, błona zewnętrzna, błona komórki gospodarza	udział w wirulencji, białka efektorowe dla bakterii lub komórek gospodarza, kompetycja między bakteriami,	[19,20]
Typ VIII (T8SS, ang. <i>Type VIII Secretion System</i>)	dwuetapowy sekrecja włókien “amyloidowych”	błona wewnętrzna (SEC), błona zewnętrzna	tworzenie biofilmu, wirulencja i adhezja	[21,22]

Typ IX (T9SS, ang. <i>Type IX Secretion System</i>)	dwuetapowy	błona wewnętrzna (SEC), błona zewnętrzna	czynniki wirulencji, białka motoryczne; występuje u bakterii z typu Bacteroidetes	[23,24]
---	--------------------------	---	---	----------------

3.2. Dwuetapowe systemy sekrecji u bakterii Gram-ujemnych

3.2.1. System sekrecji typu II (T2SS, ang. *Type 2 Secretion System*)

System sekrecji typu II jest złożonym i wielobiałkowym układem składającym się z około 12-15 podstawowych komponentów, które tworzą kompleks obejmujący błonę wewnętrzną, przestrzeń peryplazmatyczną i błonę zewnętrzną komórki bakteryjnej [13,25]. Białka substratowe przeznaczone do translokacji tym systemem są rozpoznawane przez systemy SEC lub TAT dzięki N-końcowym sekwencjom sygnałowym i transportowane do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie uzyskują natywną konformację, zostają rozpoznane przez T2SS i są eksportowane poza komórkę przez błonę zewnętrzną [26]. Pomimo wielu badań dokładny mechanizm molekularny, za pomocą którego białka są wydzielane na zewnątrz komórki, nie jest dokładnie poznany. Białka substratowe nie posiadają charakterystycznych sekwencji sygnałowych kierujących do T2SS a mechanizm ich rozpoznawania jest indywidualny dla każdego substratu i najprawdopodobniej opiera się na motywach strukturalnych [27]. Badania wskazują, że zwinięty substrat oddziałuje z domeną sekretyny, znajdującą się w peryplazmie. Interakcja ta prowadzi do aktywacji ATPazy (GspE) i cofnięcia pseudopilusa, który następnie wypycha substraty przez kanał sekretyny (Rycina 2A) [12].

System sekrecji typu II pełni istotną rolę w fizjologii i wirulencji bakterii Gram-ujemnych. Umożliwia on wydzielanie enzymów rozkładających złożone polimery w środowisku, ułatwiając tym samym pobieranie składników odżywczych i przetrwanie w różnych niszach ekologicznych [28]. Ponadto, wiele bakterii patogennych wykorzystuje ten system do dostarczania toksyn do komórek gospodarza. *Pseudomonas aeruginosa* wykorzystuje ten system sekrecji do wydzielania elastazy (LasB) i egzotoksyny A, enzymów odgrywających kluczową rolę w patogenezie mukowiscydozy a *Vibrio cholerae* wykorzystuje T2SS do eksportu toksyny cholery, kluczowego czynnika w patogenezie cholery [29,30].

3.2.2. System sekrecji typu V (T5SS, ang. *Type 5 Secretion System*)

System sekrecji typu V jest jednym z najpowszechniejszych systemów wydzielniczych u bakterii Gram-ujemnych. Jest uważany za jeden z najprostszych systemów sekrecji ze względu na minimalną liczbę komponentów w porównaniu z większością innych układów sekrecyjnych [18]. System ten jest zlokalizowany jedynie

w błonie zewnętrznej i nie bazuje na typowych źródłach energii do transportu ze względu na brak ATP w peryplazmie i brak stabilnych gradientów jonów w poprzek błony zewnętrznej. W związku z tym, białka przeznaczone do sekrecji tym systemem często nazywane są autotransporterami (AT), co sugeruje całkowicie samowystarczalny system sekrecji [18]. Białka te, w najprostszym przypadku, składają się z jednego łańcucha polipeptydowego zawierającego peptyd sygnałowy umożliwiający transport przez błonę zewnętrzną, domenę “translokatora” (nazywaną też domeną β -baryłki), oraz domeny “pasażera” [31,32]. Prekursory autotransporterów są kierowane do translokacji przez system SEC znajdujący się w błonie zewnętrznej bakterii i przemieszczają się przez peryplazmę do błony zewnętrznej. Następnie, przy udziale kompleksu BAM (ang. *β -barrel assembly machinery*) domena “translokatora” zostaje wbudowana do błony zewnętrznej tworząc strukturę β -baryłki. Przez powstały w ten sposób kanał na powierzchnię komórki zostaje przeniesiona domena “pasażera”. Niektóre transportowane białka są uwalniane do środowiska zewnętrznego, podczas gdy inne pozostają zakotwiczone na powierzchni komórki bakteryjnej (Rycina 2B). Białka wydzielane przez T5SS różnią się wielkością, strukturą i funkcją [31,32].

W zależności od organizacji białek tworzących ten system, T5SS można podzielić na podgrupy określane jako typ Va do Vf. Typ Va to klasyczny i najlepiej zbadany podtyp. Funkcjonuje on jako monomer, a domeny “pasażera” i “translokatora” (β -baryłki) są tworzone odpowiednio przez rejony N i C-końcowe łańcucha polipeptydowego. Typ Vb składa się dwóch łańcuchów polipeptydowych kodowanych w jednym operonie: “translokatora” (TpsB), który zawiera dwie domeny peryplazmatyczne związane z transportem polipeptydów (POTRA ang. *polypeptide transport-associated*) oraz “pasażera” (TpsA). System ten nazywany jest także systemem sekrecji dwóch partnerów (TPS, ang. *Two-Partner Secretion system*). Typ Vc przypomina mechanizmem typ Va, jednak tworzy struktury trimeryczne, w których każda podjednostka zawiera domenę “pasażera” i fragmenty tworzące domenę “translokatora”. Nazywany jest także systemem trójskładnikowych autotransporterów (TAA, ang. *Trimeric Autotransporter adhesins*). Typ Vd łączy cechy typów Va i Vb. Domeny “translokatora” w Vd są podobne do tych w Vb, jednakże w Vd występuje tylko jedna domena POTRA. Domeny “pasażera” w typach Vd i Va różnią się głównie funkcją - te w Vd funkcjonują głównie jako lipazy/esterazy. Następny typ to Ve - funkcjonuje podobnie do typu Va, jednakże z odwróconą organizacją domen (domena “translokatora” na końcu N i domena “pasażera” na końcu C białka).

Niedawno zaproponowano kolejny podtyp - Vf, występujący u bakterii *Helicobacter pylori*. Domena “pasażera” w typie Vf stanowi pozakomórkową, eksponowaną na powierzchni komórki pętlę domeny “translokatora”. Należy zaznaczyć, że ze względu na nietypową topologię Vf jego klasyfikacja jako autotransportera jest kwestionowana [18,33].

Większość substratów przeznaczonych do translokacji przez T5SS to czynniki wirulencji, np.: proteaza immunoglobuliny A odpowiedzialna za degradację przeciwciał gospodarza u *Neisseria gonorrhoeae* lub białko VacA - jeden z głównych czynników wirulencji *H. pylori* [34–36].

3.2.3. System sekrecji typu VIII (T8SS, ang. *Type VIII Secretion System*)

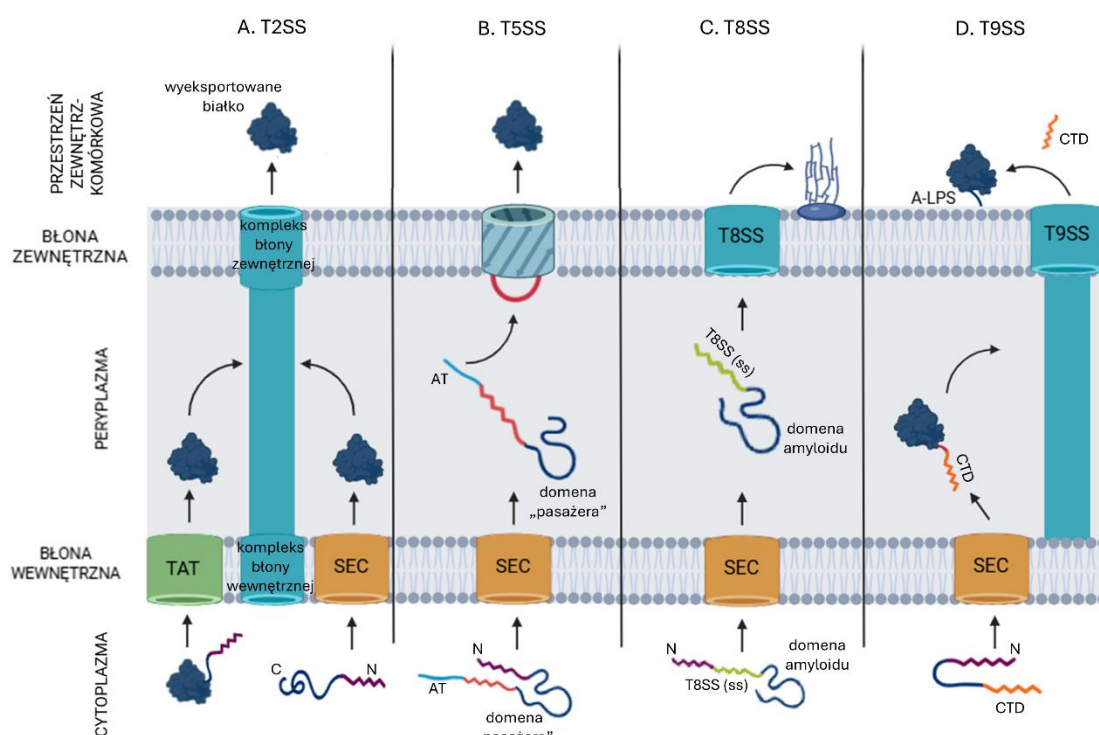
System sekrecji typu VIII jest specyficznym systemem odpowiedzialnym za syntezę i organizację włókien amyloidowych “curli”. Substraty, przeznaczone do sekrecji tym systemem zawierają N-końcowe sekwencje sygnałowe rozpoznawane przez system SEC, który transportuje je przez błonę wewnętrzną. Po dotarciu do przestrzeni peryplazmatycznej są one utrzymywane w formie niezwinionej przez białka opiekuńcze i wydzielane przez kanał T8SS na zewnątrz błony zewnętrznej gdzie łączą się w β -amyloidowe struktury (Rycina 2C) [21].

Struktury “curli” na powierzchni komórki odgrywają istotną rolę w tworzeniu biofilmów, wirulencji i adhezji komórek do powierzchni [21].

3.2.4. System sekrecji typu IX (T9SS, ang. *Type IX Secretion System*)

System sekrecji typu IX to niedawno opisany, wyspecjalizowany mechanizm sekrecji białek występujący wyłącznie w bakteriach z rodzaju *Bacteroidetes*. Substraty przeznaczone do wydzielania tym systemem posiadają N-końcowe sekwencje sygnałowe dla systemu SEC, który transportuje je do przestrzeni peryplazmatycznej. Następnie długa, zachowana ewolucyjnie domena C-końcowa (CTD, ang. *C-terminal domain signals*) kieruje je do kanału T9SS w błonie zewnętrznej, gdzie ulegają translokacji i uzyskują właściwą konformację. Po translokacji domena CTD jest odcinana a wydzielone białko jest zakotwiczone w błonie zewnętrznej przez A-LPS (ang. *anionic lipopolysaccharide*, anionowy lipopolisacharyd, jedna z form LPS zidentyfikowana u niektórych *Bacteroidetes*) (Rycina 2D) [23,24].

Przedstawicielem rodzaju Bacteroidetes jest *Porphyromonas gingivalis*, wykorzystujący ten system między innymi do eksportu czynników wirulencji - gingipain, powodujących uszkodzenia tkanek gospodarza i modulujących odpowiedź immunologiczną gospodarza [37].



Rycina 2. Dwuetapowe systemy sekrecji u bakterii Gram-ujemnych. Białka substratowe przeznaczone do eksportu (kolor ciemnoniebieski) z sekwencjami sygnałowymi na końcach N-terminalnych (kolor fioletowy) są kierowane do systemów translokacyjnych SEC lub TAT, znajdujących się w błonie wewnętrznej. Po translokacji do przestrzeni peryplazmatycznej sekwencje sygnałowe są odcinane, a białka wydzielnicze są eksportowane przy udziale systemów wydzielniczych: **A. T2SS** - białka ulegają zwinięciu w peryplazmie, po czym są transportowane przez kompleks błony wewnętrznej, pseudopilusa i kompleks błony zewnętrznej. **B. T5SS** - domena autotransportera (AT), nazywanego także “translokatorem” (kolor jasnoniebieski) jest wbudowywana do błony zewnętrznej a następnie domena “pasażera” (ciemnoniebieska) jest translokowana przez powstały w ten sposób kanał na zewnątrz komórki, gdzie zyskuje swoją właściwą konformację. Domena “translokatora” i “pasażera” są od siebie oddzielone linkerem (kolor czerwony). **C. T8SS** - domena amyloidu po transporcie do peryplazmy pozostaje rozwinięta, a sekwencja sygnałowa (ss) dla T8SS (kolor zielony) kieruje ją do kanału w błonie zewnętrznej. Białko substratowe zostaje przetransportowane przez błonę zewnętrzną i zakotwiczone w niej tworząc włókna amyloidowe. **D. T9SS** - białko zyskuje swoją ostateczną konformację w peryplazmie i jest kierowane do kanału T9SS przez domenę C-kończową CTD (kolor pomarańczowy). Po translokacji C-kończowa domena (CTD) zostaje odcięta, a białko substratowe pozostaje zakotwiczone w błonie zewnętrznej (OM) dzięki połączeniu z A-LPS. Schemat wykonany na podstawie [9].

3.3. Sekrecja i transport lipoprotein

Lipoproteiny bakteryjne są to globularne białka zakotwiczone w błonie komórkowej za pomocą cząsteczki lipidu. Pełnią one niezmiennie istotne funkcje, między innymi w utrzymaniu właściwej architektury komórki, syntezie i reorganizacji warstwy peptydoglikanu, biogenezie błony zewnętrznej, podziałach komórkowych, odpowiedzi stresowej i wirulencji [38]. System modyfikacji prekursorów lipoprotein, ich sortowania i kierowania do błony zewnętrznej został najlepiej zbadany u *E. coli*. Prekursory lipoprotein zawierają na końcu N peptyd sygnałowy, który wyróżnia je spośród innych eksportowanych białek obecnością sekwencji [LVI][ASTVI][GAS]C, zwanej lipoboksem. Reszta cysteiny w ostatniej pozycji lipoboksu jest ściśle zachowana i staje się ona pierwszą resztą dojrzałego białka po usunięciu peptydu sygnałowego [38,39].

Większość prekursorów lipoprotein opuszcza cytoplazmę systemem SEC [40], a tylko nieliczne wykorzystują system TAT [41]. Po translokacji lipoproteina pozostaje zakotwiczona w błonie wewnętrznej za pomocą swojego N-końcowego peptydu sygnałowego i podlega procesowi dojrzewania, polegającego na kowalencyjnym przyłączeniu trzech łańcuchów acylowych do reszty cysteiny lipoboksu i usunięciu peptydu sygnałowego poprzedzającego acylowaną resztę Cys. Cząsteczki dojrzałych lipoprotein mogą pozostać w błonie wewnętrznej lub są transportowane do błony zewnętrznej. Proces ekstrakcji lipoprotein z błony wewnętrznej i ich transport do błony zewnętrznej zachodzi z udziałem systemu Lol. System ten obejmuje błonowy transporter z rodziny ABC (ang. *ATP binding cassette*), LolCDE, który wydobywa lipoproteiny z błony wewnętrznej kosztem hydrolizy ATP i przenosi je do rozpuszczalnego peryplazmatycznego białka opiekuńczego LolA. Kompleks LolCDE obejmuje heterodimer integralnych białek błony wewnętrznej LolC i LolE oraz homodimer LolD. LolD jest peryferyjnym białkiem zlokalizowanym po stronie cytoplazmatycznej błony wewnętrznej i przeprowadza hydrolizę ATP, dostarczając w ten sposób energię do ekstrakcji lipoprotein z dwuwarstwy lipidowej [42]. Następnie LolA transportuje lipoproteiny przez peryplazmę do LolB, lipoproteiny błony zewnętrznej odpowiedzialnej za wprowadzanie łańcuchów acylowych do dwuwarstwy lipidowej [42]. Sposób, w jaki LolCDE sprzęga hydrolizę ATP, ekstrakcję lipoprotein i dostarczanie ich do LolA, a także mechanizm inkorporacji lipoprotein do błony zewnętrznej przy udziale LolB nie zostały w pełni wyjaśnione.

Opisany powyżej system odpowiedzialny za ekstrakcję dojrzałych lipoprotein z IM i ich transport do OM nie jest uniwersalny dla wszystkich Gram-ujemnych bakterii. LolA jest dobrze zachowane ewolucyjnie, natomiast LolB występuje tylko w γ i β -proteobakteriach, co sugeruje obecność innych mechanizmów pośredniczących we wprowadzaniu lipoprotein do błony zewnętrznej u pozostałych grup bakterii. Geny kodujące LolC i LolE są zachowane tylko w blisko spokrewnionej z *E. coli* podgrupie γ -proteobakterii. Większość proteobakterii koduje tylko jedno homologiczne białko transbłonowe, nazwane LolF, które jest prawdopodobnie przodkiem białek LolC i LolE i zawiera sekwencje aminokwasowe charakterystyczne dla obu tych białek [43].

3.4. Proces translokacji białek zależny od systemu SEC

Większość białek bakteryjnych przeznaczonych do eksportu jest translokowana przez system SEC (około 95% białek funkcjonujących poza cytoplazmą), który przenosi je w formie rozwiniętej, zanim uzyskają swoją natywną strukturę w miejscu docelowym [44,45]. U modelowej bakterii *E. coli* system SEC składa się z dwóch głównych komponentów: cytoplazmatycznego białka SecA oraz kanału SecYEG w błonie wewnętrznej, w skład którego wchodzi białka SecY, SecE i SecG [40,46]. Inne składniki systemu SEC to białko opiekuńcze SecB, które dostarcza białka do SecA w rozwiniętej formie, oraz kompleks błonowy SecDF/YajC, zwiększający wydajność translokacji dzięki wykorzystaniu siły protonomotorycznej [47]. Białko SecA pełni podwójną rolę w procesie translokacji: (1) działa jako ATPaza i poprzez hydrolizę ATP dostarcza energii do translokacji substratów białkowych przez kanał SecYEG, (2) uczestniczy w rekrutacji i dostarczaniu substratów białkowych do kanału SecYEG [46].

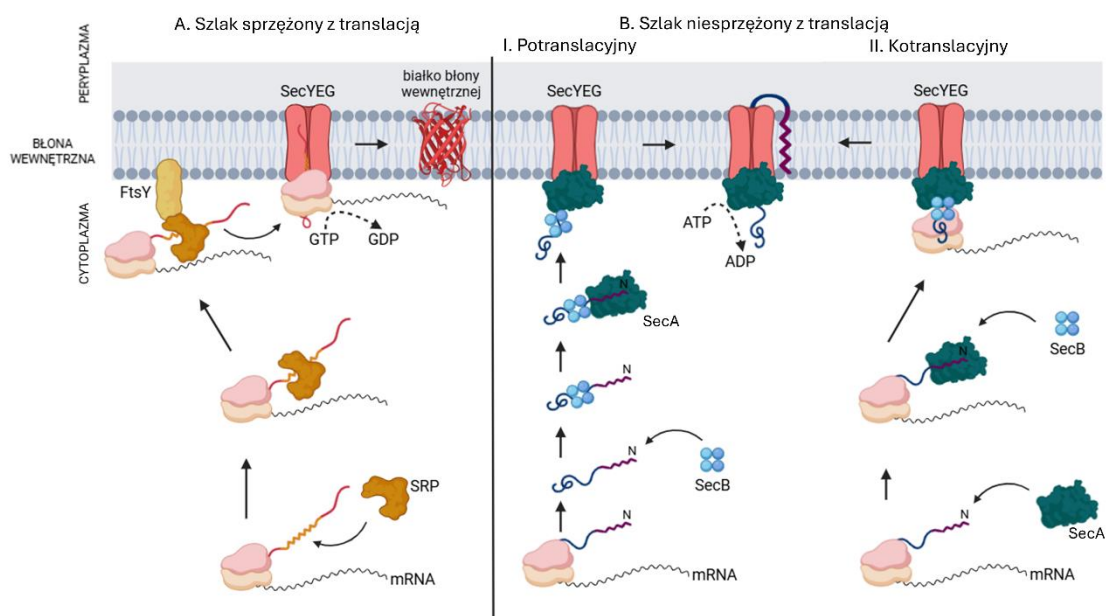
Translokacja substratów białkowych przez kanał SecYEG odbywa się za pośrednictwem dwóch równoległe funkcjonujących szlaków [48–50]. Szlak zależny od SecA transportuje głównie białka błony zewnętrznej (OMPs, ang. *outer membrane proteins*), lipoproteiny, białka peryplazmatyczne oraz białka wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zawierające sekwencję sygnałową na N-końcu i jest zazwyczaj określany jako potranslacyjny [51]. Z kolei białka błony wewnętrznej z sekwencjami sygnałowymi w jednej z ich domen transbłonowych, są translokowane przez szlak

zależny od cząsteczki rozpoznającej sygnał (SRP, ang. *signal recognition particle*), określany jako kotranslacyjny [52–54].

Należy podkreślić, że klasyfikacja na transport potranslacyjny przez SecA i kotranslacyjny przez SRP nie dotyczy wszystkich substratów. Wykazano, że SecA może uczestniczyć również w kotranslacyjnym transporcie niektórych białek (np. RodZ, MBP) [55,56], z kolei SRP może działać potranslacyjnie, jak w przypadku małych białek błonowych (YohP i YkgR) [57].

W szlaku kotranslacyjnym (sprzężonym z translacją) zależnym od SRP, sekwencja sygnałowa syntetyzowanego polipeptydu jest rozpoznawana przez cząsteczkę SRP jeszcze w kanale rybosomu [58,59]. Następnie kompleks SRP-rybosom-polipeptyd wiąże się z zakotwiczonym w błonie wewnętrznej receptorem dla SRP, FtsY [60] i całość zostaje dostarczona do kompleksu SecYEG. Następnie kompleks FtsY–SRP przeprowadza hydrolizę GTP, co umożliwia dalszy przebieg translokacji przez kanał SecYEG (Rycina 3A) [61].

W szlaku potranslacyjnym (niesprzężonym z procesem translacji) zależnym od SecA, nowo powstały polipeptyd jest rozpoznawany przez białko opiekuńcze SecB, które stabilizuje substrat w niezwinionej formie i kieruje go do SecA. Następnie, SecA wiąże się z substratem i wprowadza go do kanału SecYEG w błonie wewnętrznej [46,56]. Po dostarczeniu do SecYEG, translokacja przez kanał napędzana jest hydrolizą ATP przez SecA a kompleks SecDF/YajC wspomaga ten proces [62]. Po przejściu całego łańcucha polipeptydowego przez kanał sekwencja sygnałowa zostaje odcięta przez peptydazę sygnałową, a białko uzyskuje natywną strukturę w miejscu docelowym (Rycina 3BI) [7,51]. Oprócz klasycznego mechanizmu potranslacyjnego zaproponowano również wariant translokacji polipeptydów, określany jako kotranslacyjny niesprzężony z translacją. W tym przypadku synteza białka i jego translokacja nie są ze sobą ściśle powiązane mechanistycznie, lecz syntetyzowany substrat jest dostarczany do kanału SecYEG jeszcze w trakcie translacji na rybosomie. SecA wiąże powstający polipeptyd bezpośrednio przy rybosomie, zanim zostanie on przekazany do SecB (Rycina 3BII) [54,56].



Rycina 3. Schemat transportu białek zależny od SEC. **A.** Szlak sprzężony z translacją - sekwencja sygnałowa (kolor pomarańczowy) nowo syntetyzowanego polipeptydu (kolor czerwony) jest rozpoznawana przez cząsteczkę SRP, a następnie kompleks SRP-rybosom-polipeptyd jest wiązany przez receptor FtsY i dostarczany do kompleksu SecYEG. Procesowi temu towarzyszy hydroliza GTP przez kompleks SRP-FtsY, co umożliwia dalszy przebieg translokacji. **B.** W szlaku niesprężonym z translacją rozpoznawanie substratu i dostarczanie go do kanału SecYEG może nastąpić albo po zakończeniu syntezy białka (**I**), albo w trakcie jego syntezy (**II**). **I.** W wariancie potranslacyjnym białko opiekuńcze SecB wiąże się z substratem przeznaczonym do sekrecji (kolor ciemnoniebieski), a następnie rekrutuje białko SecA. **II.** W wariancie kotranslacyjnym SecA rozpoznaje sekwencję sygnałową (kolor fioletowy) i wiąże się z powstającym na rybosomie polipeptydem, a następnie rekrutuje białko SecB. Po dostarczeniu do kanału SecYEG, ATP-aza SecA napędza translokację przez błonę wewnętrzną poprzez hydrolizę ATP. Schemat wykonany na podstawie [63].

3.5. Białko SecA

SecA jest kluczowym elementem bakteryjnego systemu SEC, odpowiadającym za transport większości białek przez błonę wewnętrzną [64,65]. Gen *secA* został po raz pierwszy zidentyfikowany 40 lat temu w bakterii *E. coli* [64,65]. Pomimo czterech dekad badań nad eksportem białek w bakteriach, wiele aspektów w tej dziedzinie nie zostało do końca wyjaśnionych, a dokładny mechanizm działania SecA wciąż nie jest w pełni zrozumiany.

Obecnie większość informacji na temat mechanizmu działania SecA pochodzi z badań strukturalnych tego białka u modelowej bakterii *E. coli*. Wczesne badania sugerowały, że około połowa całkowitej puli komórkowej SecA znajduje się

w cytoplazmie, a druga połowa jest związana z błoną wewnętrzną [66]. Jednakże, aktualne analizy wskazują, że zdecydowana większość – ponad 90% białka SecA związana jest z błoną komórkową, a pula cytoplazmatyczna jest znacznie mniejsza [67]. Taka lokalizacja odzwierciedla jego centralną rolę w napędzaniu procesu translokacji białek przez kompleks błonowy SecYEG.

Białko SecA nie zostało zidentyfikowane u eukariontów, z wyjątkiem chloroplastów, które posiadają homolog SecA ze względu na ich ewolucyjne pochodzenie [68]. Chociaż system SEC występuje u archeonów i eukariontów, obecność ATPazy SecA jest charakterystyczna tylko dla bakterii. W komórkach eukariotycznych, rolę funkcjonalnego odpowiednika bakteryjnego kompleksu SecYEG pełni kompleks Sec61, działając jednak bez udziału SecA [69]. W związku z tym, ponieważ funkcjonowanie SecA ma zasadnicze znaczenie dla żywotności i wirulencji bakterii, białko to jest uważane za atrakcyjny obiekt badań nad lekami przeciwbakteryjnymi [70,71].

3.5.1. Struktura białka SecA

SecA bakterii *E. coli* jest dużym białkiem złożonym z 901 reszt aminokwasowych (o masie cząsteczkowej 102 kDa), które są zorganizowane w osiem głównych domen (Rycina 4). Dostępnych jest wiele struktur krystalicznych SecA z *E. coli*, jednakże nie obejmują one całej sekwencji aminokwasowej - elastyczne domeny C - końcowe są często nieobecne w modelach lub nieustrukturyzowane [72–75]. Za rdzeń katalityczny, niezbędny do przeżycia bakterii i utrzymania procesu translokacji, uważane są reszty aminokwasowe ~1–832 [73,76,77].

3.5.1.1. Budowa, organizacja i funkcja domen w białku SecA

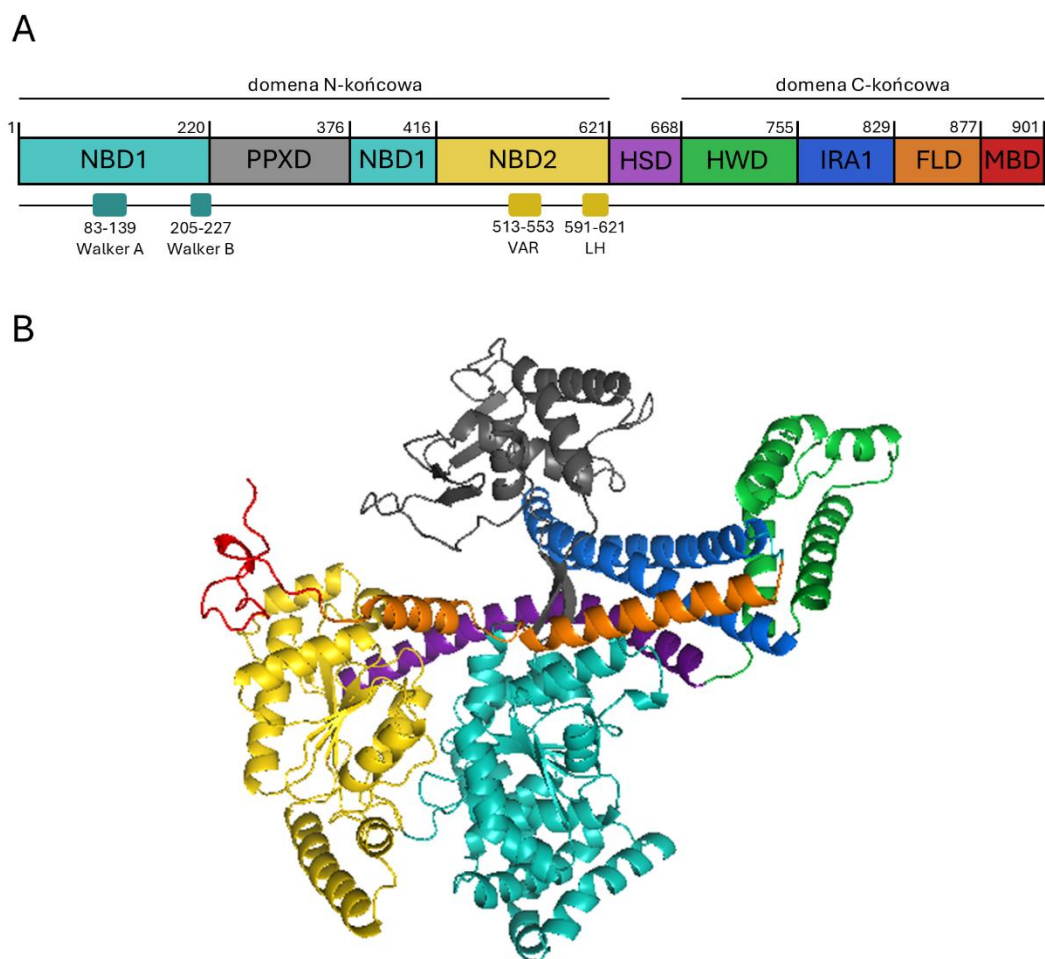
W obrębie części N-końcowej SecA (reszty aminokwasowe: 1-621) wyróżnia się trzy domeny: domenę wiążącą nukleotydy NBD1 (ang. *nucleotide binding domain*), domenę odpowiedzialną za wiązanie prekursorów białek PPXD (ang. *preprotein cross-linking domain*) oraz domenę pełniącą funkcję wewnątrzcząsteczkowego regulatora ATP-azy NBD2 (ang. *nucleotide binding domain*, nazywaną też IRA2, ang. *intramolecular regulator of ATPase 2*) (Rycina 4) [72].

Domeny NBD1 i NBD2 tworzą domenę motoryczną DEAD. Domena ta jest zachowana ewolucyjnie w rodzinie helikaz i enzymów modyfikujących kwasy nukleinowe. Zawiera ona charakterystyczną sekwencję aminokwasową Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) i jest zaangażowana w wiązanie i hydrolizę ATP. Homologia tej sekwencji w SecA umieszcza to białko w nadrodzinie helikaz DExD/H 2 (Asp-Glu-X-His/Asp, gdzie x oznacza dowolny aminokwas) [72,78]. Domena NBD1 zawiera dwa, zachowane ewolucyjnie miejsca wiązania ATP: motywy Walker A i Walker B [79,80]. NBD2 zawiera dwa motywy strukturalne: VAR (ang. *variable region*), częściowo odpowiedzialny za aktywność ATPazową, oraz LH (ang. *linker helix*), który łączy NBD2 z domeną C-kończową [72,81]. NBD2 pełni funkcję regulacyjną, stymulując hydrolizę ATP oraz wymianę nukleotydów w obrębie NBD1 [82]. Domena PPXD jest zakotwiczona w NBD1, gdzie odpowiada za rozpoznawanie i wiązanie białek substratowych oraz uczestniczy w aktywacji aktywności ATP-azowej (Rycina 4) (Tabela 2) [72,83,84].

W obrębie części C-końcowej SecA (reszty aminokwasowe 622-901) wyróżnia się 4 domeny: domenę HSD (ang. *helix scaffold domain*), domenę HWD (ang. *helical wing domain*), domenę pełniącą funkcję wewnątrzcząsteczkowego regulatora ATP-azy IRA1 (ang. *intramolecular regulator of ATPase 1*) oraz domenę C-kończową CTT (ang. *C-terminal tail*) (Rycina 4) [72,85].

HSD jest długą domeną α -helikalną, która łączy wszystkie pozostałe domeny SecA [85]. IRA1 (nazywana też 2HF, ang. *two helix finger*) oddziałuje z białkiem SecY. Interakcja ta ma kluczowe znaczenie dla regulacji aktywności ATPazowej i translokacji polipeptydu [72,86]. Domena CTT dzieli się na dwie mniejsze domeny: FLD (ang. *flexible linker domain*) i MBD (ang. *metal binding domain*) [73,83]. Domena FLD najprawdopodobniej pełni rolę autoinhibicyjną poprzez interakcję z rdzeniem katalitycznym SecA [73]. MBD oddziałuje z białkiem opiekuńczym SecB, fosfolipidami i rybosomami [73,87,88]. Ponadto, w MBD znajduje się zachowany ewolucyjnie motyw cysteinowy CXCX₈C(H/C) (gdzie x oznacza dowolny aminokwas) wiążący metal [46,89]. Obecność jonów metali w tej domenie stabilizuje strukturę SecA i umożliwia skuteczne wiązanie z białkiem opiekuńczym SecB. Wcześniejsze analizy wskazywały, że głównym metalem koordynowanym przez MBD jest cynk, jednak najnowsze badania

sugerują, iż domena ta wiąże żelazo z porównywalnym, a nawet wyższym powinowactwem (Rycina 4) (Tabela 2) [90,91].



Rycina 4. Organizacja domenowa białka SecA. **A.** Domena N-końcowa (reszty aminokwasowe 1-619) składa się z trzech domen: NBD1 (reszty aminokwasowe 1-220) z motywami Walker A (reszty aminokwasowe 83-139) i Walker B (reszty aminokwasowe 205-227), PPXD (reszty aminokwasowe 221-376) oraz NBD2 nazywanej też IRA2 (reszty aminokwasowe 417-621) z motywami VAR (reszty aminokwasowe 513-553) i LH (reszty aminokwasowe 591-621). Domena C-końcowa (reszty aminokwasowe 622-901) składa się z pięciu domen: HSD (reszty aminokwasowe 622-668), HWD (reszty aminokwasowe 669-755), IRA1, nazywanej też 2HF (reszty aminokwasowe 756-823) oraz CTT (reszty aminokwasowe 832-901) z dwiema domenami: FLD (reszty aminokwasowe 832-880) i MBD (reszty aminokwasowe 881-901). **B.** Struktura białka SecA *E. coli* wygenerowana za pomocą modelu AlphaFold [92,93]. Domeny SecA oznaczono kolorami: NBD1 - kolor cyjanowy, PPXD - kolor szary, NBD2 - kolor żółty, HSD - kolor fioletowy, HWD - kolor zielony, IRA1 - kolor niebieski, FLD - kolor pomarańczowy, MBD - kolor czerwony. Schemat wykonany na podstawie [63].

Budowa i organizacja domen w białku SecA są ewolucyjnie zachowane u większości bakterii, jednakże długość oraz rozkład ładunków łańcucha polipeptydowego mogą się różnić. Analiza bioinformatyczna 425 homologów SecA, wykazała, że większość z nich charakteryzuje się wypadkowym ujemnym ładunkiem, natomiast różnią się one długością sekwencji aminokwasowej. Sugeruje się, że specyficzne cechy sekwencji SecA mogą być związane z jego odmiennym funkcjonowaniem w poszczególnych organizmach [94].

3.5.1.2. Stopień oligomeryzacji SecA

Pomimo licznych badań czwartorzędowej struktury SecA, stan oligomeryczny tego białka nadal pozostaje niejasny. SecA jest zazwyczaj oczyszczane jako dimer i wiele badań wskazuje, że właśnie w takiej formie funkcjonuje [95,96]. Jednakże, w literaturze pojawiają się też doniesienia sugerujące, że w trakcie wiązania ligandów i translokacji substratu białkowego, SecA ulega przejściowej monomeryzacji [76,97,98]. Ponadto, analizy *in vitro* sugerują, że wiązanie ligandów – takich jak lipidy, peptydy sygnałowe czy nukleotydy, może przesunąć równowagę oligomeryczną SecA w stronę form monomerycznych [99,100].

Dodatkowe kontrowersje dotyczą stanu oligomerycznego SecA podczas wiązania z dwuwarstwą lipidową. Opublikowane niedawno dane wskazują, że usieciowane disiarczками dimery SecA mają ograniczoną zdolność do wiązania się z dużymi pęcherzykami lipidowymi (LUV, ang. *large unilamellar vesicles*), natomiast monomeryczne formy SecA wiążą się z nimi wydajniej [98]. Z drugiej strony, badania z zastosowaniem technik wizualizacji pojedynczych cząsteczek wewnątrz żywych komórek wskazują, że SecA oddziałuje z błoną wewnętrzną w formie dimerycznej [67].

Zgodnie ze strukturą krystaliczną dimeru, podjednostki SecA łączą się antyrównolegle poprzez reszty aminokwasowe protomerów w domenach NBD1 (N132, Y134, Q137, P159 i G160) i NBD2 (T470, K471, H476, N477, F483, H484, N486 i A489). Dodatkowe oddziaływania pochodzą od reszt aminokwasowych protomeru α (K475, W519 i P529) oraz protomeru β (E141, M161, A525 i L526). Oddziaływania pomiędzy domenami mają przede wszystkim charakter hydrofobowy, dodatkowo wzmacniany przez wiązania wodorowe [72].

Podsumowując, SecA pozostaje w dynamicznej równowadze pomiędzy formą monomeryczną a dimeryczną, a równowaga ta jest przesuwana przez oddziaływanie z ligandami związane z procesem translokacji [101].

3.5.2. Ligandy białka SecA

W procesie translokacji, SecA oddziałuje z wieloma komponentami w komórce bakteryjnej. Należą do nich: prekursor białek, ATP, białko opiekuńcze SecB, rybosomy, kanał SecYEG, lipidy błonowe oraz RNA (Tabela 2) [40,73]. Tak szerokie spektrum oddziaływań jest możliwe dzięki obecności wielu domen o odmiennych właściwościach i funkcjach. Co więcej, SecA charakteryzuje się wysoką dynamiką strukturalną i ulega zmianom konformacyjnym na każdym etapie translokacji, najprawdopodobniej obejmującym także zmiany stanu oligomerycznego [47].

Przede wszystkim, SecA wiąże białka przeznaczone do translokacji – polipeptydy prekursorowe zawierające odpowiednie sekwencje sygnałowe. Rozpoznawanie prekursorów białek odbywa się zarówno poprzez oddziaływanie SecA z α -helikalną sekwencją sygnałową na końcu N nowo syntetyzowanego substratu, jak i poprzez wiązanie określonych sekwencji w jego dojrzałej części [102–104]. Ze względu na różnorodność substratów translokowanych przez SecA, sekwencje sygnałowe rozpoznawane przez to białko nie mają jednoznacznie zdefiniowanych sekwencji aminokwasowych. Charakteryzują się one jednak wspólnym schematem: dodatnio naładowane reszty N-końcowe, hydrofobowy rdzeń oraz hydrofilowy fragment C-końcowy zawierający miejsce cięcia dla peptydazy sygnałowej [105,106]. Sekwencje sygnałowe są wiązane w szczelinie utworzonej przez domeny PPXD, HSD i HWD [107].

Białko SecA jako ATPaza wiąże i hydrolizuje ATP – cząsteczka jest wiązana w szczelinie znajdującej się pomiędzy domenami NBD1 i NBD2 [40].

Ponieważ SecA transportuje białka w formie rozwiniętej, stabilizację ich struktury przed translokacją zapewniają cytoplazmatyczne białka opiekuńcze, w tym SecB. Wiązanie SecA z SecB odbywa się przy udziale kilku przestrzennie odległych od siebie regionów białka: domeny MBD w rejonie C-końcowym, pierwszych 2–11 reszt aminokwasowych N-końca oraz domeny LH [108,109].

SecA uczestniczy również w kotranslacyjnej translokacji dzięki bezpośrednim kontaktom z rybosomem, a konkretnie z białkami rybosomalnymi uL23 tworzącym wraz z uL24 i uL29 tunel wyjściowy rybosomu. W interakcje te zaangażowane są co najmniej dwa regiony SecA: N-końcowa helisa obejmująca reszty aminokwasowe 1–38 oraz dwie reszty lizyny (Lys625 i Lys633) w domenie HSD [110,111]. Najnowsze badania sugerują ponadto, że domena MBD również bierze udział w oddziaływaniu z rybosomami [73].

Oddziaływanie SecA z SecYEG następuje poprzez amfipatyczny, dodatnio naładowany N-końiec SecA. Sugeruje się, że przed związaniem z kanałem SecYEG, SecA najpierw wiąże się z kwaśnymi fosfolipidami obecnymi w dwuwarstwie lipidowej [112], a kluczową rolę w tej interakcji odgrywa domena MBD, która odpowiada za wiązanie lipidów [87]. Ponadto, w trakcie translokacji polipeptydów, domena IRA1 wnika do centralnego poru białka SecY, jednak dokładna rola tego oddziaływania nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona [113].

Tabela 2. Domeny, funkcje oraz ligandy białka SecA bakterii *E. coli*.

Domena		Reszty aa	Funkcja	Ligandy	Lit.
NBD1		1-220; 377-416	wiązanie ATP; autoregulacja	ATP; RNA; rybosomy	[40,82]
PPXD		221-376	rozpoznawanie i wiązanie białka prekursorowego	białka pekursorowe	[103,114]
NBD2 (IRA2)		417-621	aktywacja hydrolizy ATP; autoregulacja	ATP; RNA; rybosomy	[40,82]
HSD		622-668	rozpoznawanie i wiązanie białka prekursorowego	białka pekursorowe; rybosomy	[103,114]
HWD		669-755	rozpoznawanie i wiązanie białka prekursorowego	białka pekursorowe	[103,114]
IRA1 (2HF)		756-829	translokacja przez kanał SecYEG	SecY	[85,113]
CTT	FLD	833-877	autoinhibicja	SecA	[73]
	MBD	878-901	zwiększanie powinowactwa do białek prekursorowych	rybosomy; SecB; fosfolipidy; białka pekursorowe	[73,87,88]

3.5.3. Mechanizm działania białka SecA

Podczas translokacji białek SecA pełni rolę dostarczającej energii ATP-azy, a kolejne cykle wiązania i hydrolizy ATP oraz wymiany nukleotydów prowadzą do zmian konformacyjnych SecA [115]. Jednakże, mimo licznych badań nad strukturą i aktywnością tego białka, dokładny mechanizm translokacji zależnej od SecA nie został w pełni wyjaśniony. Spośród kilku zaproponowanych modeli mechanizmu działania SecA, obecnie za najbardziej prawdopodobny uznaje się model nazwany „Power-Stroke” [116–118]. Model ten zakłada, że podczas wiązania i hydrolizy ATP dochodzi do zmian konformacyjnych w domenie IRA1. Zmiany te, przesuwają domenę IRA1 do wnętrza kanału SecYEG i przepychają przez niego polipeptyd. Po zakończeniu hydrolizy ATP, IRA1 wycofuje się z kanału SecY i przygotowuje do kolejnego cyklu wiązania i hydrolizy. Cofnięcie się tej domeny z kanału mogłoby doprowadzić do wycofania polipeptydu. Zaproponowano jednak mechanizm, w którym w trakcie hydrolizy ATP, domeny PPXD i NBD2 formują zacisk wokół polipeptydu substratowego, co zapobiega jego wycofaniu z kanału. Po zakończeniu hydrolizy ATP zacisk rozluźnia się, umożliwiając pasywne przesunięcie polipeptydu przez kanał SecY [117,118].

Dostępne dane literaturowe sugerują, że SecA może również funkcjonować niezależnie od translokonu SecYEG. Analizy *in vitro* wykazały, że SecA może wnikać do anionowej dwuwarstwy fosfolipidowej, co wskazuje, że SecA tworzy pierścieniowe struktury w błonie wewnętrznej. Struktury te, powstające prawdopodobnie z dimerów SecA [119], są zdolne do translokacji substratów bez udziału SecYEG. W takim układzie jeden protomer pełni funkcję kanału przewodzącego, a drugi działa jako ATP-aza. Kanały tworzone wyłącznie przez SecA wykazują jednak mniejszą wydajność translokacyjną niż kompleks SecA–SecYEG [120,121].

3.6. Regulacja poziomu ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC

Ze względu na kluczową rolę translokonu SEC w komórkach bakteryjnych, ekspresja genów kodujących jego komponenty musi być precyzyjnie regulowana. Jednak w dostępnej literaturze brak jest szczegółowych danych dotyczących tego procesu.

Geny kodujące dwa komponenty kanału błonowego SEC, *secY* i *secE*, są transkrybowane wraz z innymi genami zaangażowanymi w translację (operon *spc*, zawierający geny kodujące białka rybosomalne i gen *secY*) i transkrypcję (gen kodujący

czynnik antyterminacyjny NusG jest transkrybowany wraz z genem *secE*). W związku z tym ekspresja tych genów może mieć charakter konstytutywny [122–124]. Możliwe jest więc, że regulacja funkcjonowania translokonu SEC może opierać się na ścisłej regulacji ekspresji genu *secA*.

Poziom białka SecA w komórce jest regulowany na poziomie translacji poprzez mechanizm obejmujący mRNA *secM* i białko SecM [122]. Geny *secM* i *secA* należą do tej samej jednostki transkrypcyjnej, przy czym *secM* jest zlokalizowany przed genem *secA*. Transkrypt *secM-secA* tworzy drugorzędową pętlę zawierającą sekwencję wiążącą rybosom (SD, ang. *Shine-Dalgarno*) genu *secA*. W tej strukturze, sekwencja SD genu *secA* nie może oddziaływać z rybosomami. Rybosomy rozpoczynają translację genu *secM*, ale zatrzymują się na kodonie Pro166 (tuż przed sekwencjami formującymi pętlę). Pozycja rybosomu na mRNA podczas zatrzymania translacji zaburza strukturę drugorzędową i odsłania sekwencję SD genu *secA*, w związku z czym możliwa jest inicjacja translacji tego genu. W warunkach fizjologicznych zatrzymanie elongacji SecM jest przejściowe: koniec N powstającego polipeptydu SecM jest rozpoznawany przez cząsteczkę SRP i kierowany do kanału SecYEG w celu eksportu. Podczas translokacji SecM dochodzi do zniesienia zatrzymania elongacji. Struktura spinki zostaje odtworzona po zakończeniu translacji zarówno *secM*, jak i *secA*. W niekorzystnych warunkach, gdy proces sekrecji białek jest zaburzony, zatrzymanie rybosomu na mRNA *secM* trwa dłużej, co prowadzi do zwiększonej syntezy SecA [122,125].

Ponadto, poziom białka SecA w komórce bakteryjnej kontrolowany jest również poprzez autoregulację. Białko to posiada miejsce wiązania RNA (pomiędzy domenami NBD1 i NBD2), umożliwiające interakcję z własnym mRNA. Wiązanie to blokuje sekwencję SD genu *secA* i może dodatkowo powodować dysocjację nowo utworzonego kompleksu inicjacyjnego składającego się z podjednostki rybosomalnej 30S, tRNA^{fMet} i transkryptu *secM-secA*RNA [122,126].

3.7. Bakterie *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych bakteryjnych patogenów na świecie. Szacuje się, że zakażenie tym drobnoustrojem dotyczy ponad połowy światowej populacji, co czyni je jednym z najczęstszych przewlekłych zakażeń bakteryjnych u człowieka [127]. Te Gram-ujemne bakterie należą do odrębnej

i ewolucyjnie odległej linii filogenetycznej - typu Campylobacterota (utworzonego w wyniku przeklasyfikowania dawnej klasy proteobakterii Epsilonproteobacteria), rzędu Campylobacterales, rodziny Helicobacteraceae i rodzaju *Helicobacter* [128,129]. Bakterie *H. pylori* zostały po raz pierwszy wyizolowane i opisane w latach 80. XX wieku przez Barry'ego Marshalla i Robina Warrena, którzy za swoje odkrycia dotyczące roli *H. pylori* w etiologii choroby wrzodowej otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny w 2005 roku [130]. W porównaniu do wielu innych bakteryjnych patogenów człowieka, *H. pylori* charakteryzuje się niewielkim genomem (ok. 1,6 Mb), co może wiązać się z obecnością odmiennych systemów molekularnych oraz mechanizmów adaptacyjnych. Dla porównania, genom *E. coli* K-12 liczy ok. 4,6 Mb [131,132].

Chociaż większość zakażeń *H. pylori* przebiega bezobjawowo, indukują one przewlekły stan zapalny błony śluzowej żołądka. W konsekwencji u części osób rozwijają się choroby o istotnym znaczeniu klinicznym, takie jak choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy (5-10% zakażonych), a w dalszej perspektywie również nowotwory takie jak gluczolakorak żołądka (1% zakażonych) oraz chłoniak MALT (ang. *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*) (mniej niż 0,1% zakażonych) [133]. Z tego powodu Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organisation*) zaklasyfikowała *H. pylori* jako czynnik rakotwórczy grupy I [134].

Skuteczna kolonizacja błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* jest możliwa dzięki licznym mechanizmom adaptacyjnym tej bakterii do przetrwania, namnażania się i rozprzestrzeniania w wymagającym, kwaśnym środowisku. Należą do nich między innymi systemy neutralizujące kwaśne pH poprzez produkcję amoniaku, głównie dzięki metabolizmowi mocznika przez enzym ureazę. Spiralny kształt komórki i obecność rzęsek umożliwiają bakteriom ruchliwość i przedostanie się do powierzchni komórek nabłonkowych żołądka, gdzie dzięki specyficznym adhezynom (np. BabA i SabA) możliwe jest oddziaływanie z receptorami komórek gospodarza [135]. Długotrwała infekcja wspierana jest również przez liczne czynniki wirulencji, które modulują odpowiedź immunologiczną, wpływają na szlaki sygnałowe komórek gospodarza, uszkodzają połączenia międzykomórkowe i inicjują procesy prowadzące do patologii przewodu pokarmowego. Do najważniejszych wydzielanych czynników wirulencji, bezpośrednio związanych ze zmianami w nabłonku żołądka, należą: białko CagA (ang. *cytotoxin associated gene A*), γ -glutamylotranspeptydaza (gGT), cytotoksyna

wakuolizująca VacA, oraz proteaza HtrA (ang. *high temperature requirement protease A*) [135,136].

3.7.1. System SEC u bakterii *H. pylori*

Większość danych dotyczących funkcjonowania translokonu SEC pochodzi z badań przeprowadzonych na modelu *E. coli*. U *H. pylori* występuje większość homologów białek wchodzących w skład systemu SEC, jednak jak dotąd nie zidentyfikowano istotnych komponentów tego systemu takich jak SecB oraz białka odpowiedzialnego za regulację poziomu SecA, SecM [137]. Ponadto poziom homologii między komponentami tego systemu w *H. pylori* i *E. coli* nie jest wysoki (Tabela 3). Sugeruje to, że funkcjonowanie i regulacja systemu SEC w *E. coli* i *H. pylori* mogą wykazywać różnice.

Tabela 3. Homologi komponentów translokonu SEC w *E. coli* i *H. pylori*.

komponent systemu SEC u <i>E. coli</i>	homolog <i>H. pylori</i>	%identyczności/%pokrycia
SecA	HP0786	49%/64%
SecB	-	-
SecY	HP1300	42%/67%
SecE	HP1203a	brak homologii sekwencji aminokwasowej
SecG	HP1255	35%/61%
SecD	HP1550	37%/57%
SecF	HP1549	35%/62%
YajC	HP1551	44%/76%
YidC	HP1450	37%/62%
Ffh (SRP)	HP1152	40%/64%
FtsY	HP0763	50%/70%

Analiza genomu szczepu *H. pylori* 26695 wykazała, że około 1/3 otwartych ramek odczytu koduje białka z przewidywanymi sekwencjami sygnałowymi kierującymi do systemów transportu SEC, TAT lub systemu sekrecji typu V (T5SS) [131].

U *H. pylori* występują także homologi białek kodujące podstawowe składniki systemu BAM, odpowiedzialnego za wbudowywanie białek do błony zewnętrznej: BamA i BamD (odpowiednio: HP0655 i HP137) oraz systemu TAT: TatA, TatB i TatC (odpowiednio: HP0320, HP1060, HP1061). Jednakże zdecydowana większość białek wydaje się być transportowana przez system SEC [137].

3.7.2. System Lol u bakterii *H. pylori*

Komórki *H. pylori* wytwarzają około 40 różnych lipoprotein. Są to białka zaangażowane w różnorodne procesy, w tym wirulencję. Przykładowo lipoproteiną jest CagT, składnik systemu IV sekrecji odpowiedzialnego za wydzielanie onkoproteiny CagA [138]. Ponadto, system BAM jest współtworzony przez lipoproteiny [139], więc prawidłowe wstawianie β -baryłek białek OMP do błony zewnętrznej, wliczając adhezyny, zależy od prawidłowego funkcjonowania systemów modyfikacji, sortowania i transportu lipoprotein.

Genom *H. pylori* zawiera niezbędne do przeżycia geny kodujące LolF, LolD i LolA [140,141]; nie zidentyfikowano genu insertazy LolB. Homologia białek Lol *H. pylori* względem odpowiedników z *E. coli* nie jest duża i wynosi ok. 30% identyczności na poziomie aminokwasowym (Tabela 4). Badania strukturalne zostały przeprowadzone jedynie dla LolA z *H. pylori*. Analiza struktury krystalicznej tego białka wykazała, że mimo niewielkiej homologii na poziomie aminokwasowym, LolA z *H. pylori* wykazuje duże podobieństwo strukturalne względem LolA z *E. coli*. Struktura obu białek przypomina otwartą β -baryłkę z hydrofobowym zagłębieniem, w którym łańcuchy acylowe transportowanych lipoprotein są chronione przed kontaktem z polarnym środowiskiem peryplazmy [142]. Nie jest wiadome, w jaki sposób u *H. pylori* dochodzi do inkorporacji łańcuchów acylowych lipoprotein do dwuwarstwy lipidowej. Jedną z możliwości jest pełnienie funkcji insertazy przez LolA, jak zostało to zaproponowane dla homologa tego białka u *Caulobacter vibrioides* [143]. Alternatywnie, lipoproteiny są zakotwiczone w błonie zewnętrznej przez inne dotąd nie zidentyfikowane białko.

Tabela 4. Homologi komponentów systemu Lol w *E. coli* i *H. pylori*. (H. pylori* zawiera homodimer LolF zamiast heterodimeru LolCE)**

komponent systemu Lol u <i>E. coli</i>	homolog <i>H. pylori</i>	%identyczności/%pokrycia
LolA	HP0785	30%/43%
LolB	-	-
LolC	HP0787 (LolF)*	24%/47%
LolD	HP0179	38%/56%
LolE	HP0787 (LolF)*	23%/49%

3.7.3. Mechanizmy odpowiedzi na stres u bakterii *H. pylori*

Bakterie *H. pylori* kolonizują wyjątkowo specyficzną niszę – błonę śluzową żołądka, w związku z czym podczas infekcji są narażone na działanie wielu czynników stresowych. Przede wszystkim, ze względu na bardzo niskie pH w żołądku (2,0 w jamie żołądka, 4,5–6,5 w błonie śluzowej), narażone są na działanie stresu kwasowego [144–146]. Istotnymi czynnikami stresowymi są również reaktywne formy tlenu i azotu [147,148], powstające w następstwie aktywacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Ponadto, bakterie te mogą być narażone na stres wywołany działaniem antybiotyków oraz leków stosowanych w terapii zakażeń [149].

W genomie *H. pylori* zidentyfikowano tylko trzy podjednostki sigma polimerazy RNA: σ^{80} (RpoD), σ^{54} (RpoN) i σ^{28} (FliA) i nie zidentyfikowano homologów czynnika sigma fazy stacjonarnej (σ^S) oraz czynnika sigma odpowiedzi na szok cieplny (σ^{32}). Brak tych alternatywnych podjednostek sugeruje, że mechanizmy odpowiedzi na stres u *H. pylori* różnią się od tych obserwowanych u innych bakterii. Ponadto, u *H. pylori* zidentyfikowano jedynie cztery dwuskładnikowe systemy regulacyjne (TCS, ang. *two-component systems*): ArsR/S, FlgR/S, CrdR/S oraz CheY/A, a także dwa dodatkowe regulatory: HP1021 i HsrA (HP1043). Ograniczona ilość regulatorów transkrypcyjnych prawdopodobnie odzwierciedla adaptację *H. pylori* do specyficznej niszy ekologicznej, a także brak konkurencji ze strony innych mikroorganizmów [150].

Spośród zidentyfikowanych systemów ArsR/S jest odpowiedzialny za regulację genów związanych z odpowiedzią na stres kwasowy i oksydacyjny, system FlgR/S za

regulację genów związanych z ruchliwością, CrdR/S za regulację genów związanych z transportem miedzi a CheY/A za regulację genów odpowiedzialnych za chemotaksję [150]. Ponadto, regulacja głównych genów białek szoku cieplnego (m.in. GroESL, DnaK) odbywa się za pośrednictwem represorów HspR i HrcA, których transkrypcja jest stymulowana także w odpowiedzi na stres solny, stres kwasowy oraz wysoki poziom nieprawidłowo zwiniętych białek w cytoplazmie [150,151].

Jony metali pełnią kluczową funkcję w utrzymaniu prawidłowych procesów komórkowych, stanowią niezbędne kofaktory wielu białek enzymatycznych, uczestniczą m.in. w reakcjach redoks, oddychaniu komórkowym oraz procesach wytwarzania energii [152]. Istotną rolę w homeostazie metali odgrywa regulator NikR, odpowiedzialny za dostępność niklu niezbędnego dla funkcjonowania ureazy, oraz Fur, kontrolujący metabolizm żelaza i uczestniczący w regulacji licznych genów związanych z wirulencją, w tym CagA i VacA [150,152,153] .

H. pylori zwalcza skutki stresu oksydacyjnego poprzez syntezę wielu białek ochronnych, z których część pełni funkcje analogiczne do opisanych u innych bakterii. Jednakże, wiele klasycznych białek regulatorowych występujących u bakterii Gram-ujemnych (np. RpoH, RpoS, SoxRS, OxyR) nie zostało zidentyfikowanych u *H. pylori* [131,154]. Charakterystyczna dla *H. pylori* jest obecność niezidentyfikowanego u innych bakterii białka KapA, biorącego udział w transporcie katalazy KatA, odpowiedzialnej za rozkład nadtlenu wodoru zarówno w cytoplazmie jak i w peryplazmie [155]. Ponadto, w odpowiedzi na stres oksydacyjny, *H. pylori* wytwarza jedną dysmutazę ponadtlenkową SodB, w odróżnieniu od *E. coli*, która posiada trzy białka SOD [156–158]. W przeciwieństwie do wielu innych bakterii *H. pylori* nie syntetyzuje glutationu ani glutaredoksyn, lecz wykorzystuje system tioredoksyn obejmujący białka Trx1, Trx2 oraz reduktazę TrxR. Trx1 stabilizuje m.in. zdenaturowaną arginazę (RocF), która bierze udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny poprzez ograniczanie produkcji tlenku azotu przez makrofagi podczas infekcji [159,160].

3.7.4. Pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości białek u *H. pylori*

Dwuetapowy eksport białek stanowi złożony mechanizm, wiążący się z wieloma wyzwaniami dla komórki bakteryjnej. Białka transportowane systemem SEC docierają do peryplazmy w formie niezwinionej, w związku z czym są one podatne na

niespecyficzne interakcje, a tym samym na agregację. Ponadto, białka kierowane do błony zewnętrznej lub wydzielane do środowiska zewnętrznego uzyskują swoją natywną konformację dopiero w miejscu docelowym [7]. Aby przeciwdziałać tym negatywnym zjawiskom i umożliwić wydzielanym białkom osiągnięcie natywnej struktury, komórki wykorzystują grupę białek określanych łącznie jako pozacytoplazmatyczny system kontroli jakości białek (PSKJB, ang. *extracytoplasmic protein quality control system*). System ten obejmuje białka opiekuńcze, katalizatory zwijania białek i proteazy.

Większość badań dotyczących funkcjonowania PSKJB i procesu fałdowania białek w peryplazmie odnosi się biogenezy białek błony zewnętrznej (OMPs), u których struktura β -baryłki powstaje dopiero po wbudowaniu do błony zewnętrznej przez kompleks BAM. Podczas transportu przez peryplazmę białka te muszą być utrzymane w stanie kompetentnym do insercji, a jednocześnie podlegać modyfikacjom, takim jak tworzenie mostków disiarczkowych czy izomeryzacja wiązań prolinowych. Skuteczna biogeneza OMPs i innych białek funkcjonujących poza cytoplazmą, wymaga więc skoordynowanej aktywności wielu składników PSKJB [161].

W przestrzeni peryplazmatycznej bakterii *E. coli* występują dwa rodzaje katalizatorów zwijania: oksydoreduktazy tiolowo-disulfidowe oraz izomerazy peptydyloprolinowe *cis-trans* (PPIazy). Pierwsze z nich katalizują tworzenie właściwych wiązań disiarczkowych, co jest niezbędnym etapem dojrzewania białek. Proces ten obejmuje utlenianie grup tiolowych dwóch reszt cysteinowych, co prowadzi do powstania wiązań disiarczkowych stabilizujących trzeciorzędową i czwartorzędową strukturę białek. W warunkach *in vivo* proces ten jest katalizowany przez grupę białek Dsb. W systemie Dsb wyróżnia się dwie główne ścieżki: (a) utleniającą, w której białka DsbA wraz z DsbB katalizują tworzenie mostków disiarczkowych, oraz (b) izomeryzacyjno-redukcyjną, obejmującą białka DsbC, DsbD, DsbE, DsbF i DsbG, odpowiedzialną za korygowanie błędnie wprowadzonych wiązań disiarczkowych i przywracanie prawidłowej struktury białek [162,163]. Druga grupa - PPIazy, katalizują izomeryzację *cis-trans* wiązań peptydowych poprzedzających reszty prolinowe, co sprzyja prawidłowemu zwijaniu białek [164]. U *E. coli* opisano cztery takie enzymy funkcjonujące w peryplazmie: SurA, FkpA, PpiA oraz PpiD, spośród których kluczową rolę odgrywa SurA. SurA jest uważane za główne białko opiekuńcze odpowiedzialne za biogenezę OMP w *E. coli*. Inne izomerazy, pełnią funkcję wspomagającą. Co istotne,

enzymy te poza aktywnością izomerażową wykazują także ogólne właściwości opiekuńcze – działają jako holdazy, wiążąc niezwinęte lub uszkodzone białka i chroniąc je przed agregacją [165].

W peryplazmie bakterii *E. coli* działają dwa białka opiekuńcze, które nie wykazują dodatkowej, innej aktywności enzymatycznej: Skp i Spy. Skp stabilizuje niezwinęte OMP i kieruje je do degradacji przez DegP, gdy ich wbudowanie do OM jest niemożliwe. Spy natomiast jest intensywnie nadprodukowany w warunkach stresu i chroni substraty przed agregacją [166].

W niekorzystnych warunkach, które powodują stres związany ze zwijaniem białek, nie wszystkie białka uzyskują natywną konformację, w związku z czym ulegają degradacji w procesie proteolizy. Główną proteazą odpowiedzialną za usuwanie nieprawidłowo zwiniętych białek jest DegP (HtrA), która pełni podwójną rolę - proteazy i białka opiekuńczego, wiążąc rozwinięte substraty i zapobiegając ich agregacji [167]. Inne proteazy, takie jak BepA i YcaL, są odpowiedzialne za degradację białek zablokowanych w kompleksie BAM [168]. Ponadto, *E. coli* posiada dodatkowy homolog HtrA, DegQ, który pełni istotne funkcje głównie w warunkach niskiego pH [169].

W dostępnej literaturze ilość informacji odnośnie procesu zwijania białek w peryplazmie *H. pylori* jest ograniczona. Wiadomo jednak, że system kontroli jakości białek u tego drobnoustroju znacząco odbiega od tego opisanego w *E. coli*. U *H. pylori* część homologów pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek nie została zidentyfikowana, a inne wykazują niewielką homologię względem ich odpowiedników w *E. coli* (Tabela 5).

System oksydoreduktaz tiolowo-disulfidowych (Dsb) u *H. pylori* znacznie różni się od systemów opisanych u *E. coli*. U *H. pylori* nie zidentyfikowano klasycznych oksydoreduktaz, aczkolwiek analizy sekwencji ujawniły 149 potencjalnych białek pełniących tę funkcję, z których tylko dwa zaklasyfikowano jako peryplazmatyczne oksydoreduktazy tiolowe; HP0231 (DsbK) i HP0377 (CcmG) [170,171].

W przeciwieństwie do *E. coli*, u *H. pylori* nie stwierdzono obecności kluczowych białek opiekuńczych takich jak PPIazy SurA i FkpA ani białek opiekuńczych Spy i Skp. Zidentyfikowano natomiast trzy białka "SurA-podobne": HP0175, HP0659 i HP0977. Najlepiej poznane HP0175, wykazuje aktywność PPI-azową i pełni funkcję białka

opiekuńczego. Pozostałe dwa, HP0659 i HP0977 (homolog PpiD), nie zostały jak dotąd scharakteryzowane [172,173].

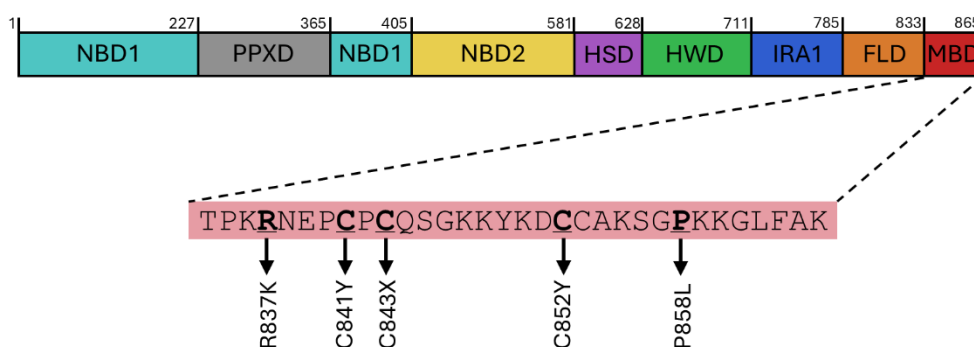
U *H. pylori* jedyną proteazą o potwierdzonej roli w PSKJB jest HtrA. Genom *H. pylori* koduje pojedynczy homolog HtrA, który wykazuje zarówno aktywność proteolityczną, jak i opiekuńczą, co pozwala utrzymać proteostazę komórkową w warunkach stresowych [174].

Tabela 5. Komponenty PKSJB w *E. coli* i ich homologi w *H. pylori*.

komponent systemu PSKJB u <i>E. coli</i>	homolog <i>H. pylori</i>	%identyczności/%pokrycia
główne białka opiekuńcze		
SurA	HP0175	32%/46%
	HP0659	24%/47%
PpiD	HP0977	25%/48%
FkpA	-	-
Skp	-	-
Spy	-	-
proteazy		
DegP	HP1018/19 (HtrA)	42%/62%
DegQ		40%/60%
BepA	-	-
YcaL	-	-

Pewna część HtrA wytwarzana przez *H. pylori* jest wydzielana poza komórkę, prawdopodobnie poprzez pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV) lub inny, dotąd niepoznany mechanizm [175]. Białko to jest istotnym czynnikiem wirulencji *H. pylori*. Uważa się, że podstawową funkcją wydzielanego HtrA jest niszczenie połączeń między komórkami nabłonkowymi. HtrA poprzez proteolityczną aktywność, degradowuje białka połączeń adhezyjnych (E-kadheryny), ścisłych (okludyny i kładyna-8) oraz desmosomów (desmogleina-2) [135,176–178]. Skutkiem tej degradacji jest rozluźnienie połączeń międzykomórkowych i umożliwienie bakterii transmigracji przez komórki nabłonkowe w kierunku błony podstawnej żołądka. W przypadku *H. pylori* lokalizacja ta jest kluczowa dla wprowadzenia czynnika wirulencji CagA do komórek gospodarza [179].

Ze względu na trudności w skonstruowaniu szczepów *H. pylori* pozbawionych funkcjonalnego białka HtrA, dane dotyczące jego roli w wirulencji są ograniczone. Dotychczas, tylko w szczepie *H. pylori* N6 możliwa była delecja *htrA* lub mutacja genu *htrA* S221A skutkująca brakiem aktywności proteolitycznej. Jednakże, sekwencjonowanie genomów pięciu uzyskanych klonów wykazało, że w każdym z nich inaktywacja *htrA* była związana z pojawieniem się mutacji punktowej w genie *secA*. Mutacje te skutkowały substytucjami aminokwasowymi w obrębie domeny MBD SecA: R837K, C841Y, C843X, C852Y oraz P858L (Rycina 5) i najprawdopodobniej pełniły rolę mutacji supresorowych, kompensujących letalny fenotyp wynikający z braku funkcjonalnej proteazy HtrA. Wyniki te wskazują zatem na potencjalny funkcjonalny związek pomiędzy HtrA a translokonem SEC w *H. pylori* [180].



Rycina 5. Substytucje aminokwasowe w regionie C-końcowym białka SecA w szczepach *H. pylori* ze zmutowanym genem *htrA*. Domeny SecA oznaczono kolorami: NBD1 - kolor cyjanowy, PPXD - kolor szary, NBD2 - kolor żółty, HSD -kolor fioletowy, HWD - kolor zielony, IRA1 - kolor niebieski, FLD - kolor pomarańczowy, MBD - kolor czerwony. Miejsca wystąpienia substytucji aminokwasowych oznaczono strzałkami i pogrubiono. Schemat wykonany na podstawie [180].

4. Cel pracy

Wyniki przeprowadzonych uprzednio badań [180] wskazują, że letalny efekt braku funkcjonalnej proteazy HtrA u *H. pylori* może być suprymowany przez mutacje w C-końcowej części białka SecA. Pozwoliło to na zaproponowanie hipotezy zakładającej istnienie mechanizmu regulującego funkcjonowanie translokonu SEC w odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny. Taki mechanizm mógłby polegać zarówno na zmianie efektywności działania poszczególnych komponentów SEC (np. mutacje w rejonie C-końca SecA), jak i na modulacji zawartości składników kompleksu translokonu (np. poprzez zmianę poziomu ekspresji kodujących je genów). W rezultacie mogłoby dojść do zmian w tempie eksportu białek z cytoplazmy.

Zadaniem niniejszej pracy doktorskiej była weryfikacja powyższej hipotezy. Zostały postawione następujące cele:

1. Uzyskanie biochemicznej charakterystyki białka SecA *H. pylori* i wariantów SecA zawierających mutacje w rejonie C-końca.
2. Określenie zmian fenotypowych *H. pylori* spowodowanych obecnością zmutowanych wariantów SecA.
3. Zbadanie w jakim stopniu czynniki stresogenne uszkodzające błony komórkowe i wywołujące stres w peryplazmie mogą wpływać na ekspresję genów kodujących główne składniki translokonu SEC.

5. Materiały

5.1. Oligonukleotydy

Spis starterów wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 6 i 7.
Syntezę oligonukleotydów zlecano firmie Genomed S.A. (Warszawa, Polska).

Tabela 6. Oligonukleotydy wykorzystane w pracy.

L.p.	Nazwa	Sekwencja (sekwencja oligonukleotydowa 5'–3')	T _m [°C]	Zastosowanie
1	SecAOEpET28fw	CATCACAGCAGCGGCCTGGTGC CGCGCGGCAGCATAAAAGCAAT CATTGGAAAAATC	77	amplifikacja insertu do konstrukcji plazmidu służącego do nadprodukcji białka SecA w systemie pET
2	SecAOEpET28rev	GTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGC TTGTCGACGGACTATTTGGCAAA TAAGCCCTTTTATAG	75	
3	SecA_plast_f	CAAAACATTGCTACAATTACATC CAACCTTGATATGATAAAAGCA ATCATTGGAAAAATC	66	konstrukcja plazmidu do komplementacji <i>secA</i> w genomie bakterii <i>H. pylori</i> (wstawienie genu typu dzikiego do miejsca plastyczności na genomie bakterii)
4	SecA_plast_r	CATTTTAGCCATTTATTCCTCCT AGTTAGTCAGGATCTCTATTTGG CAAATAAGCCCTTTTATAG	67	
5	secA_fw	GCAAGATTCTAGCGATGCGG	66,9	sekwencjonowanie genu <i>secA</i>
6	secA_rev	GCTTGTGGTATAGAGCGTTAAGG	62,7	sekwencjonowanie genu <i>secA</i>

7	secA_1	CCCTTTATTTTACAAGAC	48,4	
8	secA_2	CCGATTTACCATAGACG	59,1	
9	secA_3	CCTCTTCAGTGATTAAAATCGC	61,5	
10	secA_4	GCGAACACATTGAATCAAAGC	64,4	
11	secA_5	CGTTTTCCACCGCTCTTGTAAC	66,5	
12	N_33.3_608_999_seq_f	GCCAACCAAGAAGCGTATAGAC C	59	sekwencjonowanie DNA w miejscu pomiędzy genami <i>hp_0999</i> a <i>hp_1000</i> na chromosomie <i>H. pylori</i> N6
13	24_kaset_kan_seq_rev	CCTTAGCAGGAGACATTCCTTCC GTATC	70,6	sekwencjonowanie kasety oporności na kanamycynę
14	608_rha_c_f	GGTGATTATCATCGCTTATTCC	54	sekwencjonowanie DNA w miejscu pomiędzy genami <i>hp_0999</i> a <i>hp_1000</i> na chromosomie <i>H. pylori</i> N6
15	N6_SecA_C843X_27_f	GAGCCTTGCCCTTGACAAAGCGG TAAAAAATACAAAGATTG	70,4	startery do wprowadzenia mutacji punktowej w genie <i>secA</i> <i>H. pylori</i> (substytucja reszty C843,

16	N6_SecA_C843X_27_r	GTATTTTTTACCGCTTTGTCAAGG GCAAGGCTCGTTTCTTTTAG	71,3	powodująca powstanie kodonu STOP)
17	N6_SecA_P858L_28_f	GCGCTAAAAGCGGGCTTAAAAAG GGCTTATTTGCCAAATAG	71,4	startery do wprowadzenia mutacji punktowej w genie <i>secA H. pylori</i> (substytucja P858L)
18	N6_SecA_P858L_28_r	CAAATAAGCCCTTTTAAAGCCCG CTTTTAGCGCAACAATCTTTG	71,3	
19	N6_SecA_R837K_33_f	CTAAAACCCCTAAAAAAACGAG CCTTGCCCTTGTCAAAGCG	72,4	startery do wprowadzenia mutacji punktowej w genie <i>secA H. pylori</i> (substytucja R837K)
20	N6_SecA_R837K_33_r	GGGCAAGGCTCGTTTTTTTAGGG GTTTTAGCGAAAGCTTTC	72,4	
21	N6_SecA_C841Y_4.2_f	CCTAAAAGAAACGAGCCTTACCC TTGTCAAAGCGGTAAAAAATAC	71,3	startery do wprowadzenia mutacji punktowej w genie <i>secA H. pylori</i> (substytucja C841Y)
22	N6_SecA_C841Y_4.2_r	CCGCTTTGACAAGGGTAAGGCTC GTTTCTTTTAGGGGTTTATAG	73,3	
23	N6_SecA_C852Y_36_f	GGTAAAAAATACAAAGATTATTG CGCTAAAAGCGGGCCTAAAAAGG GC	72	startery do wprowadzenia mutacji punktowej w genie <i>secA H. pylori</i> (substytucja C852Y)

24	N6_SecA_C852Y_36_r	GGCCCGCTTTTAGCGCAATAATCT TTGTATTTTTTACCGCTTTGAC	72,1	
25	ExdelhtrAfw	GAACATATGTCGTGGAAGCTTTG ATTAATG	69,1	amplifikacja konstruktu do komplementacji genu <i>htrA</i> w szczepach <i>H. pylori</i>
26	ExdelhtrArev	CGGAATTCCAAGCTTGATTTTCAG GGTAATGG	76	
27	htrAseq2_cat	GGTTCGGCTATGGATAAGGATC	57	sekwencjonowanie genu <i>htrA</i>
28	htrAseq2_cat	CTTTAAAAAGGCCGTAATATCC	60,3	
29	SecA_842_left_F	CTGTCTGAAGAGGAACTTTTAGG GC	59	amplifikacja lewego ramienia homologii do konstruktu służącego do delecji fragmentu C-końcowego genu <i>secA</i>
30	SecA_842_left_R_cat	CTCCATTTTAGCTTCCTAGTTAGT CATCAAGGGCAAGGCTCGTTTCT TTTAG	68	
31	89_(1038R1)_cat	TTACGCCCCGCCCTGCCACTCATC GC	72	amplifikacja kasety oporności na chloramfenikol do konstruktu służącego do delecji fragmentu C-końcowego genu <i>secA</i>
32	95F_(974F) delta_fw	TGACTAACTAGGAAGCTAAAATG GAGAAAA	58	

33	SecA_deltaCTT_right_F_cat	CTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGG CGTAAACCCCTAAAAGAAACGAG CCTTG	76	amplifikacja prawego ramienia homologii do konstruktów służących do delecji fragmentu C-końcowego genu <i>secA</i>
34	SecA_deltaCTT_right_R	CCCCACGATCAAATTAAAAGGG	57	
35	SecAcomp_R_AphA3	GCCATTTATTCCTCCTAGTTAGTC ACTATTTGGCAAATAAGCCCTTTT TAGG	72,6	amplifikacja lewego ramienia homologii do konstruktów służących do komplementacji C-końcowego genu <i>secA</i>
36	AphA3_SecAcompl_L	GAATTGTTTTAGTACCTGGAGGG AATAACCCCTAAAAGAAACGAGC C	72,9	
37	HofH_fw	GTGCCATATATTAGCCATTTG	51	amplifikacja i sekwencjonowanie genu <i>hp_1167</i>
38	HofH_rev	CCCCACTCACATAATGGGTATG	56	
39	HP1369_fw	CCCTAACGCTCTCGCTTAAAAGG	55	amplifikacja i sekwencjonowanie genu <i>hp_1369</i>
40	HP1369_rev	CTTTGCTTGTTTGCCATTGATAG	57	
41	HP1369_seq2	GCGAAGATGAAATCAACGGCAC	58	
42	HP0580_fw	CTACGCGCTAGACAATTTGCCCA	59	amplifikacja i sekwencjonowanie genu <i>hp_0580</i>

		G		
43	HP0580_rev	CATCATTAATCACTTGAGAAGGG	53	

Tabela 7. Oligonukleotydy wykorzystane do sprawdzenia poziomu ekspresji genów u bakterii *H. pylori*.

L.p.	Badany gen	Starter przedni (sekwencja oligonukleotydowa 5'–3')	Starter wsteczny (sekwencja oligonukleotydowa 5'–3')	Długość ampliconu	Wydajność		R ²	Stężenie końcowe w reakcji [μm]
					Do uzyskania Wyników: 7.6., 7.7.	Do uzyskania Wyników: 7.5.		
1	<i>era</i>	CCAGGGCTCCAT CATCAAGAAA	CGCACAATTCAG CATCGCC	85	1.93	2	1	400
2	<i>gyrB</i>	CGATGCTGATGT GGATGGGAG	TGTTCAATCAGC GGGCGTAAA	81	1.99	1,98	1	400
3	<i>gyrA</i>	GAGCGATTGTTT TAGATGAAGGCG	TACCCAAATGCG ATGCGATGAG	93	1.91	1,99	1	400
4	<i>dnaG</i>	GTTTTAGGGATT AGAGAGCGAGCC	GGGCGAACTTTT GAGGGCAAT	82	1.99	2	1	600
5	<i>ftsZ</i>	GCCTGTGGTGAA ACAAACAAGA	CTTATGGCTGTG GGTGTGGA	90	1.95	1,96	1	400
6	<i>adk</i>	GGTGGTGTTTCA	TTTCTTCAATGCT	116	1.98	1,98	1	400

		TAACCGCAT	CCTCTCCCC					
7	<i>gmk</i>	TAGCGGAGCGGG TAAAAGCA	GTGTGGTGGTGG AAAGGGAAAA	83	1,96	1,95	1	400
8	<i>secA</i>	GAGGCGTTTTAG TGAGGGCTTG	TCGGCTAAGGTT TGGCTCTCTT	84	1,99	2	1	400
9	<i>secY</i>	ATCCCCATTCCT GGCGTAGA	AAACCGCATTCC CGCTAAACA	103	1,96	-	1	400
10	<i>secE</i>	TAAGGAGCAGAT ACGCAACGC	AGAACACTAGAG ACAAAAGCCCC	111	1,93	-	1	400
11	<i>secD</i>	ATGGCGGGGATT GTTTTGACC	AGCGATGCCCTC ATTCTCTCTT	99	1,97	-	1	400
12	<i>secG</i>	CCCTACGCTCAA TCCCACACT	GGAGTTCGTCAG GCGTTTGTT	95	1,92	-	1	400
13	<i>ggt</i>	CAGCCAGATACG GTTACGCCAA	TAATGCGTGGTG TTGCTCCC	80	1,92	-	1	400

14	<i>cagA</i>	CACTACCACCAC CGACATACAA	GCGACTCCCTCA ACATCTAAC	120	1,92	-	1	400
15	<i>lolF</i>	CATTGGTTTAGG CGGTGTAGCG	GCTGGGAGCGAG ATGATAGGG	90	-	1,99	1	400

5.2. Szczepy bakteryjne

Spis szczepów bakteryjnych wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 8.

Tabela 8. Szczepy bakteryjne wykorzystywane w pracy.

L.p.	Nazwa	Genotyp	Źródło
1	<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (φ80 <i>lacZΔM1</i>) <i>hsdR17 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	[181] Kolekcja Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej UG
2	<i>E. coli</i> BL21/DE3	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i>	Novagen (Merck, Niemcy)
3	<i>H. pylori</i> N6 wt	szczep typu dzikiego	[182]
4	<i>H. pylori secAΔ842</i>	<i>secAΔ842</i> , Cm ^R	ta praca
5	<i>H. pylori secAΔ842_wt</i>	<i>secAΔ842/secAwt</i> , Kan ^R	ta praca
6	<i>H. pylori</i> N6 <i>secAR837K</i>	<i>ΔhtrA/htrAwt</i> , <i>secAR837K</i> ; Cm ^R	[180]
7	<i>H. pylori</i> N6 <i>secAR837K_secA</i>	<i>ΔhtrA/htrAwt</i> , <i>secAR837K/secAwt</i> ; Cm ^R ; Kan ^R	ta praca
8	<i>H. pylori</i> N6 <i>htrAS221A</i>	<i>htrAS221A</i> , <i>secAC841Y</i> ; Kan ^R	[180]
9	<i>H. pylori</i> N6 <i>secAC841Y</i>	<i>htrAS221A/htrAwt</i> , <i>secAC841Y</i> ; Cm ^R	ta praca

10	<i>H. pylori</i> N6 <i>secAC841Y_secA</i>	<i>htrAS221A/htrAwt</i> , <i>secAC841Y/secAwt</i> ; Cm ^R ; Kan ^R	ta praca
11	<i>H. pylori</i> N6 $\Delta htrA$	$\Delta htrA$, <i>secAC852Y</i> ; Kan ^R	[Zawilak-Pawlik 2019]
12	<i>H. pylori</i> N6 <i>secAC852Y</i>	$\Delta htrA/htrAwt$, <i>secAC852Y</i> ; Cm ^R	ta praca
13	<i>H. pylori</i> N6 <i>secAC852Y_secA</i>	$\Delta htrA/htrAwt$, <i>secAC852Y/secAwt</i> ; Cm ^R ; Kan ^R	ta praca
14	<i>H. pylori</i> N6 wt_ <i>secA</i>	szczep typu dzikiego z dodatkową kopią genu <i>secA</i>	
15	<i>H. pylori</i> N6 Δggt	Δggt ; Kan ^R	Kolekcja Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej UG

5.3. Plazmidy

Spis plazmidów wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 9.

Tabela 9. Plazmidy wykorzystywane w pracy.

L.p.	Nazwa	Charakterystyka	Źródło
1	pET28a(+)	promotor T7, operator <i>lac</i> , RBS, His•Tag®, miejsce cięcia przez trombinę, MCS, His•Tag®, terminator T7, <i>rop</i> , <i>lacI</i> ; Kan ^R	Novagen (Merck, Niemcy)

2	pET28SecAwt	pET28a(+), <i>SecAwt</i> _{HpN6} + His•Tag® w N-końcowej części genu; Kan ^R	ta praca
3	pET28SecAC843X	pET28a(+), <i>SecAC843X</i> _{HpN6} + His•Tag® w N-końcowej części genu; Kan ^R	ta praca
4	pET28SecAP858L	pET28a(+), <i>SecAP858L</i> _{HpN6} + His•Tag® w N-końcowej części genu; Kan ^R	ta praca
5	pET28SecAC841Y	pET28a(+), <i>SecAC841Y</i> _{HpN6} + His•Tag® w N-końcowej części genu; Kan ^R	ta praca
6	pET28SecAR837K	pET28a(+), <i>SecAR837K</i> _{HpN6} + His•Tag® w N-końcowej części genu; Kan ^R	ta praca
7	pET28SecAC852Y	pET28a(+), <i>SecAC852Y</i> _{HpN6} + His•Tag® w N-końcowej części genu; Kan ^R	ta praca
8	p608	promotor T7, operator <i>lac</i> , RBS, ramiona homologii do genów <i>hp_0999</i> i <i>hp_1000</i> , promotor <i>ure</i> , Amp ^R , Kan ^R	Kolekcja Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej UG
9	p608SecA	promotor T7, operator <i>lac</i> , RBS, ramiona homologii do genów <i>hp_0999</i> i <i>hp_1000</i> , promotor <i>ure</i> , <i>SecAwt</i> _{HpN6} , Amp ^R , Kan ^R	ta praca

5.4. Enzymy restrykcyjne

Spis enzymów restrykcyjnych wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 10.

Tabela 10. Enzymy restrykcyjne wykorzystywane w pracy.

Nazwa	Rozpoznawana sekwencja	Producent
DpnI	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ 5' \dots \text{G} \downarrow \text{ATC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CTA} \uparrow \text{G} \dots 5' \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	EurX (Polska)
XbaI	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{T} \downarrow \text{CTAGA} \dots 3' \\ 3' \dots \text{AGATC} \uparrow \text{T} \dots 5' \end{array} $	EurX (Polska)
NcoI	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{C} \downarrow \text{CATGG} \dots 3' \\ 3' \dots \text{GGTAC} \uparrow \text{C} \dots 5' \end{array} $	EurX (Polska)
XhoI	$ \begin{array}{c} 5' \dots \text{C} \downarrow \text{TCGAG} \dots 3' \\ 3' \dots \text{GAGCT} \uparrow \text{C} \dots 5' \end{array} $	EurX (Polska)

5.5. Podłoża mikrobiologiczne

Spis podłoży mikrobiologicznych wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 11.

Tabela 11. Spis podłoży mikrobiologicznych wykorzystywanych w pracy.

Nazwa	Skład (stężenia końcowe)
LB (pożywka Luria-Bertani)	1% trypton 1% NaCl 0,5% ekstrakt drożdżowy Jałowiono w autoklawie 115°C przez 20 minut.

LA (pożywka Luria-Agar)	1% trypton 1% NaCl 0,5% ekstrakt drożdżowy 1,5% agar Jałowiono w autoklawie 115°C przez 20 minut.
BHI (ang. <i>Brain Heart Infusion</i>)	3,7% BHI Jałowiono w autoklawie 115°C przez 20 minut. Kolejno dodawano do stężenia końcowego: 10% surowicy bydlęcej 1% mieszaniny witamin 0,1% koktajlu antybiotyków.
GC agar	3,6% GC agar base 1,5% protease pepton Jałowiono w autoklawie 115°C przez 20 minut. Kolejno dodano do stężenia końcowego: 10% surowicy końskiej 1% mieszaniny witamin 0,2% koktajlu antybiotyków.
BHI (ang. <i>Brain Heart Infusion</i>) pH 5,0	3,7% BHI Dodawano kwasu solnego do osiągnięcia wartości pH 5,0 i jałowiono w autoklawie 115°C przez 20 minut. Kolejno dodawano do stężenia końcowego: 10% surowicy bydlęcej 1% mieszaniny witamin 0,1% koktajlu antybiotyków

5.6. Antybiotyki

Spis antybiotyków wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 12.

Tabela 12. Antybiotyki wykorzystywane w pracy.

Nazwa	Stężenie końcowe	Zastosowanie	Producent
Chloramfenikol	8 µg/ml	selekcja rekombinantów <i>H. pylori</i> N6	Carl Roth (Niemcy)
Kanamycyna	50 µg/ml	selekcja rekombinantów <i>E. coli</i> DH5α lub BL21/DE3	Carl Roth (Niemcy)
	15 µg/ml	selekcja rekombinantów <i>H. pylori</i> N6	
Tetracyklina	0,05 µg/µl	wykonanie testów metodą dyskowo-dyfuzyjną	Sigma-Aldrich (USA)
Amoksycylina	0,025 µg/µl		ThermoScientific (USA)
Koktajl antybiotyków		dodatek do pożywek do hodowli <i>H. pylori</i>	
Wankomycyna	12,5 µg/ml		Carl Roth (Niemcy)
Trimetoprim	6,25 µg/ml		Sigma-Aldrich (USA)
Amfoterycyna	2,5 µg/ml		Carl Roth (Niemcy)
Polimyksyna B	0,3 µg/ml		Carl Roth (Niemcy)

5.7. Złoża chromatograficzne

Spis złoż chromatograficznych wykorzystywanych w pracy zamieszczono w Tabeli 13.

Tabela 13. Złoża chromatograficzne wykorzystywane w pracy.

Nazwa	Wykorzystanie	Producent
Ni ²⁺ -NTA Agarose	chromatografia metalopowinowactwa	Qiagen (Niemcy)
Superdex 200	filtracja żelowa	Cytiva (USA)

5.8. Peptydy i preparaty białkowe

- CytPep - MKKVIMALGVLAFLANALMATDVKALAKSSA (czystość: 79,6%)

Synteza peptydu została przeprowadzona przez firmę GenScript (USA).

- HpHtrAS221A - nieaktywne proteolityczne białko HtrA bakterii *H. pylori*

Preparat białkowy został uzyskany przez mgr Mateusza Weltrowskiego.

5.9. Przeciwciała

Charakterystykę przeciwciał wykorzystywanych w pracy przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Charakterystyka przeciwciał wykorzystywanych w pracy.

Nazwa	Organizm	Miano	Producent
anty-SecA	królicze	1:5000	uzyskane poprzez immunizację zwierząt oczyszczonym preparatem białka SecA <i>H. pylori</i> (Davids Biotechnologie, Niemcy)
anty-HP1021	królicze	1:10000	[183]
anty-gGT	królicze	1:5000	uzyskane poprzez immunizację zwierząt oczyszczonym preparatem białka gGT <i>H. pylori</i> (Davids Biotechnologie, Niemcy)
6*His,His-Tag Mouse Monoclonal antibody	mysie	1:2500	Proteintech (USA)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) CrossAdsorbed Secondary Antibody, HR	królicze	1:10000	ThermoScientific (USA)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) CrossAdsorbed Secondary Antibody, HRP	mysie	1:10000	ThermoScientific (USA)

5.10. Bufory i roztwory

Charakterystykę buforów wykorzystywanych w pracy umieszczono w Tabeli 15.

Tabela 15. Spis buforów wykorzystywanych w pracy.

Nazwa	Zastosowanie	Skład
TAE 1x	elektroforeza agarozowa	40 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA 20 mM kwas octowy
bufor obciążający do DNA	elektroforeza agarozowa	0,25% w/v błękit bromofenolowy 0,25% w/v cyjanol ksylenowy 30% v/v glicerol
bufor żelu górnego	elektroforeza poliakrylamidowa białek	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% w/v SDS
bufor żelu dolnego	elektroforeza poliakrylamidowa białek	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% w/v SDS
bufor lizujący redukujący	elektroforeza poliakrylamidowa białek	0,24 M Tris-HCl, pH 6,8 8% w/v SDS 40% v/v glicerol 10% v/v β -merkaptotoetanol 0,004% w/v błękit bromofenolowy
bufor lizujący do zymografii	zymografia	0,24 M Tris-HCl, pH 6,8 4% w/v SDS 40% v/v glicerol 0,004% w/v błękit bromofenolowy

roztwór akrylamidów	elektroforeza poliakrylamidowa białek	30% w/v akrylamid 0,8% w/v bisakrylamid
bufor elektrodowy 10x	elektroforeza poliakrylamidowa białek	0,025 M Tris, pH 8,0 0,192 M glicyna 0,1% (w/v) SDS
roztwór błękitu brylantowego CBB-R250	elektroforeza poliakrylamidowa białek	0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250 10% v/v kwas octowy 20% v/v metanol
roztwór błękitu brylantowego CBB-G250	zymografia	0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250 10% v/v kwas octowy 20% v/v metanol
roztwór odbarwacza do błękitu brylantowego	elektroforeza poliakrylamidowa białek	10% v/v kwas octowy 20% v/v metanol
bufor do transferu	analiza białek metodą immunoblottingu	25 mM Tris 150 mM glicyna 20% metanol
TBS-T	analiza białek metodą immunoblottingu	25 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM NaCl 0,05% Tween-20
BH10 z inhibitorami proteaz	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 20 mM imidazol 1x cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail

BH10	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 10 mM imidazol
BH20	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 20 mM imidazol
BH50	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 50 mM imidazol
BH100	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 100 mM imidazol
BH200	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 200 mM imidazol
BH300	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 300 mM imidazol
BH500	oczyszczanie białek	50 mM HEPES, pH 8,0 300 mM KCl 500 mM imidazol
bufor A	oczyszczanie białek	50 mM Tris, pH 7,0 150 mM NaCl
roztwór odbarwacza do czerni amidowej	oznaczanie stężenia białek	20 objętości kwasu octowego 25 objętości izopropanolu 65 objętości wody destylowanej

roztwór czerni amidowej	oznaczanie stężenia białek	0,1% w/v czerni amidowa w odbarwiaczu do czerni amidowej
bufor B	analiza metodą dichroizmu kołowego	10 mM NaHPO ₄ , pH 7,0 100 mM NaCl
bufor C	analiza metodą ultrawiwowania analitycznego	50 mM Tris, pH 7,0 150 mM NaCl 2 mM TCEP
bufor L	przygotowanie liposomów	25 mM HEPES, pH 7,0 50 mM KCl
roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem (PBS ang. <i>phosphate buffered saline</i>)	zawieszanie komórek <i>H. pylori</i>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KHPO ₄
bufor do renaturacji	zymografia	2,5% Triton X-100
bufor do wywoływania	zymografia	50 mM Tris, pH 7,5 200 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,02% Brij-35
bufor do aktywności	oznaczanie aktywności enzymatycznej białka	25 mM HEPES, pH 7,0 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml BSA 1 mM DTT - bufor filtrowano (średnica porów 0,22 μm)

bufor do oznaczania aktywności gGT	pomiary aktywności γ -glutamylotransferazy (gGT)	25 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl
roztwór witamin	hodowla <i>H. pylori</i>	10% dekstroza 1% L-glutamina 2,6% L-cysteina 0,01% kokarboksylaza 0,002% azotan żelaza 0,0003% tiamina/HCl 0,0013% kwas p-aminobenzoowy 0,025% NAD ⁺ 0,001% witamina B12 0,11% L-cystyna 0,1% adenina 0,003% guanina/HCl 0,015% L-arginina 0,05% uracyl 0,555% HCl - roztwór filtrowano (średnica porów 0,22 μ m)

5.11. Odczynniki, materiały i aparatura

W pracy wykorzystano następujące odczynniki i materiały:

10 mM mieszanina deoksyrybonukleotydów „dNTPmix” - EURx, Polska

2,5 mM mieszanina deoksyrybonukleotydów - Takara, Japonia

Agaroza LE - Prona, Hiszpania

akrylamid - Sigma-Aldrich, USA

amfoterycyna - Carl Roth, Niemcy

APS (nadsiarcezan amonu) - Sigma-Aldrich, USA

ATP - Sigma-Aldrich, USA

Bacto-trypton - Difco, USA

barwnik DNA Simply Safe - EurX, Polska

BHI broth - Oxoid, Wielka Brytania

bibuła Whatman 3 mm - Whatmann, USA

Bis-akrylamid (N,N' - metylenobisakrylamid) - Sigma-Aldrich, USA

błękit bromofenolowy - Sigma-Aldrich, USA

β -merkaptotoetanol - Serva, Niemcy

Brij-35 - Sigma-Aldrich, USA

BSA (albumina surowicy bydlęcej) - Sigma-Aldrich, USA

bufor 5x Green - ThermoScientific, USA

bufor 5x GXL - Takara, Japonia

bufor do DNazy - A&A Biotechnology, Polska

chloramfenikol - A&A Biotechnology, Polska

chlorek magnezu ($MgCl_2$) - Blirt, Polska

chlorek sodu ($NaCl$) - Stanlab, Polska

chlorek wapnia ($CaCl_2$) - Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska

Coomassie Brilliant Blue G-250 - Sigma-Aldrich, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250 - Sigma-Aldrich, USA

cyjanol ksylenowy - Biorad, Singapur

czerni amidowa - Merck, Niemcy

disodu wodorofosforan - Sigma-Aldrich, USA

diwodorofosforan sodu - Sigma-Aldrich, USA

DMSO - Sigma-Aldrich, USA

DNAza - A&A Biotechnology, Polska

DTT (ditiotreitol) - Sigma-Aldrich, USA

EDTA (etylenodiaminotetraoctan sodu) - Sigma-Aldrich, USA

ekstrakt drożdżowy - Difco, USA

etanol - POCh, Polska

FCS - BioWest, Francja

filtry nitrocelulozowe, średnica porów 0,22 µm - Sartorius, Wielka Brytania

filtry strzykawkowe, średnica porów 0,22 µm - Googelab, Polska

GC agar base - Oxoid, Wielka Brytania

glicerol - Chempur, Polska

glicyna – POCh. Polska

glicyloglicyna - Sigma-Aldrich, USA

guanina/HCl - Sigma-Aldrich, USA

HEPES (kwas 4-(2-hydroksyetylo) -1-piperazynoetanosulfonowy) - Carl Roth, Niemcy

imidazol - Sigma-Aldrich, USA

immobilon P, PVDF - Sigma-Aldrich, USA

IPTG (izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd) – A&A Biotechnology, Polska

izopropanol - POCh., Polska,

kanamycyna - Carl Roth, Niemcy

koktajl inhibitorów proteaz (cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) - Roche, Szwajcaria

kwas chlorowodorowy (HCl) - Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska

kwas mrówkowy (HCOOH) - Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska

kwas octowy (CH₃COOH) - Chempur, Polska

kwas p-aminobenzoowy - Sigma-Aldrich, USA

kwas siarkowy (H₂SO₄) - Avantor Performance Materials Poland S.A., Polska

kwaśny fenol - Carl Roth, Niemcy

L-arginina - Sigma-Aldrich, USA

L-cysteina - Sigma-Aldrich, USA

L-cystyna - Sigma-Aldrich, USA

L-glutamina - Sigma-Aldrich, USA

lizozym - Carl Roth, Niemcy

L-γ-Glutamyl-p-nitroanilide (gGpNA) - Sigma-Aldrich, USA

marker DNA - Thermo Fisher Scientific, USA

membrana nitrocelulozowa - GE Healthcare, USA

membrany dializacyjne - Sigma-Aldrich, USA

metanol - POCh., Polska,

mocznik - Sigma-Aldrich, USA

płytki 96-dółkowe - Nest Scientific, USA

polimeraza ColorTaqMasterMIX - EurX, Polska

polimeraza DNA Phusion - ThermoScientific, USA

polimeraza DNA PrimeStar GXL - Takara, Japonia

polimyksyna B - Carl Roth, Niemcy

proteose peptone - Oxoid, Niemcy

ROTI-Block - Carl Roth, Niemcy

RotiNanoQant - Carl Roth, Niemcy

SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu) - Sigma-Aldrich, USA

siarczan amonu (NH_3SO_4) - Stanlab, Polska

SimplySafe – EurX, Polska

surowica końska - BioWest, Francja

TCEP (tris(2-karboksyetylo)fosfina) - Apollo Scientific, Wielka Brytania

TEMED (N,N,N',N' – tetrametyletylenodiamina) - Blirt, Polska

tiamina/HCl - Sigma-Aldrich, USA

trimetoprim - Sigma-Aldrich, USA

Tris (trihydroksyetylenoaminometan) - Sigma-Aldrich, USA

Triton X-100 - Sigma-Aldrich, USA

trypton - BD, Francja

tween 20 - Sigma-Aldrich, USA

uracyl - Sigma-Aldrich, USA

wankomycyna - Carl Roth, Niemcy

witamina B12 - Sigma-Aldrich, USA

wodorotlenek sodu (NaOH) - Sigma-Aldrich, USA

wzorzec masy molekularnej białek - ThermoScientific, USA

wzorzec masy molekularnej białek do immunoblottingu - ThermoScientific, USA

Zestaw do izolacji DNA z żelu agarazowego „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” - Macherey Nagel, Niemcy

Zestaw do izolacji genomowego DNA „Genomic Mini” - A&A Biotechnology, Polska

Zestaw do izolacji RNA „RNA Mini Plus” - A&A Biotechnology, Polska

Zestaw do oczyszczania plazmidów „Plasmid Midi” – A&A Biotechnology, Polska

Zestaw do oczyszczania plazmidów „Plasmid Mini” – A&A Biotechnology, Polska

Zestaw do odwrotnej transkrypcji „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” - ThermoScientific, USA

Zestaw Malachite Green Phosphate Assay - Sigma Aldrich, USA

Zestaw AzureSpectra Fluorescent Western Blot Kit - Azure Biosystems, USA

β-kazeina - Sigma-Aldrich, USA

Aparatura:

Spektrofotometr VIS 7220G - RAYLEIGH, Chiny

Spektrofotometr UV-VIS Hitachi U-5100 - Hitachi, Japonia

Spektrofotometr NanoDrop - ThermoScientific, USA

Czytnik mikropłytek Enspire (Perkin Elmer, USA

Termocykler LightCycler 96 i LightCycler 480 - Roche, Szwajcaria

Termocykler T100 Thermal Cycler - Bio-Rad, USA

6. Metody

6.1. Warunki hodowli bakteryjnych

6.1.1. Hodowla bakterii *E. coli*

Z hodowli na podłożu stałym LA (Materiały 5.5.) pobierano pojedynczą kolonię bakteryjną i umieszczano w 15 ml podłoża płynnego. Hodowano z wytrząsaniem 180 rpm przez 12 godzin w temperaturze 37°C. Następnego dnia hodowlę odmładzano w stosunku 1:50 i hodowano z wytrząsaniem 180 rpm w temperaturze 37°C.

6.1.2. Sporządzanie konserw szczepów *E. coli*

W 150 µl 100% glicerolu zawieszano 850 µl hodowli nocnej *E. coli*. Konserwy przechowywano w temperaturze -80°C.

6.1.3. Hodowla *H. pylori* na podłożu stałym

Na szalkę Petriego z podłożem stałym GC agar (Materiały 5.5.) наносono zawiesinę bakteryjną z konserwy glicerolowej formując niewielki kolisty obszar. Następnie szalki umieszczano w szczelnych słojach i przeprowadzano wymianę gazową z wykorzystaniem aparatury Anoxomat System AN2CTS (Advanced Instruments, USA) do uzyskania mieszaniny gazów: (6% tlen, 7,1% dwutlenek węgla, 3,6% wodór, 83,3% azot). Bakterie inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C po czym jałową eżą rozprowadzano wyrosłe bakterie na całą powierzchnię płytki i inkubowano w tych samych warunkach przez 24 godziny.

6.1.4. Hodowla *H. pylori* w podłożu płynnym

Pożywkę płynną BHI (Materiały 5.5.) umieszczano w słoju umożliwiającym wymianę gazową i ogrzewano do temperatury 37°C przez 2 godziny. Bakteriami wyrosłymi na podłożu stałym (Metody 6.1.3.) zaszczepiano wcześniej ogrzaną pożywkę BHI do uzyskania gęstości optycznej $OD_{595nm} \sim 0,5$ i wymieniano atmosferę na mikrotlenową (6% tlen, 7,1% dwutlenek węgla, 3,6% wodór, 83,3% azot). Hodowlę prowadzono przez 4-6 godzin w 37°C z wytrząsaniem (140 rpm). Następnie oznaczano gęstość optyczną hodowli (OD_{595nm}) i rozcieńczano do $OD_{595nm}=0,05$ (co odpowiada $8,0 \times 10^7$ CFU/ml) lub $OD_{595nm}=0,005$ ($8,0 \times 10^6$ CFU/ml). Inkubację kontynuowano przez 12 godzin do osiągnięcia fazy logarytmicznej wzrostu ($OD_{595nm} \sim 0,5$).

6.1.5. Sporządzanie konserw szczepów *H. pylori*

Bakterie *H. pylori* wyrosłe na szalkach Petriego (Metody 6.1.3.) zawieszano w 1 ml pożywki BHI z 20% glicerolem (Materiały 5.5.) za pomocą jałowej wymazówki. Konserwy przechowywano w temperaturze -80°C.

6.2. Wyznaczenie krzywych wzrostu szczepów *H. pylori*

Hodowlę płynną *H. pylori* przygotowywano jak opisano w Metody 6.1.4. Hodowlę rozcieńczano do $OD_{595nm}=0,005$ (co odpowiada $8,0 \times 10^6$ CFU/ml) i inkubowano z wytrząsaniem przez 44 godziny w temperaturze 37°C. Gęstość optyczną OD_{595nm} hodowli mierzono co 3-4 godziny w zakresach 15-42 godzin wzrostu. Sporządzano wykresy zależności absorbancji (A_{595nm}) do czasu inkubacji.

6.3. Transformacja komórek *H. pylori*

Z hodowli *H. pylori* na podłożu stałym (Metody 6.1.3.) pobierano niewielką ilość bakterii i przenoszono na podłoże GC Agar (Materiały 5.5.) w formie okręgów o średnicy 1 cm. Następnie płytki umieszczano w szczelnych słojach i przeprowadzano wymianę gazową. Bakterie inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji, na bakterie nanoszono od 3 do 5 µg DNA (plazmidowego lub liniowego) przeznaczonego do transformacji i inkubowano przez 24 godziny w 37°C. Następnie, bakterie przenoszono na podłoże z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego (Materiały 5.6.) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 3-5 dni. Wyrosłe pojedyncze kolonie przenoszono na nowe płytki z antybiotykiem selekcyjnym i inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin, po czym rozprowadzano je na większej powierzchni płytki i inkubowano kolejne 24 godziny. Z wyrosłych bakterii przygotowywano konserwy bakteryjne (Metody 6.1.5.), wykonywano kolonijny PCR (Metody 6.11.) i izolowano genomowe DNA (Metody 6.6.) w celu selekcji i potwierdzenia poprawności wprowadzonych mutacji genetycznych.

6.4. Transformacja komórek bakteryjnych metodą chlorkową

6.4.1. Przygotowanie komórek kompetentnych

Pojedynczą kolonią szczepu bakteryjnego *E. coli* DH5 α lub BL21 wyrosłą na podłożu LA (Materiały 5.5.) zaszczipiano 15 ml pożywki płynnej LB i inkubowano z wytrząsaniem w 37°C przez 16 godzin. Hodowlę rozcieńczano w stosunku 1:50 i inkubowano z wytrząsaniem w 37°C do uzyskania gęstości optycznej OD_{595nm}=0,4–0,5. Następnie wirowano po 1,5 ml hodowli przez 5 minut przy prędkości 1680 x g. Supernatant usuwano a osad zawieszano w 0,5 ml zimnego 0,1 M roztworu chlorku wapnia i wirowano przez 5 minut przy takiej samej prędkości. Supernatant usuwano, a osad ponownie zawieszano w 0,1 ml zimnego chlorku wapnia i dodawano glicerolu do stężenia końcowego 20% v/v. Uzyskane w ten sposób komórki zamrażano w -80°C.

6.4.2. Transformacja

Do komórek kompetentnych dodawano 1 μ l plazmidowego DNA lub 5-10 μ l produktów reakcji PCR po trawieniu enzymem restrykcyjnym DpnI (Metody 6.12.) i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie mieszaniny poddawano szokowi termicznemu w temperaturze 42°C przez 90 sekund, po czym przenoszono je na lód i ponownie inkubowano 30 minut. Po tym czasie do mieszanin dodawano 1 ml pożywki LB i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie na płytce z podłożem LA, wzbogacone odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym, wysiewano po 100 μ l zawiesiny bakteryjnej. Pozostałe bakterie wirowano przez 5 minut przy prędkości 1 680 x g, supernatant zlewano a osady zawieszano w 100 μ l pożywki LB i całość wysiewano na podłoża selekcyjne. Równolegle wykonywano kontrolę negatywną transformacji - komórki kompetentne, do których nie dodano plazmidu wysiewano na podłoże LA z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego. Płytki inkubowano przez 12-16 h w 37°C.

6.5. Izolacja plazmidowego DNA

Plazmidowe DNA izolowano z osadu uzyskanego z 3 ml hodowli nocnej przy użyciu zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology, Polska) lub z osadu uzyskanego ze 100 ml hodowli nocnej przy użyciu zestawu Plasmid Midi (A&A Biotechnology, Polska). Plazmidowe DNA eluowano 50 μ l (Plasmid Mini) lub 200 μ l (Plasmid Midi) wody dejonizowanej. Stężenie wyizolowanych plazmidów mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop (ThermoScientific, USA) i przechowywano w -20°C.

6.6. Izolacja genomowego DNA z bakterii *H. pylori*

Genomowe DNA izolowano przy użyciu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska). DNA oczyszczano z hodowli na podłożu stałym (Metody 6.1.3) zawieszanej w 1 ml roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanem PBS (Materiały 5.10) lub z hodowli w podłożu płynnym (Metody 6.1.4.) według instrukcji załączonej przez producenta. Genomowe DNA eluowano 200 μ l wody dejonizowanej i przechowywano w temperaturze -20°C.

6.7. Sekwencjonowanie genomu bakterii *H. pylori*

Z hodowli *H. pylori* w podłożu płynnym (Metody 6.1.4.), znajdującej się w później logarytmicznej fazie wzrostu ($OD_{595nm} \sim 0,6-0,7$), pobierano 300 μ l i umieszczano w probówce 1,5 ml. Następnie do probówek dodawano 400 μ l Tissue and Cell Lysis Solution (LGC Biosearch Technologies, Wielka Brytania) i 6 μ l Proteiny K (EurX, Polska) (stężenie końcowe w reakcji: 0,18 mg/ml). Mieszaniny intensywnie mieszano przez 10 sekund, po czym inkubowano w temperaturze 65°C przez 30 minut. Po upływie wyznaczonego czasu mieszaninę schładzano w lodzie przez 5 minut, dodawano 2 μ l RNazy (5 μ g/ μ l) (EurX, Polska) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie przez 10 minut w temperaturze 65°C. Mieszaninę ponownie schładzano w lodzie, a następnie dodawano 300 μ l MPC Protein Precipitation Reagent (LGC Biosearch Technologies, Wielka Brytania) i intensywnie mieszano przez 10 sekund. Następnie, mieszaniny wirowano przez 10 minut przy prędkości 8000 x g, supernatant przenoszono do nowych probówek, dodawano 500 μ l izopropanolu i inkubowano przez 15 godzin w temperaturze -80°C. Po inkubacji mieszaninę wirowano przez 20 minut przy prędkości 13 171 x g, supernatant usuwano a do osadów dodawano 700 μ l 70% etanolu i ponownie wirowano przez 40 minut przy prędkości 13 171 x g. Supernatant usuwano, a do osadów dodawano 500 μ l 70% etanolu i wirowano 20 minut przy prędkości 13 171 x g. Supernatant usuwano, a osady suszono pod próżnią przez 20 minut. Osady zawieszano w 30 μ l jałowej wody, inkubowano przez 15 minut w 37°C, po czym pozostawiano w temperaturze pokojowej do czasu całkowitego rozpuszczenia się osadu. Wyizolowane genomowe DNA przechowywano w -80°C. Ilość DNA i jakość próbek potwierdzano poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm oraz ocenę współczynników A260/A280 (~ 2) i A260/A230 (>2), a także poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Sekwencjonowanie DNA zlecano firmie Genomed S.A. (Polska).

6.8. Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie metodą Sangera było wykonywane przez zewnętrzną firmę (Eurofins, Luksemburg). Do sekwencjonowania wysyłano próbki plazmidowego DNA oczyszczone przy użyciu zestawu DNA Plasmid Mini (Metody 6.5.) lub liniowe fragmenty DNA po izolacji z żelu agarozowego (Metody 6.16.) ze specyficznymi starterami (Materiały 5.1, Tabela 6).

6.9. Reakcja PCR (ang. *polymerase chain reaction*)

Skład mieszaniny reakcyjnej łańcuchowej reakcji polimerazy przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Składnik mieszaniny	Stężenie w mieszaninie	Dodawana objętość [μl]
polimeraza PrimeStar GXL (1,25 U/μl)	0,025 U/μl	1
bufor reakcyjny PrimeStar GXL (5x stężony)	1x stężony	10
mieszanina deoksyrybonukleotydów dNTP (2,5 mM)	0,2 mM	4
starter przedni (10 μM)	0,2 μM	2
starter wsteczny (10 μM)	0,2 μM	2
genomowe DNA lub plazmidowe DNA - matryca	1 ng/μl	1-2
woda		do 50

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), według następujących parametrów:

1. Wstępna denaturacja DNA – 2 min., 98°C.
2. Denaturacja DNA – 10 sekund, 95°C
3. Hybrydyzacja starterów do matrycowego DNA – 15 sekund, 55–68°C*
4. Elongacja DNA – 1 minuta/kbp, 68°C
5. Końcowa elongacja DNA – 10 min., 68°C

Etapy 2-4 były powtarzane 30 razy.

*temperatura hybrydyzacji była dostosowywana do temperatury topnienia starterów

6.10. Reakcja PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków - OE-PCR (ang. *overlap extension polymerase chain reaction*)

Skład mieszaniny reakcyjnej dla PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków (OE-PCR) przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków.

Składnik mieszaniny	Końcowe stężenie w mieszaninie	Dodawana objętość [μl]
polimeraza Phusion (2 U/μl)	0,02 U/μl	0,2
bufor reakcyjny Green HF 5x stężony	1x stężony	4
mieszanina deoksyrybonukleotydów dNTP (10 mM)	0,2 mM	0,4
insert DNA	5 ng/μl	w zależności od stężenia
DNA plazmidowe	1 ng/μl	w zależności od stężenia
woda		do 20

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), według następujących parametrów:

1. Wstępna denaturacja DNA – 30 sekund, 98°C
2. Denaturacja DNA – 10 sekund, 98°C
3. Hybrydyzacja insertu do plazmidowego DNA – 30 sekund, 60°C
4. Elongacja DNA – 30 sekund/kbp, 72°C
5. Końcowa elongacja DNA – 10 min., 72°C

Etapy 2-4 były powtarzane 30 razy.

6.11. Kolonijna reakcja PCR - selekcja mutantów przez analizę PCR przy wykorzystaniu kolonii bakteryjnych

Pojedyncze kolonie wyrosłe po transformacji komórek *E. coli* (Metody 6.4.) zawieszano w 20 µl wody jałowej po czym pobierano 3 µl zawiesiny, dodawano do 100 µl pożywki LB i przechowywano w temperaturze 4°C do dalszych analiz. Zawiesinę przygotowaną w wodzie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 95°C po czym wirowano przez 10 minut przy prędkości 13 171 x g. Uzyskany supernatant wykorzystywano jako matrycę do kolonijnego PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej dla kolonijnego PCR przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej do kolonijnego PCR

Składnik mieszaniny	Stężenie w mieszaninie	Dodawana objętość [µl]
ColorTaq PCR Master Mix 2x stężony	0,05 U/µl polimerazy Taq 1x bufor reakcyjny (1,5 mM MgCl ₂)	4
starter przedni (10 µM)	0,5 µM	0,4
starter wsteczny (10 µM)	0,5 µM	0,4
matryca	<0,01 µg/µl	3,2
woda		do 8

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), według następujących parametrów:

1. Wstępna denaturacja DNA – 5 min., 95°C
2. Denaturacja DNA – 20 sekund, 95°C
3. Hybrydyzacja insertu do plazmidowego DNA – 35 sekund, 60°C
4. Elongacja DNA – 1 min./kbp, 72°C
5. Końcowa elongacja DNA – 7 min., 72°C

Etapy 2-4 były powtarzane 30 razy.

Produkty reakcji rozdzielano w żelu agarozowym (Metody 6.15.) w celu selekcji rekombinantów. Zawiesiny z wybranych klonów po selekcji posłużyły do założenia hodowli nocnej, z której izolowano plazmidowe DNA (Metody 6.5.).

6.12. Trawienie DpnI

Enzym DpnI trawi nici DNA, które są zmetylowane. Podczas wprowadzania mutacji za pomocą techniki PCR, wykorzystywano go do eliminacji niezmutowanego DNA matrycowego. Do mieszaniny po reakcji PCR o objętości 25 µl dodawano 5 U enzymu DpnI i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Następnie mieszaninę transformowano komórki kompetentne DH5α (Metody 6.4.).

6.13. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Przygotowywano mieszaniny reakcyjne zawierające około 1 µg plazmidowego DNA, 2U wybranego enzymu restrykcyjnego (XbaI, NcoI, XhoI) (Materiały 5.4.), 2 µl buforu ONE 10x, 0,2 µl BSA 100x i dopełniano wodą dejonizowaną do objętości 20 µl. W przypadku trawienia tej samej matrycy dwoma enzymami restrykcyjnymi, do mieszaniny dodawano obydwa enzymy jednocześnie. Mieszaniny inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C a następnie inaktywowano przez 20 minut w temperaturze 65°C. Po inkubacji mieszaniny poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu agarozowym (Metody 6.15.) w celu analizy restrykcyjnej plazmidów.

6.14. Analiza ekspresji genów *H. pylori*

6.14.1. Izolacja RNA

Do hodowli płynnych *H. pylori* w logarytmicznej fazie wzrostu (Metody 6.1.4.) dodawano 5% roztwór kwaśnego fenolu w 100% etanolu do stężenia końcowego w hodowli 10% i przenoszono na lód. Następnie wirowano po 6 ml hodowli (4°C, 2 352 x g, 10 minut). Osady zawieszano w 400 µl roztworu fenozolu i izolowano RNA zestawem RNA Mini Plus (A&A Biotechnology, Polska) według protokołu producenta. Ilość i jakość próbek potwierdzono poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm oraz ocenę współczynników A260/A280 (~2) i A260/A230 (>2), a także poprzez elektroforezę w żelu agarozowym (Metody 6.15.). Uzyskane preparaty RNA rozdzielano w 1% żelu agarozowym uprzednio poddanym działaniu 0,6% podchlorynu sodu.

W celu uzyskania RNA z hodowli poddanych warunkom stresowym, do hodowli *H. pylori* w logarytmicznej fazie wzrostu (Metody 6.1.4.) dodawano wybrane czynniki stresowe: SDS - stężenie końcowe w hodowli 0,003%; NaCl - stężenie końcowe w hodowli - 0,3 M; etanol - stężenie końcowe w hodowli - 5% i inkubowano z wytrząsaniem przez godzinę. W warunkach stresu pH, hodowle wirowano (10 min, 4 000 x g, 37°C), a następnie zawieszano w 10 ml pożywki BHI o pH 5,0 (Materiały 5.5.) i inkubowano z wytrząsaniem przez 1 godzinę. Każde z doświadczeń przeprowadzano w co najmniej pięciu powtórzeniach biologicznych.

6.14.2. Trawienie DNazą

Wyizolowane preparaty RNA poddawano trawieniu DNazą (A&A Biotechnology, Polska). Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do trawienia przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia DNazą.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość	Stężenie końcowe
DNAza I (10 U/ μ l)	2 μ l	1 U/ μ l
bufor reakcyjny (10x stężony)	2 μ l	1x stężony
RNA	5 μ g	0,25 μ g/ μ l
Woda wolna od nukleaz	do objętości końcowej 20 μ l	

Reakcję przeprowadzano w temperaturze 37°C przez 25 minut. Następnie, próbki inkubowano w temperaturze 75°C przez 10 minut.

6.14.3. Odwrotna transkrypcja

Przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR ang. *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, USA) zgodnie z protokołem producenta (Tabela 20).

Tabela 20. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość [μl]	Stężenie końcowe
RNA	2,4	30 ng/μl
losowe heksamery [d(N)6] (100 mM)	1	5 mM
bufor reakcyjny (5x stężony)	4	1x stężony
RiboLock inhibitor RNAzy (20 U/μl)	1	1 U/μl
dNTPs (10mM)	2	1 mM
transkryptaza RevertAid (200 U/μl)	1	10 U/μl
woda wolna od nukleaz	8,6	
objętość końcowa: 20 μl		

RNA inkubowano z losowymi heksamerami [d(N)6] i wodą wolną od nukleaz przez 5 minut w 65°C, a następnie schładzano w lodzie. Po dodaniu pozostałych składników, mieszaninę inkubowano 5 minut w 25°C, godzinę w 45°C, a następnie inaktywowano enzym w 70°C przez 5 minut. Przygotowane cDNA rozcieńczano trzykrotnie wodą wolną od nukleaz i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

6.14.4. Ilościowa reakcja PCR (qPCR ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

W ilościowej reakcji PCR jako matrycę wykorzystywano cDNA (Metody 6.14.3.) lub genomowe DNA (Metody 6.6.). Do każdej próby zawierającej 0,5 μl cDNA dodawano 4,5 μl wody wolnej od nukleaz. Wydajność amplifikacji starterów oceniano na podstawie reakcji, w których matrycą były seryjne rozcieńczenia DNA, natomiast poziom ekspresji genów analizowano przy użyciu cDNA. Startery użyte w reakcjach (Materiały 5.1., Tabela 7) zostały zaprojektowane przy użyciu oprogramowania Primer3 4.1.0.

Skład mieszaniny do ilościowej reakcji PCR przedstawiono w Tabeli 21.

Tabela 21. Skład mieszaniny qPCR.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość [μl]
matrycowe DNA/cDNA	2
SG qPCR Master Mix (EurX, Polska)	5
specyficzne startery	0,2 uM
woda dejonizowana	Do objętości końcowej 10 μl

Do dołków płytki 96-dołkowej dodawano 8 μl mieszaniny zawierającej: SG qPCR Master Mix (EurX, Polska), specyficzne startery (Materiały 5.1., Tabela 7) i wodę dejonizowaną, a następnie 2 μl cDNA lub rozcieńczonego genomowego DNA. Reakcję qPCR przeprowadzano w urządzeniu LightCycler 96 lub LightCycler 480 (Roche, Szwajcaria) według następujących parametrów:

Denaturacja wstępna: 95°C, 5 minut

Denaturacja: 95°C, 15 sekund

Hybrydyzacja: 62°C, 20 sekund

Elongacja: 72°C, 16 sekund (45 cykli)

Analizę krzywej topnienia przeprowadzono na końcu każdego cyklu, przy następujących parametrach: 95°C przez 10 sekund, 65°C przez 60 sekund i 97°C przez 1 sekundę. Wszystkie eksperymenty qPCR przeprowadzono dla co najmniej pięciu powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych dla każdej reakcji.

Uwzględniano dwie kontrole negatywne w 3 powtórzeniach technicznych: NTC (ang. *no template control*) i NRT (ang. *no reverse transcriptase control*). Dla genów badanych na matrycy cDNA określano punkt progowy (Cq), a wyniki uśredniano dla trzech powtórzeń technicznych. Analizy qPCR prowadzono zgodnie z wytycznymi MIQE (ang. *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) [184]. Do normalizacji testowano stabilność siedmiu genów referencyjnych: *era*, *gyrA*, *gyrB*, *dnaG*,

ftsZ, *adk* i *gmk* za pomocą programu geNorm (wersja 2020). Do oceny relatywnej ekspresji badanych genów stosowano metodę Pfaffl- $\Delta\Delta C_t$ z korektą wydajności PCR [185]. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009 (wersja 2009, [186], Qiagen, Hilden, Niemcy).

6.15. Elektroforeza agarozowa DNA

Przygotowywano 0,7-1% żele agarozowe w 1x stężonym buforze TAE (Materiały 5.10.). Do żeli dodawano odczynnik SimplySafe (0,025 μ l/ml żelu). Do prób przeznaczonych do rozdziału dodawano bufor obciążający do stężenia końcowego 1x i nanoszono do studzienek w żelu. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 9 V na 1 cm żelu przez 0,5-1 godzinę. Dokumentację fotograficzną po rozdziale elektroforetycznym przeprowadzano w urządzeniu Azure 400 (Azure Biosystems, USA) w świetle ultrafioletowym o długości fali $\lambda = 365$ nm.

6.16. Izolacja DNA z żelu agarozowego

Po rozdziale elektroforetycznym w 0,7% żelu agarozowym (Metody 6.15.) wycinano wybrane fragmenty DNA i izolowano z wykorzystaniem zestawu PCR clean-up and Gel extraction (Macherey Nagel, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

6.17. Przygotowanie lizatów bakteryjnych do rozdziału SDS-PAGE

Wirowano 0,5 ml hodowli bakteryjnej przy 1680 x g przez 5 minut. Następnie supernatant usuwano, a osad zawieszano w odpowiedniej objętości 2x buforu lizującego (Materiały 5.10.), obliczonej na podstawie wzoru:

$$\frac{(OD \times Va)}{0,01} = Vb, \text{ gdzie:}$$

OD – gęstość optyczna (ang. *optical density*) hodowli, mierzona przy 595 nm

Va – objętość hodowli poddawanej wirowaniu (ml)

Vb – objętość buforu lizującego (2×LB) dodawanego do osadu bakteryjnego (μ l)

Próbki inkubowano przez 5 minut w 95°C, a następnie analizowano po 2 μ l metodą elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 6.18).

6.18. Jednokierunkowa elektroforeza poliakrylamidowa białek z SDS (SDS-PAGE)

Tabela 22. Skład żeli poliakryloamidowych - na 1 żel.

Składnik	Żel zagęszczający górny	Żel rozdzielający dolny 8%	Żel rozdzielający dolny 12%
bufor żelu górnego	0,4 ml	-	-
bufor żelu dolnego	-	1,2 ml	1,2 ml
roztwór akrylamidów 30%	0,25 ml	1,35 ml	2 ml
woda	1 ml	2,45 ml	1,8 ml
10% APS	10 ul	50 ul	25 ul
TEMED	5 ul	10 ul	12,5 ul

Mieszaninę żelu rozdzielającego (Tabela 22) wylewano pomiędzy dwie szklane płytki, nanoszono warstwę wody i zostawiano do spolimeryzowania. Wodę zlewano i nawarstwiano żel rozdzielający wraz z grzebieniem formującym studzienki. Po spolimeryzowaniu płytki montowano w aparacie do elektroforezy poliakrylamidowej (Mini-PROTEAN, Bio-Rad, USA) i zalewano buforem elektrodowym (Materiały).

Próby do rozdziału przygotowywano poprzez zmieszanie odpowiedniej objętości roztworu białka z buforem lizującym redukującym 4x stężonym (Materiały 5.10.) i wodą. W przypadku rozdziału całych lizatów bakteryjnych próby przygotowywano według (Metody 6.17.). Próby wirowano, inkubowano w temperaturze 95°C przez 5 minut i nanoszono do studzienek. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 120 V a następnie, po wejściu prób w żel rozdzielający zwiększano napięcie do 200V. Po rozdziale żele poddawano barwieniu błękitem brylantowym CBB-R250 (Metody 6.20.) lub analizie metodą immunoblotingu (Metody 6.21.).

6.19. Zymografia kazeinowa

Bakterie *H. pylori* z hodowli na podłożu stałym (Metody 6.1.3.) zawieszano w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) (Materiały 5.10.) i wirowano przez 5 minut przy prędkości 1680 x g. Następnie supernatant usuwano, a osad zawieszano w odpowiedniej objętości 2x buforu SDS do zymografii (Materiały 5.10.), obliczonej na podstawie wzoru (Metody 6.17.). Pobierano po 4 ul prób i nanoszono na 8% żel SDS-PAGE (Metody 6.18.) zawierającego 0,1% kazeiny (Invitrogen, Niemcy) i rozdzielano przy napięciu 150 V. Przed dodaniem do żelu, kazeinę inkubowano w 37°C przez 10 minut. Po rozdziale, żel inkubowano w buforze do renaturacji (Materiały 5.10.) w temperaturze pokojowej, przez 60 minut, z delikatnym wytrząsaniem. Następnie żele inkubowano w buforze do wywoływania (Materiały 5.10.) przez 30 minut w temperaturze pokojowej i przez noc w temperaturze 37°C w tym samym buforze, z delikatnym wytrząsaniem. W dalszym etapie żele płukano przez 5 minut w wodzie i barwiono błękitem brylantowym, po czym odbarwiano (Metody 6.20.). Żele wizualizowano z wykorzystaniem systemu Azure 400 (Azure Biosystems, USA).

6.20. Barwienie żeli błękitem brylantowym Coomassie

Żele poliakrylamidowe po rozdziale elektroforetycznym (Metody 6.18.) inkubowano w roztworze Coomasie Brilliant Blue R-250 lub G-250 (Materiały 5.10.) z delikatnym wytrząsaniem. Następnie żele odbarwiano w roztworze odbarwiacza (Materiały 5.10.) i wizualizowano z wykorzystaniem systemu Azure 400 (Azure Biosystems, USA).

6.21. Analiza białek metodą immunoblotingu

Po zakończeniu elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 6.18.) rozdzielone białka transferowano na membranę Immobilon P, PVDF (polifluorek winylidenu) o średnicy porów 0,45 µm (Millipore, USA). W kasecie do transferu składano tzw. "kanapkę transferową"- na gąbce umieszczano 3 arkusze bibuły Whatmann i membranę PVDF aktywowaną przez 5 minut metanolem. Na membranie umieszczano żel poliakrylamidowy i kolejno 3 arkusze bibuły Whatmann oraz gąbkę. Transfer prowadzono w temperaturze pokojowej przez noc przy napięciu 20 V lub przez 1,5 godziny przy napięciu 50 V.

Po elektrotransferze białek membranę inkubowano przez godzinę w roztworze 1x ROTI-Block (Carl Roth, Niemcy), uzupełnionym 0,05 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, USA). Następnie membranę przenoszono do roztworu przeciwciał pierwszorzędowych (Materiały 5.9.) w roztworze ROTI-Block i inkubowano przez godzinę po czym płukano trzykrotnie roztworem TBS-T (Materiały 5.10.) przez 10 minut. Membranę przenoszono do roztworu przeciwciał drugorzędowych (Materiały 5.9.) sprzężonych z HRP (peroksydaza chrzanowa) w ROTI-Block i inkubowano przez godzinę po czym ponownie trzykrotnie płukano TBS-T przez 10 minut. Membranę wywoływano w roztworze AzureSpectra Fluorescent Western Blot Kit (Azure Biosystems, USA) w aparacie Azure 400 (Azure Biosystems, USA).

6.22. Nadprodukcja białka SecA w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21 (DE3)

Pojedynczą kolonią szczepu *E. coli* BL21 DE3 transformowanego wybranym plazmidem (pochodna pET-28a(+)) zaszczepiano 100 ml pożywki LB wzbogaconej kanamycyną i inkubowano z wytrząsaniem przez noc w temperaturze 37°C. Następnie hodowlę rozcieńczano w stosunku 1:50 w 500 ml pożywki LB z antybiotykiem i inkubowano w takich samych warunkach do osiągnięcia gęstości optycznej OD_{595nm} = 0,4–0,5. Do hodowli dodawano IPTG do stężenia końcowego 0,5 mM i inkubowano z wytrząsaniem przez 16 godzin w temperaturze 16°C. Następnie hodowlę wirowano przy prędkości 5 460 x g, przez 30 minut w temperaturze 4°C, supernatant zlewano a osady przechowywano w temperaturze -80°C.

6.23. Oczyszczanie białka SecA z wykorzystaniem metod chromatograficznych

6.23.1. Oczyszczanie metodą metalopowinowactwa na złożu Ni²⁺-NTA Agarose w warunkach natywnych

Osady bakteryjne przygotowane zgodnie z opisem (Metody 6.22.), rozmrażano w temperaturze 4°C i zawieszano w buforze BH10 (Materiały 5.10.) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Materiały 5.11.) w objętości 2 ml na 1 g osadu, po czym dodawano lizozymu do stężenia końcowego 1 mg/ml i inkubowano w lodzie 30 minut. Zawartość probówki starannie mieszano i uzupełniano buforem BH10 z dodatkiem inhibitorów proteaz do objętości 50 ml, po czym rozdzielano do dwóch probówek wirowniczych. Wszystkie etapy, aż do uzyskania czystego preparatu białkowego przeprowadzano w lodzie lub w temperaturze 4°C. Następnie próby poddawano sonikacji w Bioblock

Sonifer Vibra Cell 72408 (Bioblock Scientific, Francja) poprzez trzykrotne zastosowanie 10 impulsów po 10 sekund i 10-sekundowych przerw oraz amplitudę 15%. Po sonikacji próby wirowano przez 30 minut przy prędkości 13 520 x g. Supernatant nanoszono na 8 ml złoża Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen, Niemcy), uprzednio zrównoważonego buforem BH10, i inkubowano przez noc w chłodni z delikatnym wytrząsaniem. Po inkubacji mieszaninę nanoszono na kolumnę i usuwano białka niespecyficycznie związane ze złożem buforem BH10 w objętości 10x objętości złoża. Następnie eluowano białka buforami BH20; BH50; BH100; BH200; BH300; BH500 (Materiały 5.10.) z wykorzystaniem gradientu skokowego (10 ml każdego buforu), zbierając frakcje o objętości 5 ml każda. Uzyskane frakcje poddawano rozdzielowi metodą elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 6.18.) i barwiono w roztworze CBB-R250 (Metody 6.20.). Wybrane frakcje mieszano i zagęszczano do objętości 1 ml z wykorzystaniem koncentratorów Amicon Ultra-4 50 kDa MWCO (ang. *molecular weight cut-off*, Merck Millipore, Niemcy) poprzez wirowanie przy prędkości 5 000 x g. Uzyskany preparat poddawano oczyszczaniu metodą sączenia molekularnego na złożu Superdex 200 (Metody 6.23.2.).

6.23.2. Oczyszczanie metodą sączenia molekularnego na złożu Superdex 200

Wszystkie bufony użyte do sączenia molekularnego przed użyciem filtrowano z wykorzystaniem membran 0,22 µm oraz odpowietrzano w próżni przez godzinę. Oczyszczanie białka przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny Superdex 200 (Cytiva, USA) sprzężonej z systemem chromatograficznym ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, USA). Kolumnę przepłukiwano 50 ml wody destylowanej oraz 50 ml buforu A (Materiały 5.10.). Przepływ ustalano na poziomie 0,3 ml/min.

Próbkę białkową po oczyszczaniu metodą metalopowinowactwa (Metody 6.23.1.) zagęszczano do objętości 1 ml, odwirowywano przy parametrach 13 000 x g, 10 minut, 4°C i aplikowano na kolumnę. Następnie włączano przepływ buforu A w trybie ciągłym, a elucję monitorowano na podstawie absorbancji przy długości fali 280 nm. Eluat zbierano automatycznie w frakcjach o objętości 1 ml w zakresie objętości odpowiadającym głównym pikom absorbancji.

Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 6.18.), po czym frakcje zawierające oczyszczone białko łączono, dodawano glicerol do objętości końcowej 10% i przechowywano w temperaturze -80°C. Po zakończeniu

procesu kolumnę przepłukiwano 2–3 objętościami wody destylowanej, a następnie 20% roztworem etanolu.

6.23.3. Analiza produktów oczyszczania metodą spektrometrii mas

Próby poddawano rozdziałowi metodą elektroforezy poliakrylamidowej (Metody 6.18.) a następnie żel barwiono roztworem CBB R-250 i odbarwiano w odbarwiaczu (Metody 6.20.). Prążki wycinano z żelu poliakrylamidowego, przenoszono do probówek typu Eppendorf i płukano trzykrotnie wodą dejonizowaną. Analizę prążków metodą spektrometrii mas Triple-TOF zlecano Laboratorium Spektrometrii Mas Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i Uniwersytetu Gdańskiego.

6.24. Dializa białek

Worki dializacyjne, po pocięciu do wymaganych rozmiarów, były kolejno inkubowane w: wodzie destylowanej przez 30 minut, następnie kolejno: przez 1 minutę w 0,3% roztworze Na_2SO_4 w temperaturze 80°C, przez 2 minuty w wodzie destylowanej o temperaturze 60°C, przez 2 minuty w 0,2% kwasie siarkowym (VI), a na koniec przez 10 minut w wodzie destylowanej o temperaturze 40°C. Worki były przechowywane w 4°C w 5 mM roztworze EDTA. Roztwory białek umieszczano w workach dializacyjnych lub w systemie do dializy w małych objętościach i prowadzono dializę wobec 1 litra buforu przez godzinę, a następnie wobec 2 litrów świeżego buforu przez noc w temperaturze 4°C.

6.25. Oznaczanie stężenia białka

6.25.1. Metoda czerni amidowej

Na kwadraty nitrocelulozy o powierzchni 1 cm² наносzono roztwory wzorcowe BSA o stężeniach 1, 2, 3 i 4 mg/ml oraz roztwory białek badanych o nieznanym stężeniu. Wszystkie próby наносzono w objętości 2 i 4 ul w trzech powtórzeniach technicznych. Jeden kwadrat pozostawał pusty i stanowił kontrolę kalibracyjną. Po całkowitym wyschnięciu nitrocelulozę inkubowano z wytrząsaniem przez 10 minut w 0,1% roztworze czerni amidowej a następnie odbarwiano w roztworze odbarwiacza (Materiały 5.10.) do całkowitego wypłukania niezwiązanej czerni amidowej z nitrocelulozy. Po wyschnięciu odbarwionej membrany kwadraty wycinano, przenoszono do 1 ml stężonego kwasu

mrówkowego i inkubowano do całkowitego usunięcia barwnika z tła. Następnie z wykorzystaniem Spektrofotometru VIS 7220G (RAYLEIGH, Chiny) mierzono wartości A_{630} prób. Na podstawie wartości absorbancji odczytanych dla roztworów wzorcowych BSA sporządzano krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia białka i odczytywano stężenie białka w roztworze.

6.25.2. Metoda densytometryczna

Przeprowadzano elektroforezę poliakrylamidową (Metody 6.18.) badanych prób oraz roztworów wzorcowych BSA o stężeniach 4; 2; 1; 0,5 mg/ml. Na żel nanoszono po 5 μ l każdej próby. Żele barwiono błękitem brylantowym (Metody 6.20.). Analizowano wielkość i wybarwienie prążków z użyciem programu 1DScan EX 3.0 (Scanalytics, USA). Stężenia badanych prób obliczano po wyznaczeniu równania krzywej wzorcowej wyznaczonej dla roztworów wzorcowych BSA.

6.25.3. Metoda Bradford

Przygotowywano roztwór odczynnika RotiNanoQant (Carl Roth, Niemcy) mieszając stężony barwnik z wodą w stosunku 1:4. Następnie roztwór filtrowano z wykorzystaniem bibuły filtracyjnej i nanoszono po 200 μ l na dołki w płytce 96 dołkowej. Następnie do dołków z roztworem RotiNanoQant dodawano po 50 μ l roztworów BSA o stężeniach: 0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 75; i 100 μ g/ml oraz roztwory białka o nieznanym stężeniu rozcieńczone z wodą w stosunku 1:20. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut i mierzono wartości absorbancji przy długości fali $\lambda=590\text{nm}$ i $\lambda=450\text{nm}$ z wykorzystaniem czytnika CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Niemcy). Następnie obliczano ilorazy OD_{590}/OD_{450} , sporządzano krzywą wzorcową dla BSA i na jej podstawie odczytywano stężenia białka w próbkach badanych.

6.26. Analiza struktury białka SecA *H. pylori*

6.26.1. Technika dichroizmu kołowego

6.26.1.1. Pomiar widm w dalekim UV far-UV CD

Wymieniano bufor w oczyszczonych preparatach białek z wykorzystaniem koncentratorów Amicon Ultra-4 50 kDa MWCO (ang. *molecular weight cut-off*, Merck Millipore, Niemcy). Białka wirowano przy prędkości 5 000 x g, w 4°C z jednoczesną wymianą buforu na bufor B (Materiały 5.10.). Następnie przygotowywano roztwory

białek o stężeniu 0,3 mg/ml. Wykonanie pomiarów zlecano Pracowni Dichroizmu Kołowego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Widma rejestrowano za pomocą spektropolarymetru J-815 (Jasco, USA) w temperaturze 20°C w zakresie długości fali 195–260 nm. Na podstawie zarejestrowanych danych obliczano średnią eliptyczność molową zgodnie z wzorem opisanym w (Metody 6.26.1.2.). Otrzymując wykres zależności średniej eliptyczności molowej od długości fali, uzyskiwano charakterystyczne widmo białka, odzwierciedlające jego strukturę drugorzędową w badanej temperaturze.

6.26.1.2. Oznaczanie stabilności termicznej SecA

Próby do analiz przygotowywano jak w (Metody 6.26.1.1.). Wykonanie pomiarów zlecano Pracowni Dichroizmu Kołowego Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pomiary prowadzono z wykorzystaniem spektropolarymetru J-815 (Jasco, USA) przy długości fali 209 nm w zakresie temperaturowym 20–95°C (co 0,5°C) w kuwetach o długości drogi optycznej 1 mm. Średnią eliptyczność molową obliczano według wzoru:

$$[\Theta]_{mrw,\lambda} = MRW \times \Theta_{\lambda} / 10 \times d \times c \text{ (Kelly i wsp., 2005),}$$

gdzie

Θ_{λ} – obserwowana eliptyczność (stopnie) przy długości fali λ ,

d – długość drogi optycznej (cm),

c – stężenie białka (g/ml),

MRW (ang. *Mean Residue Weight*) = $M/(N-1)$, gdzie

M – masa molowa łańcucha polipeptydowego (Da), N – liczba aminokwasów w białku.

W programie Origin (OriginLab Corporation, USA) tworzone wykres zależności średniej eliptyczności molowej od temperatury, dopasowując dane eksperymentalne do krzywej sigmoidalnej zgodnie z modelem Boltzmanna. Na podstawie uzyskanego dopasowania wyznaczano temperaturę topnienia białek, odpowiadającą wartości parametru x_0 w funkcji Boltzmanna:

$$y = A2 + (A1 - A2)/(1 + \exp((x - x0)/dx)), \text{ gdzie}$$

$A1$ – wartość początkowa średniej eliptyczności molowej (y) (lewa horyzontalna asymptota),

$A2$ – wartość końcowa średniej eliptyczności molowej (y) (prawa horyzontalna asymptota),

x – punkt przegięcia krzywej – wartość temperatury topnienia,

dx – zmiana wartości temperatury (x) odpowiadająca najbardziej znaczącej zmianie w średniej eliptyczności molowej (y).

6.26.2. Oznaczanie stopnia oligomeryzacji metodą ultrawirowania analitycznego

Do preparatów oczyszczonych białek dodawano TCEP do stężenia końcowego 2 mM i dializowano (Metody 6.24.) wobec 1 litra buforu C (Materiały 5.10.) przez 2 godziny, a następnie przez godzinę wobec 1 litra buforu C. Stężenie białka oznaczono spektrofotometrycznie w spektrofotometrze Hitachi U-5100 (Hitachi, Japonia) na podstawie równania Lamberta-Beera wykorzystując pomiary absorpcji przy 280 nm i wartość współczynnika ekstynkcji obliczonego ze składu aminokwasowego. Ultrawirowanie zostało wykonane przez Pracownię Biofizyki, Chemii i Biologii Molekularnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

6.27. Przygotowanie wielowarstwowych liposomów (MLV, ang. *multilammellar vesicles*)

Lipidy *E. coli* (*E. coli* Extract Total, Avanti Polar lipids, Anglia) umieszczano w szklanej probówce i odparowywano rozpuszczalnik pod strumieniem azotu do uzyskania cienkiej warstwy na ściankach probówki, po czym suszono w eksykatorze próżniowym przez 2 godziny. Następnie, dodawano ogrzany wcześniej do 37°C bufor L (Materiały 5.10.) (w takiej samej objętości jak początkowa objętość lipidów), worteksowano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C, co jakiś czas intensywnie mieszając. Mieszaninę poddawano następnie pięciokrotnemu cyklowi zamrażania i rozmrażania, poprzez 3 minutową inkubację w ciekłym azocie i 3 minutową inkubację w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, każdorazowo wstrząsając (worteksując) pomiędzy cyklami. Liposomy przechowywano w temperaturze 4°C do 14 dni.

6.28. Optymalizacja warunków do oznaczania aktywności ATPazowej

Do oznaczania aktywności ATPazowej białka wykorzystywano zestaw Malachite Green Phosphate Assay (Sigma Aldrich, USA) (Materiały 5.11.). Przygotowywano mieszaniny reakcyjne o składzie i stężeniach poszczególnych komponentów podanych w Tabeli 23. Kolejność dodawania poszczególnych składników do mieszaniny była następująca: białko SecA, peptyd sygnałowy, białko HtrA, liposomy.

Tabela 23. Skład mieszanin reakcyjnych do optymalizacji warunków oznaczania aktywności ATPazowej.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Numer mieszaniny reakcyjnej						
	1	2	3	4	5	6	7
	Stężenie końcowe w mieszaninie						
białko SecA lub SecAC852Y (5 μ M)	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
peptyd sygnałowy (CytPep) (400 μ M)	-	-	-	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M
białko HtrA (155 μ M)	-	-	-	-	-	2,5 μ M	2,5 μ M
liposomy (8 000 μ g/ml)	-	50 μ g/ml	300 μ g/ml	50 μ g/ml	300 μ g/ml	50 μ g/ml	300 μ g/ml
bufor do aktywności (Materiały 5.10.)	dodawano do uzyskania objętości końcowej 70 μ l						

Białko HtrA (Materiały 5.8.), bezpośrednio przed dodaniem do mieszaniny reakcyjnej, zawieszano w moczniku (stężenie końcowe mocznika 6 M). Mieszaniny reakcyjne nanoszono do dołków w płytce 96-dołkowej w objętości 70 μ l. Następnie do każdego dołka dodawano po 10 μ l roztworu ATP (Materiały 5.11.) (zawieszonego w buforze do aktywności) do stężenia końcowego 0,5 mM i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po upływie wyznaczonego czasu do dołków dodawano po 20 μ l odczynnika hamującego reakcję Malachite Green (100 objętości Reagent A zmieszane z 1 objętością Reagent B) i inkubowano przez 30 minut, po czym mierzono absorbancję przy 650 nm za pomocą czytnika mikropłytek (Enspire, Perkin Elmer, USA). Tło stanowiły reakcje (1-7) bez enzymu (SecA). Wszystkie pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach technicznych.

Ilość uwolnionego fosforanu wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej, przygotowanej z wykorzystaniem znanych stężeń fosforanu nieorganicznego. Przygotowywano Premix fosforanów o stężeniu 40 μ M poprzez zmieszanie komponentu Phosphate Standard (z zestawu Malachite Green Phosphate Assay) z buforem reakcyjnym, w stosunku 1:24. Następnie rozcieńczano Premix buforem do aktywności do uzyskania stężeń końcowych: 40; 32; 24; 16; 12; 8; 4; 0 μ M. Na płytkę 96-dołkową nanoszono po 80 μ l roztworów wzorcowych, inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut i dodawano 20 μ l odczynnika hamującego reakcję Malachite Green. Na podstawie odczytanych wartości absorbancji sporządzano krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia fosforanów. Podstawiając wartość absorbancji badanej mieszaniny do uzyskanego równania $y = ax + b$, gdzie y - wartość absorbancji, a x - ilość fosforanów, odczytywano stężenie nieorganicznego fosforanu w mieszaninie.

6.29. Oznaczanie aktywności ATPazowej białka SecA i mutein SecA

Do oznaczania aktywności ATPazowej białka wykorzystywano zestaw Malachite Green Phosphate Assay (Sigma Aldrich, USA) (Materiały 5.11.). Przygotowywano mieszaniny reakcyjne w pojedynczym układzie reakcyjnym, dodając komponenty w następującej kolejności: białko SecA, peptyd sygnałowy, białko HtrA, liposomy (Tabela 24). Dodatkowo, w celu oznaczenia aktywności podstawowej (bez ligandów), wykonywano reakcje zawierające jedynie enzym SecA (bez pozostałych komponentów).

Tabela 24. Skład mieszanin reakcyjnych do oznaczenia aktywności ATPazowej.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie końcowe w mieszaninie
białko SecA lub SecAC852Y (5 μ M)	0,5 μ M
peptyd sygnałowy (CytPep) (400 μ M)	10 μ M
białko HtrA (155 μ M)	2,5 μ M
liposomy (8 000 μ g/ml)	300 μ g/ml
bufor do aktywności (Materiały 5.10.)	dodawano do uzyskania objętości końcowej 70 μ l

Białko HtrA, bezpośrednio przed dodaniem do mieszaniny reakcyjnej, zawieszano w moczniku (stężenie końcowe mocznika 6 M). Reakcje przeprowadzano dla 10 różnych stężeń substratu (ATP) przy stałym stężeniu enzymu (SecA i muteiny SecA) i czterech różnych czasów. Mieszaniny reakcyjne (Tabela 24) наносono do dołków w płytce 96-dołkowej w objętości 70 μ l. Następnie do mieszanin w dołkach dodawano po 10 μ l roztworu ATP (zawieszonego w buforze do aktywności) do uzyskania stężeń końcowych: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1 mM. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 80 μ l. Reakcje przeprowadzano w temperaturze 37°C. Po określonym czasie (3; 5; 10 i 15 minut) do każdego dołka dodawano po 20 μ l odczynnika hamującego reakcję Malachite Green, inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej i mierzono absorbancję przy długości fali 650 nm. Tło stanowiły reakcje bez enzymu (SecA). Dla każdej reakcji wykonano trzy powtórzenia techniczne. Pomiar absorbancji przeprowadzano przy użyciu czytnika mikroplatek (Enspire, Perkin Elmer, USA). Ilość uwolnionego fosforanu wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej jak w (Metodach 6.28.). Dla każdego stężenia ATP sporządzano wykres zależności stężenia fosforanu (μ M) od czasu (minuty), a szybkość reakcji (v) obliczano jako nachylenie prostej regresji liniowej.

Uzyskane wyniki dopasowywano metodą nieliniowej regresji do równania Michaelisa-Menten z wykorzystaniem programu GraphPad Prism (GraphPad, Dotmatics, USA):

$$v = V_{max} \cdot [S] / K_m + [S], \text{ gdzie:}$$

v - szybkość początkowa reakcji,

S - stężenie substratu,

K_m - stała Michaelisa,

V_{max} - maksymalna szybkość reakcji

Na podstawie wyznaczonych wartości V_{max} obliczano również stałą katalityczną k_{kat} , czyli liczbę cząsteczek substratu przekształcanych przez pojedynczą cząsteczkę enzymu w jednostce czasu. Wartość k_{kat} obliczano ze wzoru:

$$k_{cat} = V_{max} / [E], \text{ gdzie:}$$

V_{max} - maksymalna szybkość reakcji

E - stężenie enzymu.

6.30. Analiza powinowactwa białek SecA do liposomów

Przygotowywano mieszaniny białek o stałym stężeniu białka i wzrastającymi stężeniami liposomów zgodnie z Tabelą 25. Wszystkie reakcje przygotowywano w probówkach typu Eppendorf o niskim powinowactwie do białek.

Tabela 25. Skład mieszanin reakcyjnych do oznaczenia stopnia powinowactwa do błon.

Składnik mieszaniny	Stężenie w mieszaninie	Dodawana objętość [μ l]
oczyszczone preparaty SecA (5 μ M)	0,5 μ M	2
wielowarstwowe liposomy (8 000 μ g/ml)	10 μ g/ml 25 μ g/ml 50 μ g/ml	1,25 μ l 3,125 μ l 6,25 μ l
DTT (100 mM)	1 mM	0,2 μ l
bufor L (Materiały 5.10.)		do 20 μ l

Mieszaniny inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez godzinę przy prędkości 28 000 x g. Oddzielano supernatanty od osadów, dodawano bufor lizujący redukujący i analizowano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Metody 6.18.).

6.31. Zbadanie wpływu mutacji genu *secA* na fizjologię komórek *H. pylori*

6.31.1. Analiza stopnia oporności szczepów *H. pylori* na wybrane antybiotyki metodą dyskowo-dyfuzyjną

Bakterie *H. pylori* z hodowli na podłożu stałym (Metody 6.1.3.) zawieszano w pożywce BHI (Materiały 5.5.) do uzyskania gęstości optycznej $OD_{595nm}=1$. Zawiesinę pobierano przy użyciu jałowego wacika i rozprowadzano równomiernie na podłożu GC Agar (Materiały 5.5.), po czym na szalce umieszczano jałowe dyski o średnicy 6 mm (Cytiva, USA). Następnie, na dyski наносono po 10 μ l roztworów tetracykliny o stężeniu 0,05 μ g/ μ l i amoksycyliny o stężeniu 0,025 μ g/ μ l w DMSO (Materiały 5.6.), oraz 10 μ l roztworu samego DMSO jako kontrolę. Płytki inkubowano w warunkach mikrotlenowych w temperaturze 37°C przez 96 godzin.

6.31.2. Ocena stopnia autoaglutynacji komórek *H. pylori*

Hodowle płynne *H. pylori* w fazie logarytmicznej (Metody 6.1.4.) wirowano przy prędkości 4 000 x g przez 10 minut. Supernatant usuwano a osad dwukrotnie płukano roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) (Materiały 5.10.) i ponownie wirowano. Osady zawieszano w buforze PBS do uzyskania gęstości optycznej $OD_{595nm}=0,4$ i przenoszono po 5 ml roztworów do 15 mililitrowych probówek typu falkon. Probówki umieszczano w atmosferze mikrotlenowej i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie pobierano 1 ml z górnej warstwy roztworu i mierzono gęstość optyczną pobranej próby (OD_{595nm}).

6.31.3. Ocena przepuszczalności błony *H. pylori* zewnętrznej względem dodecylosiarczanu sodu (SDS)

Do hodowli płynnych *H. pylori* w fazie logarytmicznej (Metody 6.1.4.) dodawano pożywkę BHI (Materiały 5.5.) do uzyskania gęstości optycznej $OD_{595nm}=0,35$. Z uzyskanych roztworów przygotowywano seryjne rozcieńczenia w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem PBS (Materiały 5.10.) od 10^{-1} do 10^{-6} . Następnie wysiewano po

5 ul zawiesiny bakteryjnej na podłoże GC agar (Materiały 5.5.) z dodatkiem 0,01% i 0,0075% SDS i inkubowano w warunkach mikrotlenowych w temperaturze 37°C przez 96 godzin. Po tym czasie obliczano ilość wyrosniętych kolonii (CFU, ang. *colony forming units*).

6.31.4. Pomiary aktywności γ -glutamylotransferazy (gGT)

Hodowle płynne *H. pylori* w fazie logarytmicznej (Metody 6.1.4.) wirowano przy prędkości 4 000 x g przez 10 minut, płukano trzykrotnie 10 ml roztworu PBS (Materiały 5.10.), a następnie zawieszano w PBS do uzyskania gęstości optycznej $OD_{595nm}=1$. Zawiesiny przenoszono do probówek typu Eppendorf w objętości 700 μ l i inkubowano z wytrząsaniem (140 rpm) w warunkach mikrotlenowych w temperaturze 37°C, przez 1,5 godziny. Następnie zawiesiny wirowano przy prędkości 1680 x g, a supernatanty wykorzystywano do przeprowadzenia testu aktywności. Do dołków w płytce 96-dołkowej nanoszono po 110 μ l mieszaniny reakcyjnej o składzie:

- 1,25 mM gGpNA (ang. *L- γ -Glutamyl-p-nitroanilide*)
- 30 mM glicyloglicyna
- 25 mM bufor HEPES, pH 7,4 z dodatkiem 100 mM NaCl

Następnie, do mieszaniny reakcyjnej w dołkach dodawano po 90 μ l supernatantu i mierzono wzrost stężenia substratu za pomocą czytnika płytek CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Niemcy), przy długości fali 418 nm, w temperaturze 37°C, przez 8 godzin. W celu ilościowej analizy aktywności enzymatycznej sporządzono krzywą wzorcową dla p-nitroaniliny (pNA), rozpuszczonej w DMSO i rozcieńczonej do odpowiednich stężeń (0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 μ M) w buforze HEPES (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,4), na podstawie której wyznaczano stężenia pNA w badanych próbkach.

6.32. Analiza przeżywalności komórek *H. pylori* w warunkach stresowych

Do hodowli płynnych *H. pylori* w logarytmicznej fazie wzrostu (Metody 6.1.4.) dodawano wybrany czynnik stresowy do odpowiedniego stężenia końcowego (Tabela 26) i hodowano z wytrząsaniem w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Po dwóch godzinach przygotowywano seryjne rozcieńczenia hodowli od 10^{-1} do 10^{-7} w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) (Materiały 5.10.) i wysiewano po 5 μ l zawiesiny bakteryjnej na podłoże stałe GC agar (Materiały 5.5.). Płytki inkubowano w warunkach

mikrotlenowych w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Po tym czasie liczono ilość wyrosniętych kolonii (CFU, ang. *colony forming units*). Doświadczenie wykonywano dla trzech powtórzeń biologicznych.

Tabela 26. Stężenia końcowe czynników stresowych w hodowli bakteryjnej.

Czynnik stresowy	Stężenie końcowe w hodowli bakteryjnej
SDS	0,002%
	0,003%
	0,005%
NaCl	0,1 M
	0,2 M
	0,3 M
etanol	1%
	5%
	10%

7. Wyniki

7.1. Uzyskanie preparatów oczyszczonych wariantów SecA

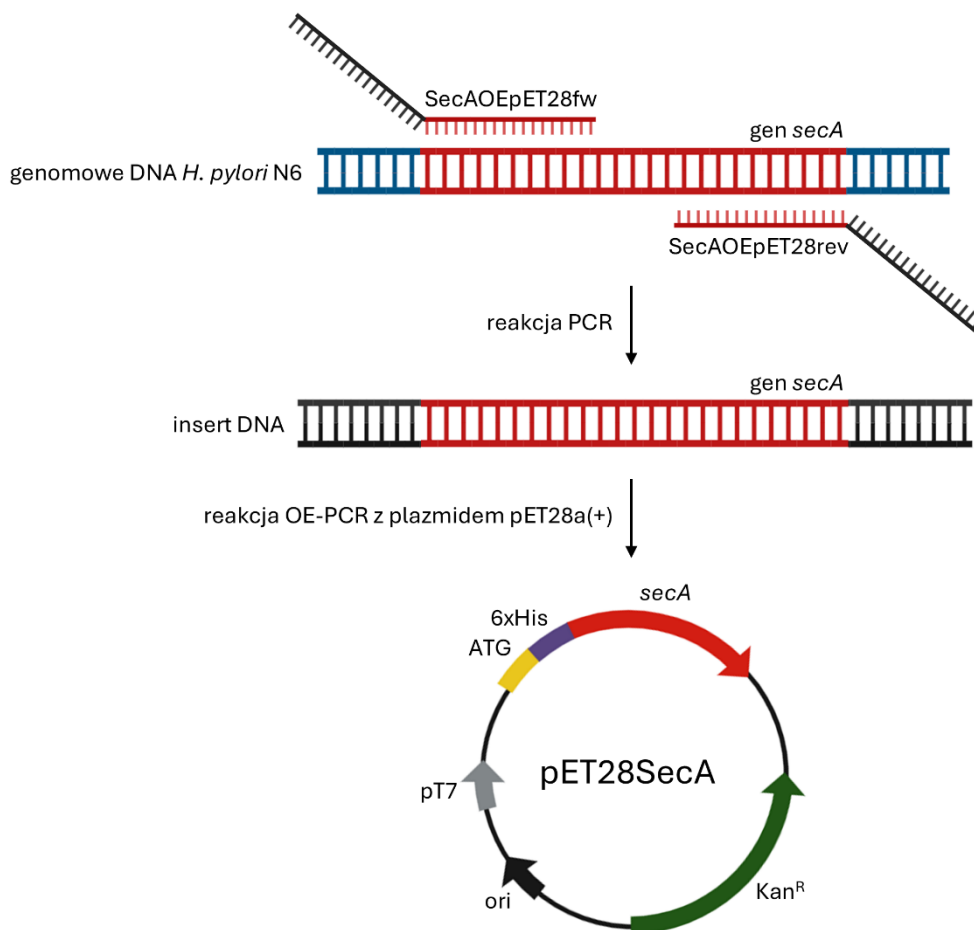
Aby zbadać wpływ mutacji punktowych w rejonie C-końcowym białka SecA bakterii *H. pylori* na jego strukturę i aktywność, konieczne było uzyskanie preparatów oczyszczonych białek zawierających odpowiednie substytucje aminokwasowe w tym obszarze. Badane mutacje obejmowały substytucje aminokwasowe lub skrócenie białka odpowiadające tym, zidentyfikowanym w szczepach *H. pylori* N6 pozbawionych funkcjonalnej proteazy HtrA [180].

7.1.1. Uzyskanie plazmidów ekspresyjnych niosących geny kodujące zmutowane białka SecA

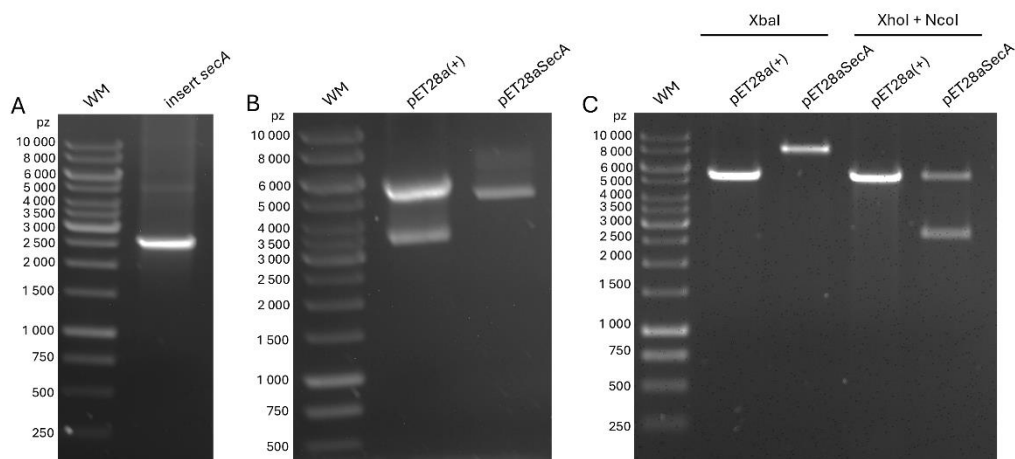
Pierwszym etapem było skonstruowanie plazmidów ekspresyjnych niosących geny *secA* zawierające mutacje punktowe w rejonie kodującym C-końcową domenę. Posłużono się w tym celu metodą PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków (OE-PCR) (Metody 6.10.) oraz metodą mutagenazy miejscowo specyficznej opartej o PCR (Metody 6.9.).

Jako matrycy do reakcji OE-PCR użyto genomowego DNA (Metody 6.6.) bakterii *H. pylori* szczepu N6. Z wykorzystaniem starterów SecAOEpET28fw i SecAOEpET28rev (Materiały 5.1.), zawierających na końcach sekwencje komplementarne do miejsca klonowania w plazmidzie pET28a(+) (Materiały 5.3.), powielono gen *secA* typu dzikiego. Produkt reakcji wyizolowano z żelu agarozowego (Metody 6.16.) i wykorzystano do reakcji PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków (OE-PCR) (Metody 6.6.) (Rycina 6). Po reakcji, mieszaniny poddawano trawieniu enzymem DpnI (Metody 6.12.), a następnie transformowano nimi komórki kompetentne *E. coli* DH5α (Metody 6.4.) i izolowano z nich plazmidowe DNA (Metody 6.5.). Poprawność uzyskanego konstruktów potwierdzono analizą restrykcyjną z użyciem enzymów XbaI, XhoI i NcoI (Metody 6.13.) (Rycina 7). Enzym XbaI trawi plazmid pET28a(+) w jednym miejscu, co pozwala na uzyskanie jego formy liniowej, natomiast miejsca rozpoznawane przez enzymy NcoI i XhoI umożliwiają wycięcie insertu z genem *secA* z plazmidu. Uzyskano plazmid pET28SecA, niosący gen *secA* z sekwencją metki histydynowej na końcu 3'. Plazmid ten posłużył następnie jako matryca w reakcji mutagenazy miejscowo specyficznej opartej o PCR, której celem było uzyskanie

plazmidów niosących gen *secA* z mutacjami punktowymi (Metody 6.9.). Schemat klonowania przedstawiono na Rycinie 6.



Rycina 6. Schemat konstrukcji plazmidu do wydajnej nadprodukcji białka SecA bakterii *H. pylori* (pET28SecA). Na matrycy genomowego DNA bakterii *H. pylori* N6 amplifikowano gen *secA* (kolor czerwony) przy użyciu starterów zawierających sekwencje komplementarne do plazmidu pET28a(+) (kolor czarny) (SecAOEpET28fw i SecAOEpET28rev). Uzyskany produkt (insert DNA) zawierający gen *secA* (kolor czerwony) i komplementarne do plazmidu sekwencje (kolor czarny) wykorzystano w reakcji OE-PCR z plazmidem pET28a(+). Uzyskano plazmid pET28SecA, zawierający gen *secA* w ramce odczytu z kodonem START (ATG) i sekwencją kodującą metkę histydynową (6xHis), znajdujący się pod kontrolą promotora T7 (pT7) i zawierający gen oporności na kanamycynę (Kan^R).



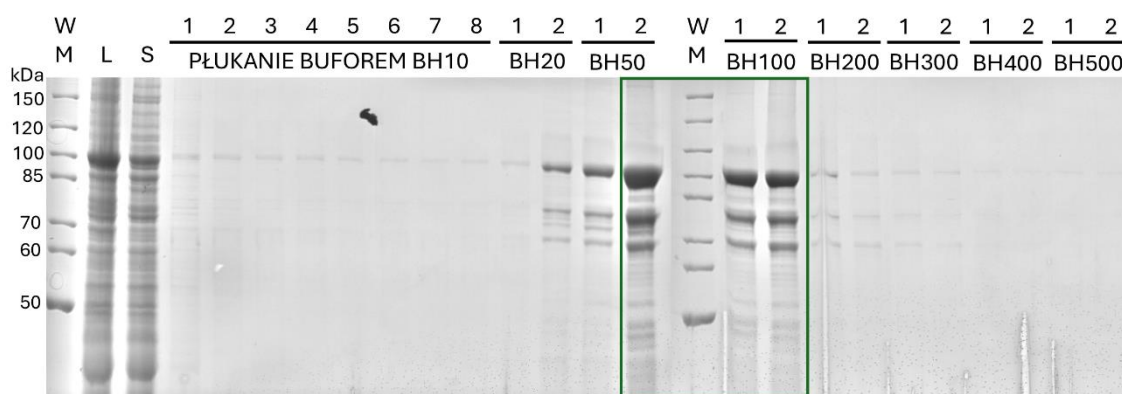
Rycina 7. Konstrukcja plazmidu pET28SecA - rozdział elektroforetyczny DNA. Rozdziałowi poddawano 2 μ l preparatów DNA. **A.** Insert DNA (2 661 pz) zawierający gen *secA* z fragmentami komplementarnymi do plazmidu pET28a(+). **B.** Wyizolowane DNA plazmidowe pET28a(+) oraz plazmid pET28SecA (uzyskany po reakcji PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków). **C.** Plazmidowe DNA pET28a(+) (5 369 pz) i pET28SecA (7 964 pz) po trawieniu enzymami restrykcyjnymi XbaI, XhoI i NcoI. Enzym XbaI trawi plazmid w jednym miejscu, co prowadzi do powstania formy liniowej, natomiast trawienie XhoI i NcoI umożliwia wycięcie insertu z genem *secA*. WM - wzorzec masowy DNA (1 kb), pz - liczba par zasad.

Mutagenezę miejscowo specyficzną przeprowadzono metodą PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych do wprowadzenia mutacji punktowych w rejonie C-końcowym genu *secA* (Materiały 5.1., Tabela 6, startery 15-24). Po reakcji PCR, matrycowe DNA usuwano przez trawienie enzymem DpnI (Metody 6.12.), mieszaniną reakcyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* DH5 α (Metody 6.4.), a następnie izolowano z transformantów plazmidowe DNA (Metody 6.5.). W rezultacie, uzyskano zestaw sześciu plazmidów przeznaczonych do wydajnej nadprodukcji białka SecA typu dzikiego oraz mutein SecA (pET28SecAwt, pET28SecAC843X, pET28SecAP858L, pET28SecAC841Y, pET28SecAR837K, pET28SecAC852Y) (Materiały 5.3.). Poprawność konstruktów potwierdzono poprzez sekwencjonowanie (Metody 6.8.) starterami pT7 i pT7term (komercyjne startery z bazy firmy Eurofins (Luksemburg)), które umożliwiają odczyt od początku i od końca sekwencji wprowadzonego do plazmidu genu, a także z wykorzystaniem starterów 5-11 (Materiały 5.1., Tabela 6).

7.1.2. Uzyskanie preparatów oczyszczonych białek SecA

Uzyskanymi konstruktami plazmidowymi transformowano komórki kompetentne szczepu *E. coli* BL21/DE3 (Materiały 5.2., Metody 5.4.), który jest powszechnie stosowany do ekspresji białek rekombinowanych. Indukcję prowadzono w systemie ekspresyjnym pET, umożliwiającym kontrolowaną nadprodukcję białka pod kontrolą promotora T7, poprzez dodanie IPTG do hodowli bakteryjnej (Metody 6.22.). Makrohodowle przeprowadzano w 4 litrach pożywki LB. Uzyskiwano średnio 8 g pasty bakteryjnej, z której pozyskiwano preparaty SecA (Metody 6.23.).

Oczyszczanie białek prowadzono dwuetapowo: z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa oraz filtracji żelowej. W pierwszym etapie zastosowano złożo Ni^{2+} -NTA Agarose (Metody 6.23.1.). Kolumnę ze związanymi białkami płukano buforem BH10 a następnie białka eluowano z kolumny za pomocą gradientu skokowego imidazolu w zakresie stężeń 20-500 mM (bufory BH20-BH500). Uzyskane frakcje analizowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Rycina 8) (Metody 6.18.).



Rycina 8. Elektroforegram przedstawiający oczyszczanie białka fuzyjnego SecA-HisTag bakterii *H. pylori* metodą chromatografii metalopowinowactwa na złożu Ni^{2+} -NTA Agarose. W 8% żelu poliakrylamidowym rozdzielano po 2 μl preparatów uzyskanych w poszczególnych etapach oczyszczania. Masa cząsteczkowa białka SecA bakterii *H. pylori* - 99 kDa. WM - wzorzec masowy, L - lizat bakteryjny po nadprodukcji białka SecA, S - frakcja białek rozpuszczalnych uzyskana po wirowaniu lizatu bakteryjnego, 1-8 - frakcje eluowane buforem BH10, 1-2 - frakcje białek eluowane buforami BH20-BH500 (w zakresie stężeń imidazolu 20-500 mM). Kolorem zielonym zaznaczono frakcje wybrane do kolejnego etapu oczyszczania.

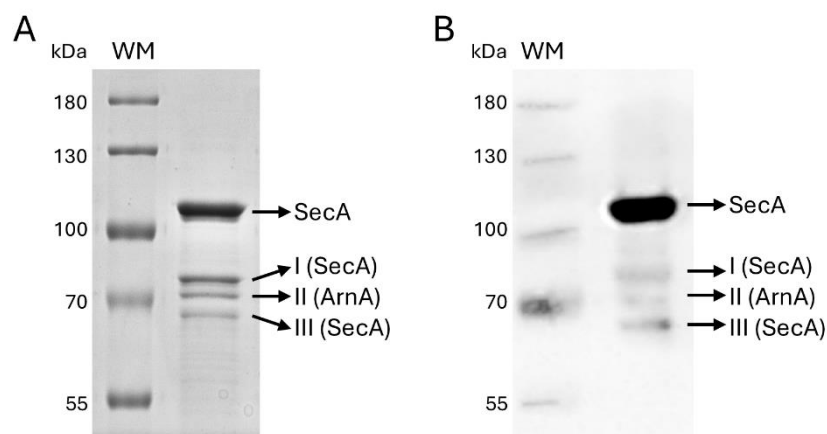
Na obrazie po rozdziale elektroforetycznym po oczyszczaniu białka na złożu Ni^{2+} -NTA Agarose widocznych jest wiele dodatkowych prążków, mniejszych niż 100 kDa, co może świadczyć o oczyszczeniu się wraz z białkiem SecA innych białek lub

degradacji oczyszczanego białka. Szczególnie wyraźne są trzy prążki na wysokościach odpowiadających masom cząsteczkowym od 80 kDa do 60 kDa (frakcja pierwsza eluowana buforem BH50) (Rycina 8). Analiza składu prążków metodą spektrometrii mas TripleTOF (Metody 6.23.3.) wykazała, że są to skrócone formy SecA (najprawdopodobniej produkty degradacji) i białko ArnA (Tabela 27, Rycina 9). ArnA (dwufunkcyjne białko oporności na polimiksyne) jest powszechnie występującym zanieczyszczeniem w preparatach białkowych oczyszczanych z wykorzystaniem metody chromatografii metalopowinowactwa podczas oczyszczania białek rekombinowanych ze znacznikiem histydynowym w bakterii *E. coli*. Jest to białko enzymatyczne *E. coli*, które posiada liczne, odsłonięte na powierzchni reszty histydynowe, co umożliwia mu oddziaływanie ze złożem Ni^{2+} -NTA [187].

Wybraną frakcję analizowano także metodą immunoblottingu (Metody 6.21.) z wykorzystaniem przeciwciał anty-6*His (Materiały 5.9.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 9. Analiza wykazała, że białko SecA uległo częściowej degradacji podczas procesu oczyszczania. Znacznik polihistydynowy został umieszczony na końcu N-terminalnym oczyszczanego białka, a na membranie zidentyfikowano trzy dodatkowe prążki, co pozwala wnioskować, że zidentyfikowane metodą immunoblottingu białka to SecA pełnej długości, dwie zdegradowane formy SecA w rejonie C-końcowym (prążek I i III) oraz białko ArnA (prążek II) (Rycina 9).

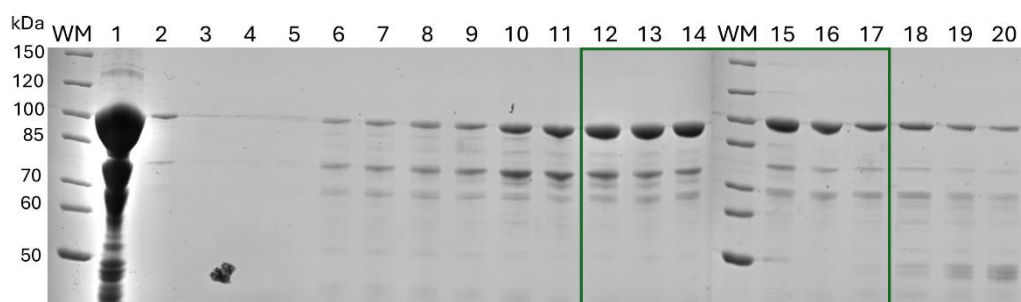
Tabela 27. Białka zidentyfikowane metodą spektrometrii mas w próbkach po oczyszczaniu SecA.

Prążek (oznaczenie z Ryciny)	Zidentyfikowane białko	Ilość peptydów	Pokrycie [%]
I	SecA	13	6
II	ArnA	26	27
III	SecA	13	4



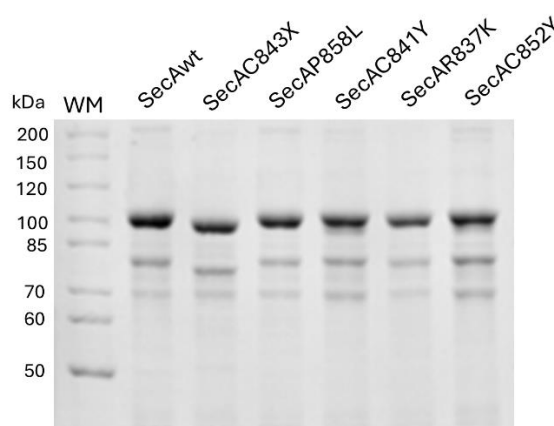
Rycina 9. Analiza frakcji metodą immunoblottingu z użyciem przeciwciał anty-6*His. **A.** Rozdział elektroforetyczny białek przeznaczonych do analizy metodą spektrometrii mas. Analizie poddano prążki I, II i III. **B.** Analiza metodą immunoblottingu. Strzałkami zaznaczono kolejno: I i III - produkt degradacji białka SecA ze znacznikiem polihistydynowym; II - białko ArnA. Masa cząsteczkowa białka SecA bakterii *H. pylori* - 99 kDa; masa cząsteczkowa białka ArnA bakterii *E. coli* - 74 kDa.

Ze względu na obecność zanieczyszczeń w uzyskanych preparatach zdecydowano się przeprowadzić dodatkowy etap oczyszczania metodą filtracji żelowej. W tym celu, wybrane frakcje po oczyszczaniu metodą metalopowinowactwa (zaznaczone na Rycinie 8 kolorem zielonym) zagęszczano do 1 ml w koncentratorach Amicon i poddawano oczyszczaniu metodą filtracji żelowej na złożu Superdex 200 (Metody 6.23.2.). Uzyskane frakcje po filtracji żelowej poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu poliakrylamidowym (Metody 6.18.) (Rycina 10).



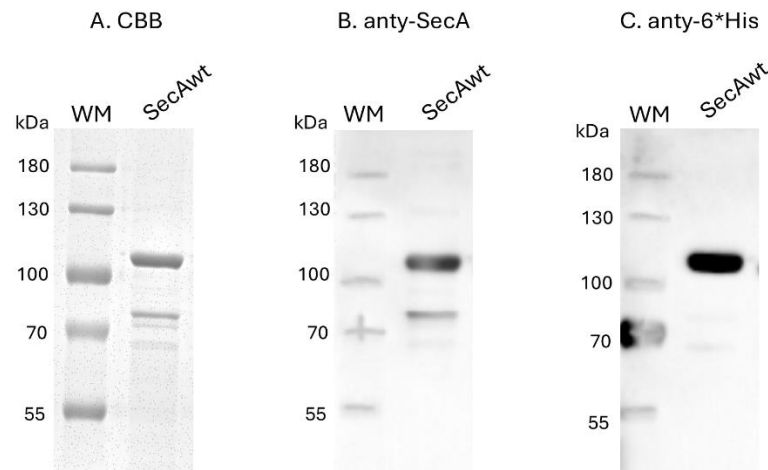
Rycina 10. Przykładowy elektroforegram przedstawiający oczyszczanie białka fuzyjnego SecA-HisTag bakterii *H. pylori* metodą filtracji żelowej na złożu Superdex 200. W 8% żelu poliakrylamidowym rozdzielano po 2 μ l preparatów uzyskanych w poszczególnych etapach oczyszczania. Masa cząsteczkowa białka SecA bakterii *H. pylori* - 99 kDa. WM - wzorec masowy, 1 - zagęszczone frakcje po oczyszczaniu metodą metalopowinowactwa, 2-20 - frakcje uzyskane podczas oczyszczania metodą filtracji żelowej. Kolorem zielonym zaznaczono frakcje wybrane do dalszych analiz.

Po oczyszczaniu metodą filtracji żelowej (Rycina 10) wybierano najlepsze jakościowo frakcje, łączono i oznaczano stężenie preparatów białkowych (Metody 6.25.). Do uzyskanych preparatów białkowych dodawano glicerol do stężenia końcowego 20% i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. Uzyskano zestaw preparatów białkowych, w tym wariant SecA typu dzikiego (SecAwt), oraz pięć zmutowanych wariantów SecA: SecAC843X, SecAP858L, SecAC841Y, SecAR837K, SecAC852Y o czystości około 70% (Rycina 11).



Rycina 11. Elektroforegram przedstawiający oczyszczone preparaty białek SecA. Masa cząsteczkowa białka SecA bakterii *H. pylori* - 99 kDa. WM - wzorzec masowy. W 8% żelu poliakrylamidowym rozdzielono 2 μg próbek: SecA typu dzikiego (SecAwt) oraz pięciu mutein SecA: (SecAC843X, SecAP858L, SecAC841Y, SecAR837K i SecAC852Y).

Ponadto dla wariantu białka dzikiego SecA (SecAwt) przeprowadzono analizę metodą immunoblottingu (Metody 6.21.) z użyciem przeciwciał anti-SecA (uzyskanych po oczyszczeniu białka SecA) oraz anti-6*His (Materiały 5.9.) (Rycina 12). Wyniki potwierdziły obecność białka pełnej długości poprzez jego detekcję zarówno przez przeciwciała anti-SecA, jak i anti-6*His.



Rycina 12. Analiza oczyszczonego preparatu SecA metodą immunoblottingu z użyciem przeciwciał anti-SecA i anti-6*His. W 8% żelu poliakrylamidowym rozdzielono 2 µg próbek. Masa cząsteczkowa białka SecA bakterii *H. pylori* - 99 kDa. **A.** Elektroforegram żelu poliakrylamidowego wybarwionego błękitem Coomassie (CBB). **B.** Detekcja antygenów białkowych z użyciem przeciwciał anti-SecA. **C.** Detekcja antygenów białkowych z użyciem przeciwciał anti-6*His.

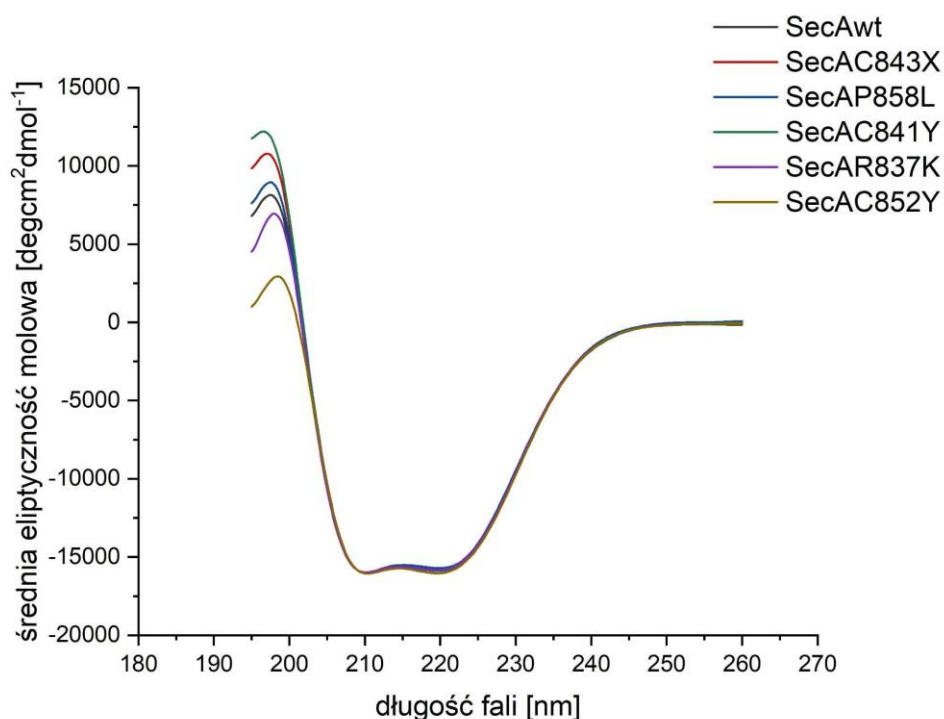
7.2. Analiza struktury II-rzędowej białka SecA *H. pylori*

W celu oceny wpływu mutacji w rejonie C-końcowym białek SecA na ich strukturę drugorzędową i stabilność termiczną przeprowadzono analizę metodą dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*). Technika ta polega na pomiarze różnic w absorbowaniu światła spolaryzowanego kołowo lewoskrętnie i prawoskrętnie przez cząsteczki asymetryczne i zdolne do absorpcji, takie jak białka. Asymetria białek wynika z chiralności aminokwasów, a w konsekwencji z chiralnego ułożenia wiązań peptydowych w elementach struktury drugorzędowej (α -helisy i β -harmonijki). Spektroskopia dichroizmu kołowego w zakresie dalekiego ultrafioletu (180–250 nm) odzwierciedla absorpcję przez wyżej wspomniane wiązania. Wzrost absorbancji światła spolaryzowanego lewoskrętnie prowadzi do pojawienia się dodatniego pasma w widmie CD, natomiast ujemne pasmo występuje, gdy w większym stopniu absorbowane jest światło spolaryzowane prawoskrętnie. Poszczególne elementy struktury białek odpowiadają za charakterystyczne sygnały: α -helisy manifestują się obecnością dwóch ujemnych pasm o wartościach minimalnych przy 208 i 222 nm oraz jednym dodatnim o maksimum przy 193 nm, natomiast β -harmonijki są widoczne jako pasmo dodatnie przy 218 nm oraz ujemne przy 195 nm [188,189].

W niniejszej pracy metodę tę zastosowano do porównania struktury białka SecA *H. pylori* typu dzikiego oraz mutein SecA, zawierających substytucje aminokwasowe w rejonie C-końcowym, co pozwoliło na ocenę wpływu tych mutacji na strukturę drugorzędową oraz stabilność termiczną białek (Metody 6.26.1.1.; 6.26.1.2.). Białka do analiz otrzymano zgodnie z opisem w rozdziale Wyniki 7.1.

7.2.1. Badanie zmian w strukturze II-rzędowej białka SecA i mutein SecA *H. pylori*

Profile widm badanych białek były bardzo podobne z minimum przy fali długości 209 nm (Rycina 13). Wszystkie analizowane warianty wykazywały widma charakterystyczne dla białek o przewadze struktur α -helikalnych z dwoma charakterystycznymi ujemnymi pasmami w zakresie długości fal 208 - 222 nm. Wskazuje to, iż substytucje w rejonie C-końcowym SecA nie wpłynęły w znaczący sposób na jego II-rzędową strukturę.

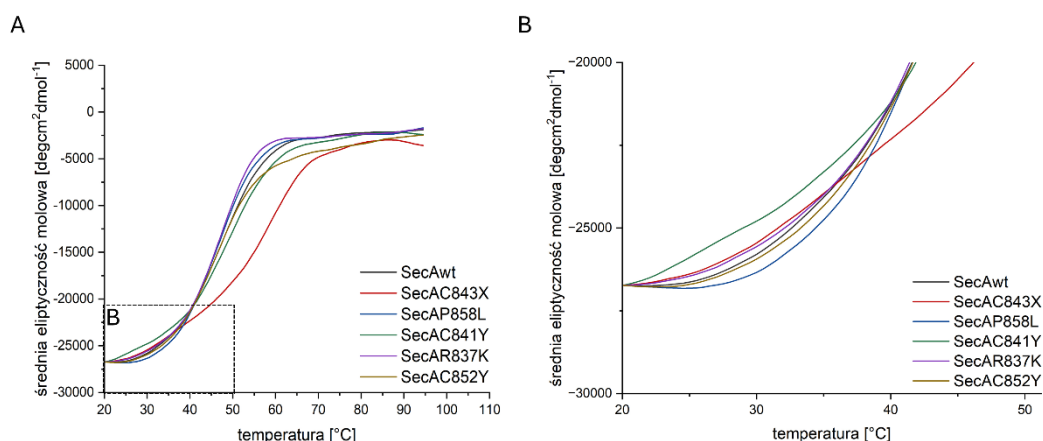


Rycina 13. Widma zmutowanych wariantów SecA oraz SecA typu dzikiego w dalekim UV w 20°C.

7.2.2. Badanie stabilności termicznej białka SecA i mutein SecA *H. pylori*

Dichroizm kołowy w zakresie dalekiego UV nie dostarcza informacji o strukturze trzeciorzędowej białek, która odgrywa kluczową rolę w ich aktywności enzymatycznej. Jednakże, ocena stabilności struktur II-rzędowych pozwala pośrednio wnioskować o ewentualnych zmianach w organizacji struktury trzeciorzędowej.

Analiza krzywych denaturacji termicznej białek (Rycina 14) wykazała, że spośród badanych wariantów białka SecA, muteina SecAC843X (wariant skrócony SecA) charakteryzuje się podwyższoną stabilnością termiczną ($T_m = 54,5^{\circ}\text{C}$) w porównaniu z białkiem typu dzikiego ($T_m = 46,8^{\circ}\text{C}$). Niewielki wzrost stabilności zaobserwowano także dla wariantu SecAC841Y ($T_m = 48,1^{\circ}\text{C}$). Pozostałe muteiny (SecAP858L, SecAR837K, SecAC852Y) wykazywały wartości temperatury topnienia zbliżone do wariantu typu dzikiego, co wskazuje, że substytucje aminokwasowe w tych pozycjach nie wpływają na stabilność struktury białka (Tabela 28). Ponadto, na panelu B (Rycina 14) widoczne jest, że w przypadku SecAC841Y wartość eliptyczności molowej zmieniała się przy niższych temperaturach niż w przypadku pozostałych wariantów SecA, co może świadczyć o większej podatności tego wariantu na indukowane temperaturą zmiany strukturalne (rozwijanie białka lub start denaturacji).



Rycina 14. Krzywe denaturacji termicznej białek. Dopasowanie sigmoidalne Boltzmanna dla zależności wartości średniej eliptyczności molowej białka mierzonej dla długości fali 209 nm od temperatury: **A.** w zakresie 20-95°C; **B.** w zakresie 20-50°C. Dopasowanie krzywej sigmoidalnej przy użyciu funkcji Boltzmannna do danych eksperymentalnych przeprowadzono przy użyciu programu Origin (OriginLab Corporation, USA).

Tabela 28. Stabilność termiczna białka SecA typu dzikiego i mutein SecA.

wariant białka SecA	T _m [°C]
SecAwt	46,83±0,03
SecAC843X	54,53±0,17
SecAP858L	46,16±0,03
SecAC841Y	48,12±0,06
SecAR837K	46,07±0,05
SecAC852Y	46,30±0,09

Temperatury topnienia (T_m) zostały obliczone z krzywych denaturacji zgodnie z opisem w rozdziale Metody 6.26.1.

7.2.3. Analiza stopnia oligomeryzacji białka SecA i mutein SecA *H. pylori*

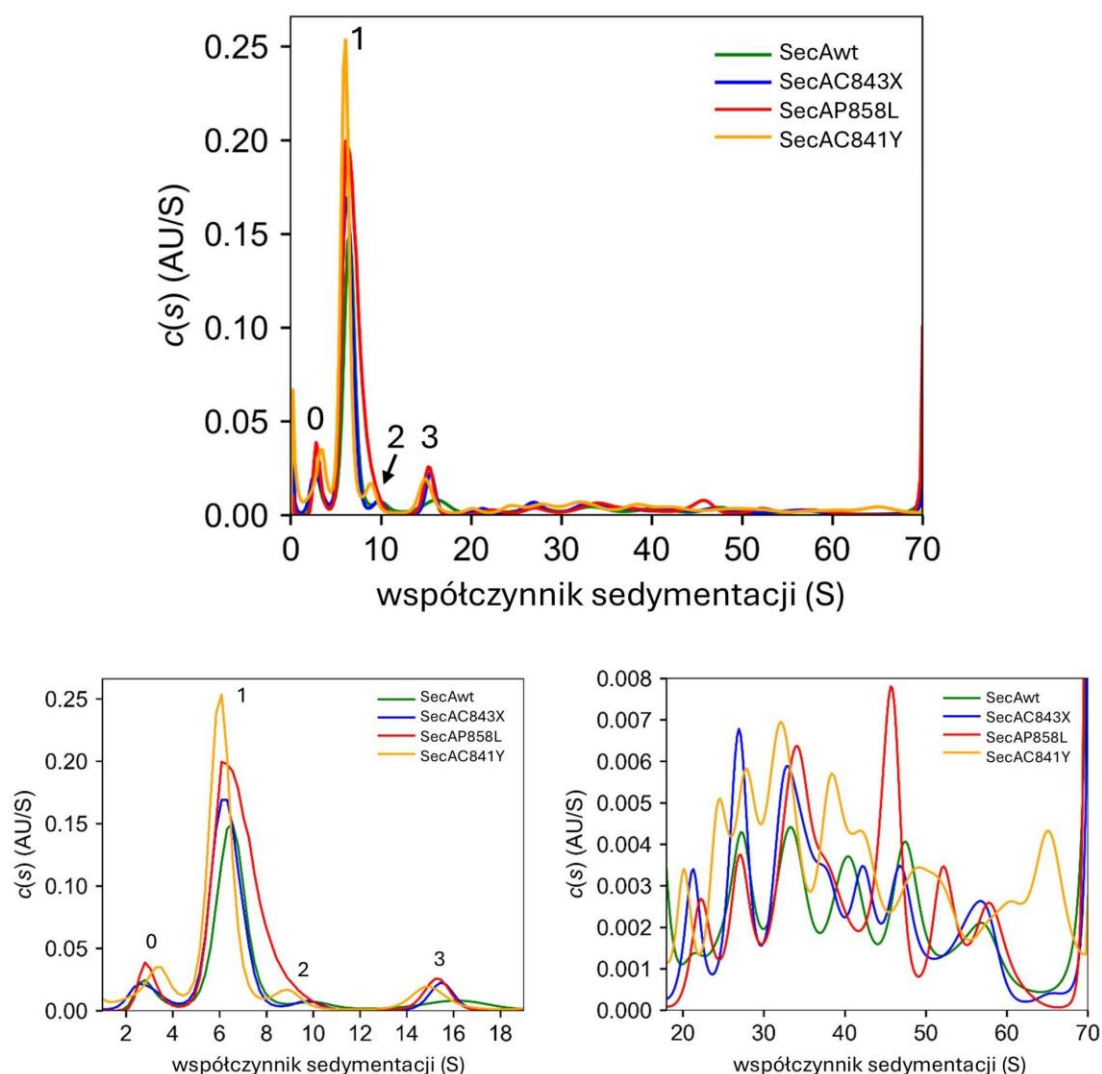
Stopień oligomeryzacji białka SecA u *E. coli* nie jest jednoznacznie ustalony, jednak liczne badania sugerują, że w trakcie transportu przez błonę funkcjonuje ono głównie jako dimer, a mutacje prowadzące do monomeryzacji znoszą jego aktywność [116]. Brak jest danych literaturowych na temat struktur IV-rzędowych SecA *H. pylori*. W celu zbadania zdolności tego białka do tworzenia struktur oligomerycznych oraz oceny wpływu mutacji w rejonie C-końcowym białek SecA na ten proces, przeprowadzono analizę wielkości cząsteczek metodą ultrawierowania analitycznego (Metody 6.26.2). Technika ta umożliwia badanie masy cząsteczkowej i stopnia oligomeryzacji białek w roztworze, poprzez pomiar współczynników sedymentacji różnych form oligomerycznych [190]. Dzięki temu określono, czy badane warianty białka SecA występują w roztworze w formie monomerycznej, dimerycznej lub w postaci większych oligomerów.

Analiza wykazała, że wszystkie warianty SecA występują jako mieszanina wielu form oligomerycznych z domieszką agregatów (współczynniki sedymentacji (*s*) w jednostkach Svedberga (S) do 70 S) (Tabela 29, Rycina 15 i 16). Dominującą formą w roztworach były cząsteczki o współczynniku sedymentacji (*s*) $\approx$ 6.1-6.8 S (48-67%, prawdopodobnie monomery, szczyt 1, Tabela 29). Frakcja formy dimerycznej (*s* $\approx$ 10 S, szczyt 2, Tabela 29, Rycina 15 i 16) jest niewielka (2-4%). W przypadku wariantu

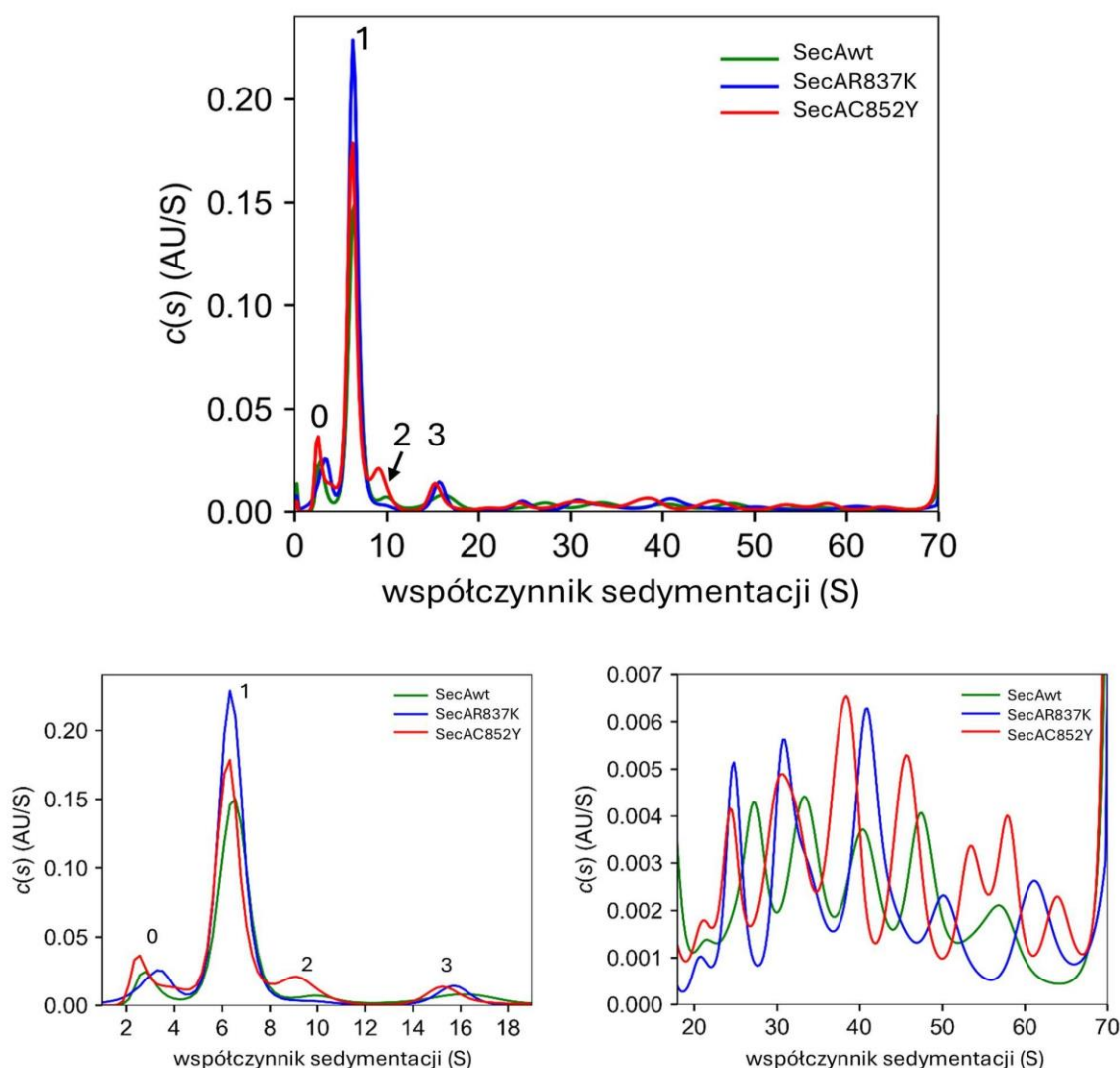
SecAP858L szczyt wskazujący na formę dimeryczną nie jest widoczny, a o obecności dimeru w tym wariantcie świadczy brak symetrii szczytu 1 (Rycina 15). Natomiast dla wariantu SecAC852Y szczyt odpowiadający dimerowi stanowi aż 8% (dla tego wariantu zaobserwowano też najmniejszą zawartość monomeru – 48%). Ponadto, w preparatach wszystkich wariantów widoczna była frakcja o współczynniku sedymentacji (s) $\approx$ 15-16 S (szczyt 3, prawdopodobnie tetramer, 5-7 %) oraz frakcja dużych oligomerów i agregatów stanowiąca od 21% (SecAP858L) do 29% (SecAC841Y i SecAC852Y) (piki do 70 S, Tabela 29, Rycina 15 i 16). Częsteczki o współczynniku sedymentacji (s) $\approx$ 3 S (7-10%), sedymentujące wolniej niż monomer SecA mogą odpowiadać produktom degradacji SecA (szczyt 0, Tabela 29, Rycina 15 i 16).

Tabela 29. Wartości współczynników sedymentacji (s) i udział procentowy poszczególnych form oligomerycznych wariantów białka SecA uzyskane metodą ultrawierowania analitycznego. (f/f_0) - współczynnik tarcia względnego; (s) - współczynnik sedymentacji w jednostkach Svedberga (S). A- szczyt nie jest symetryczny, widoczne ramię z prawej strony sięgające do $\sim$ 11 S; B- szczyt 2 bardzo mały, słabo oddzielony od szczytu 1; podane wartości s pochodzą z ręcznego całkowania rozkładu $c(s)$.

wariant SecA	f/f_0	s [S] (zawartość %)				
		szczyt 0	szczyt 1 (monomer)	szczyt 2 (dimer)	szczyt 3 (tetramer)	szczyty do 70 S
wt	0.887	3.0 (7)	6.5 (56)	10.3 (4)	16.0 (7)	(26 %)
C843X	0.953	2.9 (8)	6.3 (58)	9.8 (3)	15.5 (6)	(26 %)
P858L	0.867	3.0 (6)	6.8 (67) ^A	–	15.3 (6)	(21 %)
C841Y	0.993	3.2 (10)	6.1 (51)	9.1 (4)	15.0 (7)	(29 %)
R837K	0.910	3.2 (9)	6.4 (61) ^B	9.9 (2) ³	15.7 (5)	(22 %)
C852Y	0.950	3.1 (10)	6.3 (48)	9.4 (8)	15.5 (6)	(29 %)



Rycina 15. Analiza stanu oligomerycznego białka SecA i wariantów SecAC843X, SecAP858L i SecAC841Y metodą ultrawierowania analitycznego. Rozkłady współczynników sedymentacji $c(s)$ dla preparatów SecA, rejestrowane przy 280 nm. (s) - współczynnik sedymentacji w jednostkach Svedberga (S), odpowiadający różnym formom oligomerycznym białka. Numerami (0, 1, 2, 3) oznaczono poszczególne szczyty odpowiadające odpowiednio: 0 - przypuszczalnym produktom degradacji, 1 - formie monomerycznej, 2 - formie dimerycznej, 3 - formie tetramerycznej. Wykres górny przedstawia pełny zakres rozkładu współczynników sedymentacji 0–70 S, natomiast wykresy dolne pokazują te same dane podzielone na dwa przedziały (0–19 S i 19–70 S).



Rycina 16. Analiza stanu oligomerycznego białka SecA i wariantów SecAR837K, i SecAC852Y metodą ultrawierowania analitycznego. Rozkłady współczynników sedymentacji $c(s)$ dla preparatów SecA, rejestrowane przy 280 nm. (s) - współczynnik sedymentacji w jednostkach Svedberga (S), odpowiadający różnym formom oligomerycznym białka. Numerami (0, 1, 2, 3) oznaczono poszczególne szczyty odpowiadające odpowiednio: 0 - przypuszczalnym produktom degradacji, 1 - formie monomerycznej, 2 - formie dimerycznej, 3 - formie tetramerycznej. Wykres górny przedstawia pełny zakres rozkładu współczynników sedymentacji 0–70 S, natomiast wykresy dolne pokazują te same dane podzielone na dwa przedziały (0–19 S i 19–70 S).

Wyznaczono także współczynnik tarcia względnego (f/f_0), który jest parametrem odzwierciedlającym odchylenie cząsteczki od idealnego kształtu kuli. Wyznacza się go jako stosunek doświadczalnie zmierzonego współczynnika sedymentacji (f) do maksymalnej wartości (f_0) obliczonej dla kuli o tej samej masie cząsteczkowej w identycznych warunkach. Typowe wartości tego współczynnika dla białek globularnych wynoszą $\geq 1,2$ [190]. Wyznaczone wartości f/f_0 dla wariantów SecA są niskie ($\sim 0,9$, zamiast $\geq 1,2$), co sugeruje istnienie dynamicznej równowagi między formami oligomerycznymi (Tabela 29).

7.3. Analiza wiązania białek SecA do liposomów

SecA, jako kluczowy element bakteryjnego systemu transportu białek (SEC), oddziałuje z błoną cytoplazmatyczną. Interakcja SecA z kompleksem SecYEG jest poprzedzona wiązaniem do obecnych w dwuwarstwie lipidowej fosfolipidów o charakterze kwasowym. Prowadzi to do zmian konformacyjnych w SecA i w konsekwencji zwiększa jego powinowactwo do SecYEG oraz wpływa na jego aktywność ATPazową [112,191].

W celu zbadania wpływu substytucji aminokwasowych w białku SecA na jego zdolność do wiązania się z błonami, wykorzystano wielowarstwowe liposomy powstałe na bazie ekstraktu lipidów *E. coli*, jako model bakteryjnej błony biologicznej. Stopień powinowactwa analizowano z wykorzystaniem rosnących stężeń liposomów i stałym stężeniu białka (Metody 6.30.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 17.

Wszystkie analizowane białka wiązały się do liposomów i nawet przy najniższym stężeniu lipidów nie zaobserwowano istotnej zawartości SecA we frakcji rozpuszczalnej – nie związanej z liposomami. Wynik ten sugeruje, że substytucje aminokwasowe w rejonie C-końcowym nie zaburzają w znaczący sposób oddziaływań SecA z lipidami błonowymi (Rycina 17).



Rycina 17. Analiza wiązania białka SecA i wariantów SecA do liposomów. Oczyszczone preparaty SecA: SecA typu dzikiego (SecAwt) i muteiny SecA: C843X, P858L, C841Y, R837K, C852Y inkubowano z wielowarstwowymi liposomami w trzech różnych stężeniach (10, 25 i 50 µg/ml). Po inkubacji mieszaniny odwirowano w celu rozdzielenia frakcji niezwiązanej (S - supernatant) od frakcji związanej z liposomami (O - osad). Próbkę analizowano metodą elektroforezy w 8% żelu poliakrylamidowym.

7.4. Oznaczenie aktywności ATPazowej białka SecA i mutein SecA *H. pylori*

W celu określenia wpływu mutacji punktowych w rejonie C-końcowym na aktywność enzymatyczną białka SecA przeprowadzono reakcje hydrolizy ATP. Do analiz wykorzystano zestaw Malachite Green Phosphate Assay (Sigma Aldrich, USA), który pozwala na ilościowe oznaczanie nieorganicznego fosforanu uwalnianego podczas hydrolizy ATP. Mechanizm reakcji polega na tworzeniu kompleksu molibdenianu z wolnym fosforanem, który w obecności barwnika przyjmuje intensywne, zielone zabarwienie. Intensywność barwy jest proporcjonalna do stężenia fosforanów powstałych w wyniku hydrolizy ATP w reakcji.

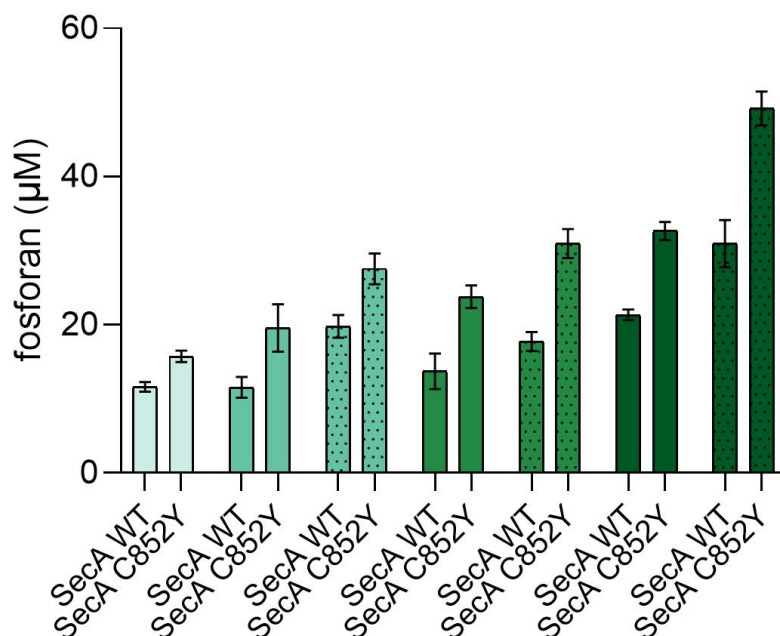
Białko SecA *E. coli* wymaga obecności szeregu ligandów do wydajnej hydrolizy ATP, z których najistotniejsze są: rozwinięte białko z peptydem sygnałowym oraz fosfolipidy błonowe [192,193]. Ponieważ brak jest doniesień literaturowych na temat preferencji SecA *H. pylori* względem ligandów, w pierwszym etapie przeprowadzono optymalizację warunków reakcji w obecności różnych ligandów SecA, co pozwoliło na wybór parametrów zapewniających efektywne monitorowanie aktywności ATPazowej. Wykorzystano syntetyczny peptyd CytPep (Materiały 5.8.), obejmujący N-końcową sekwencję sygnałową białka cytochromu C *H. pylori*, który jest fizjologicznym

substratem dla białka SecA i jest przez nie translokowany [194]. Do optymalizacji wykorzystano też rozwinięty nieaktywny proteolitycznie wariant peryplazmatycznego białka HtrA *H. pylori* bez peptydu sygnałowego które również jest uważane za fizjologiczny substrat dla SecA. Badano także wpływ liposomów (uzyskanych w Metody 6.27.) na aktywność ATPazową SecA. Następnie, dla wybranych warunków, wyznaczono kinetykę reakcji hydrolizy ATP przez białko SecA typu dzikiego oraz muteiny SecA, co pozwoliło na ocenę wpływu mutacji w rejonie C-końcowym na aktywność ATPazową SecA.

7.4.1. Optymalizacja warunków do oznaczania aktywności ATPazowej

W celu optymalizacji doświadczenia analizowano wpływ różnych kombinacji ligandów w mieszaninach (peptyd sygnałowy CytPep, rozwinięte białko HtrAS221A, liposomy), z różnymi stężeniami liposomów, w jednym punkcie czasowym (30 minut) przy stężeniu ATP 0,5 mM. Do optymalizacji wykorzystano dwa warianty SecA - białko typu dzikiego oraz muteinę C852Y (stężenia końcowe w reakcji: 0,5 μ M) (Metody 6.28.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 18.

Otrzymane wyniki wskazują, że aktywność ATPazowa SecA *H. pylori* jest stymulowana w obecności ligandów odpowiadających jego fizjologicznym partnerom. Interakcja z liposomami prowadziła do wzrostu aktywności w porównaniu z reakcją z wykorzystaniem samego białka SecA, a stopień stymulacji wzrastał wraz ze wzrostem stężenia liposomów (300 μ g/ml). Dodatek peptydu sygnałowego nie wpływał znacząco na aktywność ATPazy SecA w obecności liposomów. Najwyższą aktywność odnotowano w układzie zawierającym jednocześnie liposomy, peptyd sygnałowy oraz białko HtrAS221A, co wskazuje na synergistyczne działanie tych czynników i konieczność oddziaływania SecA zarówno z sekwencją sygnałową, jak i rozwiniętym łańcuchem polipeptydowym transportowanego białka. Ponadto zaobserwowano, że wariant posiadający substytucję aminokwasową C852Y charakteryzuje się podwyższoną aktywnością w porównaniu do białka typu dzikiego (Rycina 18).



- SecA (0,5 μM)
- SecA (0,5 μM) + lipidy (50 μg/ml)
- SecA (0,5 μM) + lipidy (300 μg/ml)
- SecA (0,5 μM) + lipidy (50 μg/ml) + peptyd (10 μM)
- SecA (0,5 μM) + lipidy(300 μg/ml) + peptyd (10 μM)
- SecA (0,5 μM) + lipidy (50 μg/ml) + peptyd (10 μM)+ HtrA (2,5 μM)
- SecA (0,5 μM) + lipidy (300 μg/ml) + peptyd (10 μM)+ HtrA (2,5 μM)

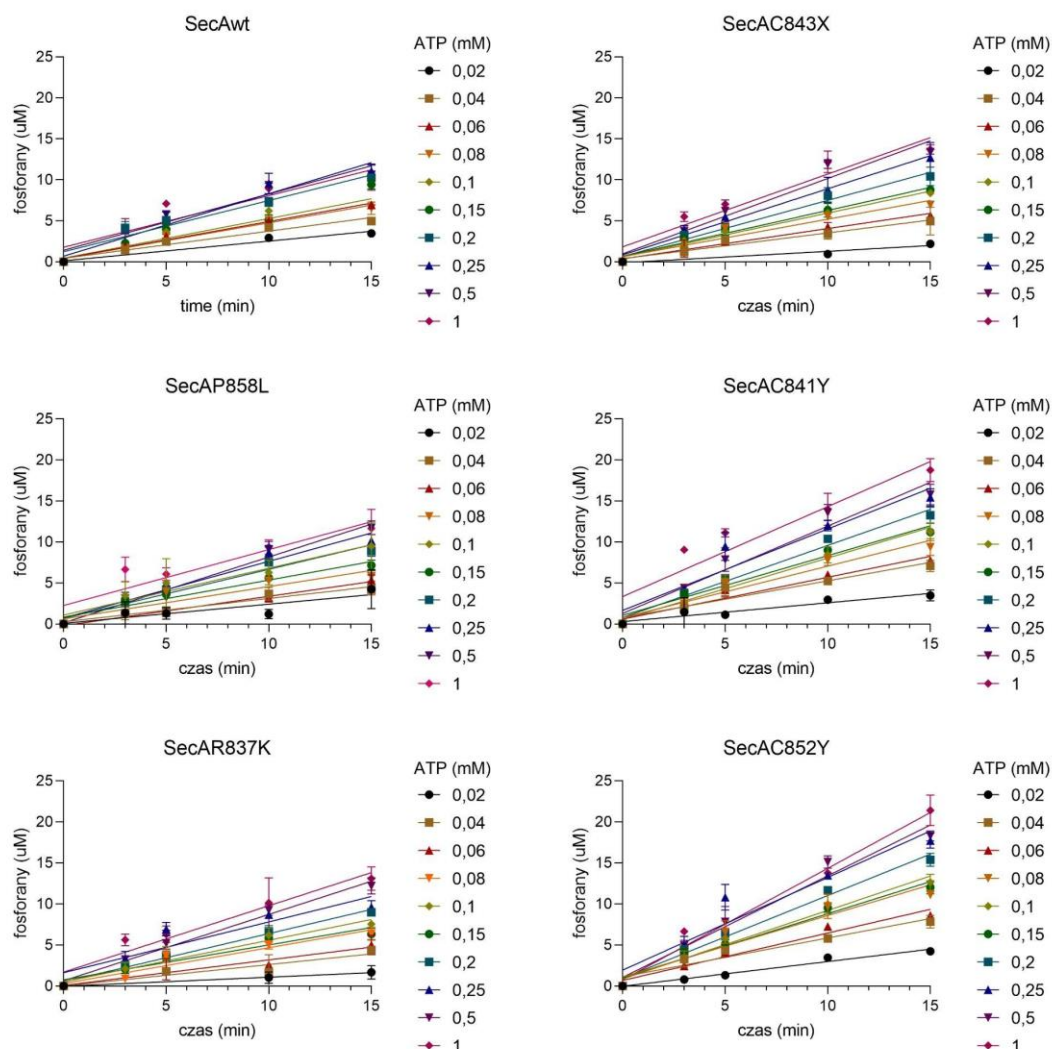
Rycina 18. Optymalizacja warunków reakcji do oznaczania aktywności ATPazowej białka SecA *H. pylori*. Aktywność ATPazową oznaczano z wykorzystaniem zestawu Malachite Green w obecności różnych ligandów i ich kombinacji. Badano wpływ liposomów (50 lub 300 μg/ml), peptydu sygnałowego CytPep (10 μM) oraz białka HtrAS221A (2,5 μM) na hydrolizę ATP katalizowaną przez SecA (0,5 μM). Ilość uwolnionego w reakcji fosforanu jest wprost proporcjonalna do aktywności ATPazowej. Reakcje przeprowadzono w jednym punkcie czasowym (30 minut) przy stężeniu ATP 0,5 mM w temperaturze 37°C.

7.4.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy ATP przez różne warianty białka SecA

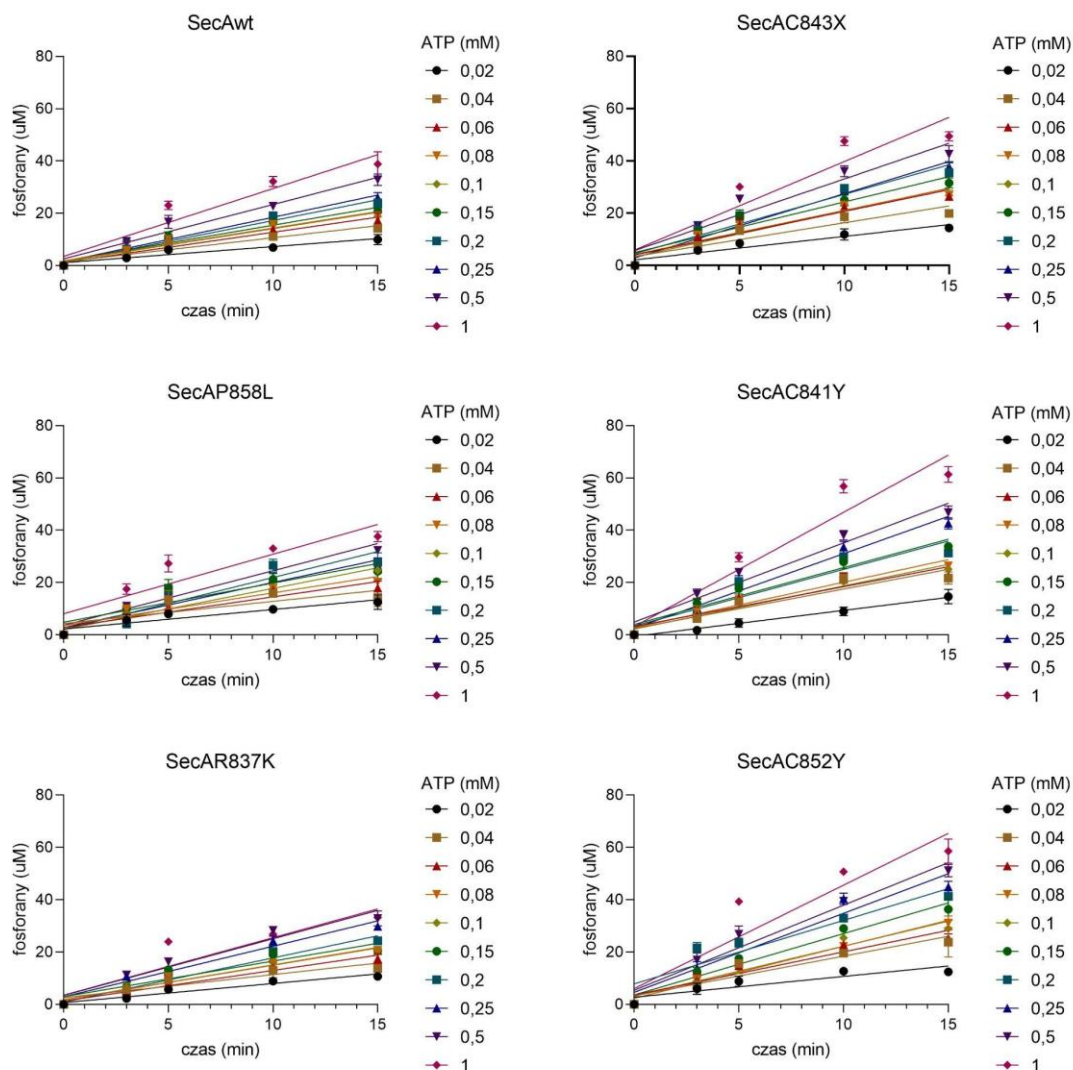
Po ustaleniu optymalnych warunków przeprowadzono reakcje prowadzące do oznaczenia aktywności ATPazowej białka SecA *H. pylori* oraz wariantów SecA z mutacjami w rejonie C-końcowym. Pomiary pozwoliły na wyznaczenie parametrów kinetycznych hydrolizy ATP i porównanie zdolności badanych białek do katalizy tej reakcji, co umożliwiło ocenę wpływu wprowadzonych mutacji na funkcjonowanie SecA.

Reakcje prowadzono w obecności ligandów dodawanych w określonych stężeniach (SecA - 0,5 μ M, peptyd CytPep - 10 μ M, białko HtrA - 2,5 μ M, liposomy - 300 μ g/ml). Dodatkowo, w celu oznaczenia aktywności podstawowej (bez ligandów), przeprowadzono reakcje zawierające jedynie enzym SecA (bez pozostałych komponentów). Reakcję hydrolizy ATP przez SecA przeprowadzano dla 4 punktów czasowych i 10 stężeń ATP (Metody 6.29.), w temperaturze 37°C. Zebrane dane posłużyły do wyznaczenia krzywych regresji zależności stężenia fosforanu (μ M) od czasu (minuty) (Rycina 19 i 20), na podstawie których obliczano szybkość reakcji jako nachylenie prostej regresji liniowej (v) (Metody 6.29.). Uzyskane wyniki dopasowywano metodą nieliniowej regresji do równania Michaelisa-Menten (Metody 6.29.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 21. Parametry charakteryzujące kinetykę reakcji hydrolizy ATP przez SecA przedstawiono w Tabeli 30. Dopasowanie krzywych wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism (GraphPad, Dotmatics, USA).

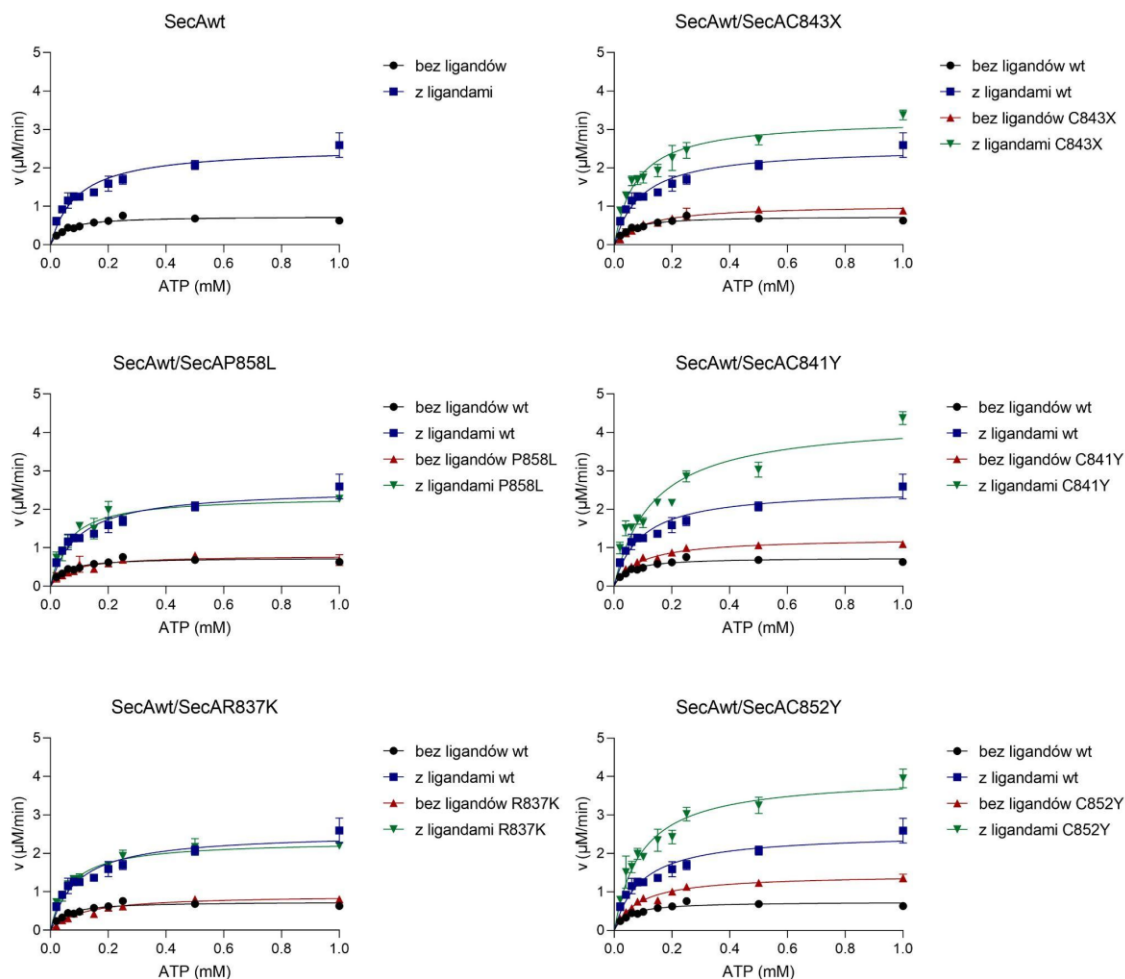
W niektórych przypadkach przy niskich stężeniach ATP, w początkowych punktach czasowych sporadycznie obserwowano wartości sygnału tła wyższe niż wartości uzyskane dla mieszanin reakcyjnych, dlatego nie były one uwzględniane w dalszej analizie.



Rycina 19. Krzywe regresji podstawowej aktywności ATPazowej (bez ligandów) białka SecA *H. pylori*. Krzywe zależności stężenia uwalnianego fosforanu (μM) od czasu reakcji (minuty) dla białka SecA typu dzikiego (SecAwt) oraz wariantów z mutacjami w rejonie C-końcowym (SecAC843X, SecAP858L, SecAC841Y, SecAR837K, SecAC852Y). Reakcje prowadzono w obecności ATP w zakresie stężeń 0,02–1 mM (Metody 6.29.), w temperaturze 37°C. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z trzech powtórzeń. Dopasowanie krzywych wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism (GraphPad, Dotmatics, USA).



Rycina 20. Krzywe regresji aktywności ATPazowej (z ligandami) białka SecA *H. pylori*. Krzywe zależności stężenia uwalnianego fosforanu (μM) od czasu reakcji (minuty) dla białka SecA typu dzikiego (SecAwt) oraz wariantów z mutacjami w rejonie C-końcowym (SecAC843X, SecAP858L, SecAC841Y, SecAR837K, SecAC852Y). Reakcje prowadzono w obecności ATP w zakresie stężeń 0,02–1 mM (Metody 6.29.), w temperaturze 37°C. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z trzech powtórzeń. Dopasowanie krzywych wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism (GraphPad, Dotmatics, USA).



Rycina 21. Kinetyka hydrolizy ATP katalizowanej przez białko SecA. Szybkość reakcji hydrolizy (v) ATP katalizowana przez białka SecA: SecA typu dzikiego (SecAwT) oraz warianty z mutacjami w rejonie C-końcowym (SecAC843X, SecAP858L, SecAC841Y, SecAR837K, SecAC852Y). Wyznaczano aktywność podstawową (bez ligandów - kolory czarny i czerwony) oraz w obecności komponentów oddziałujących z SecA (z ligandami - kolory niebieski i zielony). Reakcje przeprowadzano w temperaturze 37°C. Dane doświadczalne dopasowywano metodą nieliniowej regresji do równania Michaelisa-Menten. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z trzech powtórzeń. Dopasowanie krzywych wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism (GraphPad, Dotmatics, USA).

Tabela 30. Parametry kinetyczne hydrolizy ATP przez białka SecA. V_{max} - maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej, jaką enzym osiąga przy pełnym wysyceniu substratem, K_m - stała Michaelisa - stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji osiąga połowę wartości V_{max} , k_{kat} - liczba cząsteczek substratu przetworzonych przez cząsteczkę enzymu w czasie 1 sekundy. Wyniki wyrażono jako średnią z trzech powtórzeń.

wariant SecA	aktywność podstawowa (bez ligandów)			aktywność w obecności komponentów (z ligandami)		
	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	k_{kat} (1/s)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	k_{kat} (1/s)
wt	0,74 $\pm 0,03$	0,04 $\pm 0,002$	$2,48 \times 10^{-2}$ $\pm 0,09 \times 10^{-2}$	2,55 $\pm 0,19$	0,09 $\pm 0,02$	$8,49 \times 10^{-2}$ $\pm 0,63 \times 10^{-2}$
C843X	1,04 $\pm 0,05$	0,10 $\pm 0,01$	$3,48 \times 10^{-2}$ $\pm 0,16 \times 10^{-2}$	3,29 $\pm 0,07$	0,08 $\pm 0,01$	$11,0 \times 10^{-2}$ $\pm 0,23 \times 10^{-2}$
P858L	0,80 $\pm 0,11$	0,07 $\pm 0,02$	$2,69 \times 10^{-2}$ $\pm 0,38 \times 10^{-2}$	2,35 $\pm 0,04$	0,06 $\pm 0,02$	$7,84 \times 10^{-2}$ $\pm 0,15 \times 10^{-2}$
C841Y	1,25 $\pm 0,03$	0,09 $\pm 0,006$	$4,18 \times 10^{-2}$ $\pm 0,10 \times 10^{-2}$	4,35 $\pm 0,12$	0,13 $\pm 0,01$	$14,5 \times 10^{-2}$ $\pm 0,39 \times 10^{-2}$
R837K	0,92 $\pm 0,05$	0,11 $\pm 0,01$	$3,06 \times 10^{-2}$ $\pm 0,19 \times 10^{-2}$	2,33 $\pm 0,15$	0,07 $\pm 0,01$	$7,76 \times 10^{-2}$ $\pm 0,51 \times 10^{-2}$
C852Y	1,46 $\pm 0,10$	0,09 $\pm 0,02$	$4,87 \times 10^{-2}$ $\pm 0,35 \times 10^{-2}$	4,02 $\pm 0,15$	0,09 $\pm 0,01$	$13,4 \times 10^{-2}$ $\pm 0,49 \times 10^{-2}$

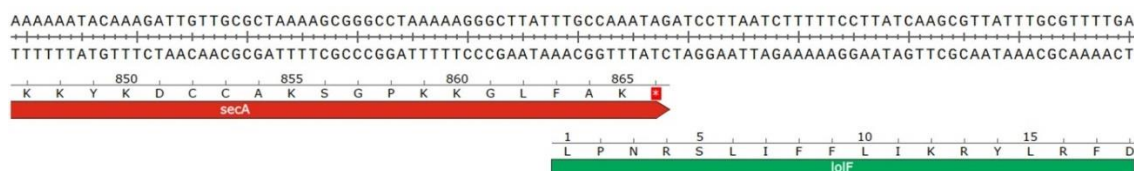
Parametry kinetyczne reakcji hydrolizy ATP przez białka SecA wskazują na wyraźny wzrost aktywności enzymatycznej w obecności ligandów (peptyd sygnałowy CytPep, białko substratowe HtrA, liposomy). Wyznaczone parametry V_{max} i k_{kat} w obecności ligandów wzrosły kilkukrotnie, w porównaniu do aktywności podstawowej (bez ligandów), zarówno dla białka SecA typu dzikiego jak i dla wszystkich analizowanych wariantów, przy zbliżonych wartościach K_m (0,06 – 0,13 mM). Oznacza to, że obecność ligandów stymuluje aktywność ATP-azową SecA, nie wpływając znacząco na powinowactwo do substratu (Tabela 30).

W przypadku białka SecA typu dzikiego (SecAwt) aktywność podstawowa była stosunkowo niska, natomiast w obecności ligandów wartości V_{max} i k_{kat} wzrosły ponad

trzykrotnie, co wskazuje na efekt aktywacyjny. Obecność mutacji w rejonie C-końcowym w różnym stopniu wpłynęła na aktywność ATPazy SecA. W porównaniu do białka niezmutowanego, muteina C843X (skrótowy wariant SecA pozbawiony domeny MDB) wykazywała umiarkowaną podwyższoną aktywność podstawową i w obecności ligandów. Mutacje P858L i R837K nie wpłynęły istotnie na tempo hydrolizy ATP. Natomiast znacznie podwyższoną aktywność zaobserwowano dla mutein C841Y i C852Y – oba warianty charakteryzowały się znacznie wyższymi wartościami V_{max} i k_{kat} zarówno w reakcjach bez ligandów i w ich obecności (Tabela 30).

7.5. Konstrukcja szczepów *H. pylori* zawierających mutacje punktowe w rejonie C-końcowym genu *secA*

W ramach pracy podjęto się konstrukcji szczepów *H. pylori* zawierających mutacje punktowe w rejonie C-końcowym genu *secA*, które zostały uprzednio zidentyfikowane w genomach szczepów pozbawionych funkcjonalnej proteazy HtrA [180]. Zmutowane szczepy umożliwiłyby ocenę wpływu tych mutacji na fizjologię komórki bakteryjnej. Warto podkreślić, że w chromosomie *H. pylori* geny *secA* i *lolF* znajdują się w tej samej jednostce transkrypcyjnej, a sekwencja genu *secA* częściowo nakłada się z sekwencją genu *lolF* - koniec genu *secA* zachodzi na początek genu *lolF* (11 ostatnich nukleotydów z sekwencji genu *secA* jest jednocześnie początkiem sekwencji genu *lolF* z niekanonicznym kodonem „start” TTG do rozpoczęcia translacji w alternatywnej ramce odczytu) (Rycina 22). Fakt ten znacząco utrudnił uzyskanie szczepów *H. pylori* ze zmutowanymi genami *secA*. W niniejszym rozdziale przedstawiono zastosowane podejścia eksperymentalne oraz poszczególne etapy pracy związane z konstrukcją zmutowanych szczepów *H. pylori*.

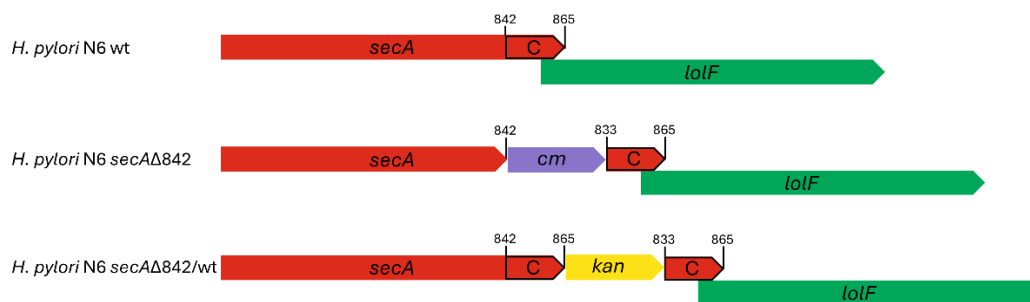


Rycina 22. Fragment sekwencji nukleotydowej genomu *H. pylori* obejmujący operon *secA-lolF*. Miejsce nakładania się genów *secA* (czerwony) i *lolF* (zielony). Pokazano nukleotydy w rejonie końca 3' *secA*, końca 5' *lolF* oraz odpowiadające im aminokwasy. Obraz wygenerowany w programie SnapGene v8.1.1.

7.5.1. Delecja fragmentu C-końcowego genu *secA* z przerwaniem ciągłości operonu

Wprowadzenie mutacji punktowych do genomu bakteryjnego często stanowi wyzwanie, przede wszystkim ze względu na trudności w selekcji rekombinantów. Samo pojawienie się oporności na antybiotyki niestety nie jest jednoznaczne z uzyskaniem właściwego mutantu. W związku z tym, w pierwszym etapie konstrukcji szczepów *H. pylori* zmutowanych w genie *secA*, postanowiono usunąć fragment od kodonu cysteiny 843 do końca genu. Miało to na celu uzyskanie skróconego genu, do którego możliwe byłoby następnie wstawienie brakującego fragmentu zawierającego mutację punktową wraz z kasetą oporności na antybiotyki. Dzięki temu byłby możliwa selekcja właściwych szczepów nie tylko na podstawie oporności na antybiotyki, ale także różnic w długości genu *secA*. Komórki *H. pylori* transformowano liniowymi konstruktami DNA umożliwiającymi wprowadzenie mutacji (Metody 6.3). Konstrukty obejmowały ramiona homologii odpowiadające sekwencjom genów *secA* i genu występującego za *secA*, *lolF* oraz kasetę oporności na antybiotyki bez sekwencji terminacji transkrypcji, co umożliwiało integrację kasety w miejscu zlokalizowanym pomiędzy tymi genami. Ponieważ geny *secA* i *lolF* częściowo się nakładają (Rycina 22), w konstrukcie przed sekwencją genu *lolF* zduplikowano końcowy fragment genu *secA* obejmujący 99 nukleotydów, w celu zapewnienia ciągłości transkryptu *lolF* i ewentualnych sekwencji regulatorowych przed genem. Do przygotowania konstruktów metodą PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków (Metody 6.10.) użyto starterów: 29-36 (Materiały 5.1., Tabela 6).

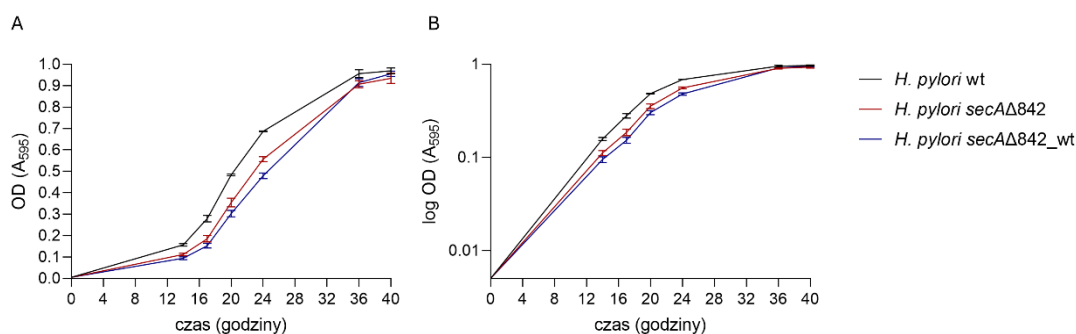
Konstrukcja szczepu *H. pylori* z mutacją powodującą skrócenie genu *secA* (*secAC843X*) oraz szczepu komplementacyjnego z przywróconym genem *secA* wt powiodły się. Schemat konstrukcji szczepu ze skróconym genem *secA* oraz szczepu komplementacyjnego przedstawiono na Rycinie 23.



Rycina 23. Schemat konstrukcji szczepów *H. pylori* z delecją fragmentu C-końcowego genu *secA* oraz szczepu komplementacyjnego. Schemat regionu chromosomu *secA-lolF* w szczepach *H. pylori*: typu dzikiego (wt), z mutacją powodującą skrócenie *secA* ($\Delta 842$) i w szczepie komplementacyjnym ($\Delta 842$ /wt). Czarną ramką (C) zaznaczono usuwany fragment C-końca (kodujący aminokwasy od 843-865) oraz zduplikowany fragment C-końca (kodujący aminokwasy od 833-865). *cm* - kaseta oporności na chloramfenikol, *kan* - kaseta oporności na kanamycynę. Strzałki przedstawiają kierunek transkrypcji genów.

Poprawność skonstruowanych szczepów potwierdzono poprzez sekwencjonowanie z wykorzystaniem starterów 5-11 (Materiały 5.1., Tabela 6) (Metody 6.8.). Otrzymano szczep *H. pylori secA $\Delta 842$ oraz szczep komplementacyjny *H. pylori secA $\Delta 842$ _wt.**

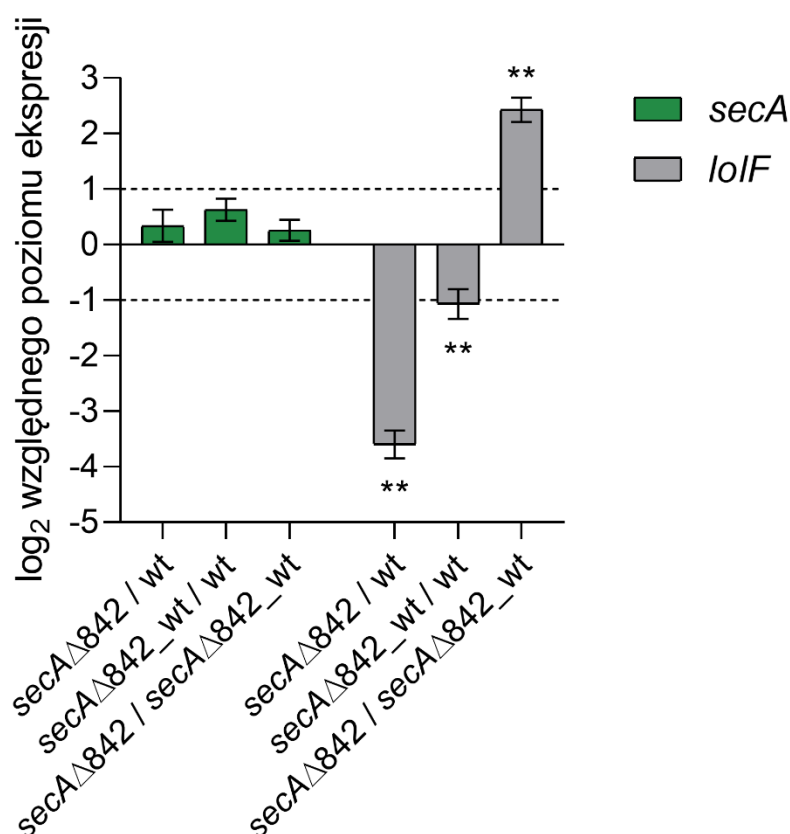
W celu oceny wpływu wprowadzonych modyfikacji genetycznych na tempo wzrostu i kondycję komórek bakteryjnych wykonano analizę krzywych wzrostu uzyskanych szczepów *H. pylori* (Metody 6.2.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 24.



Rycina 24. Krzywe wzrostu szczepów *H. pylori* wt, *H. pylori secA $\Delta 842$ i *H. pylori secA $\Delta 842$ _wt.** Tempo wzrostu oceniano spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru gęstości optycznej hodowli przy długości fali 595 nm w funkcji czasu. **A.** Krzywe wzrostu przedstawione w skali liniowej. **B.** Krzywe wzrostu przedstawione w skali logarytmicznej. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z trzech powtórzeń.

Analiza krzywych wzrostu wykazała, że wprowadzenie kasety oporności na antybiotyki pomiędzy geny *secA* a *lolF* nie wpłynęło znacząco na tempo wzrostu uzyskanych szczepów *H. pylori*.

Ze względu na nakładanie się sekwencji kodujących *secA* i *lolF*, kluczowym etapem dalszych analiz było określenie, czy przeprowadzone manipulacje genetyczne nie wywołały efektu polarnego w operonie *secA/lolF*. W tym celu zbadano poziom ekspresji obu genów operonu metodą ilościowej reakcji PCR (qPCR, ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) (Metody 6.14.). Jako referencyjne wytypowano geny: dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori secAΔ842* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori secAΔ842_wt* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori secAΔ842* i *H. pylori secAΔ842_wt* - *adk* i *gyrB*. Wyniki analizy ilościowego PCR przedstawiono w Tabeli 31 oraz na Rycinie 25.



Rycina 25. Analiza poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w szczepach *H. pylori* z przerwaną ciągłością operonu *secA-lolF*. Względna zmiana poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* wyrażona jako log₂ w szczepach *H. pylori secA*Δ842 i *H. pylori secA*Δ842_wt w porównaniu do szczepu typu dzikiego *H. pylori* wt, oraz w szczepie *H. pylori secA*Δ842 w porównaniu do szczepu *H. pylori secA*Δ842_wt, analizowana metodą qPCR. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z pięciu powtórzeń biologicznych. Dane analizowano dla trzech powtórzeń technicznych. Pozioma linia przerywana wskazuje względny dwukrotny wzrost poziomu ekspresji. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Tabela 31. Poziom ekspresji genów *secA* i *lolF* w szczepach *H. pylori* z przerwana ciągłością operonu *secA-lolF*. Względna zmiana poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w szczepach *H. pylori secAΔ842* i *H. pylori secAΔ842_wt* w porównaniu do szczepu typu dzikiego *H. pylori wt*, oraz w szczepie *H. pylori secAΔ842* w porównaniu do szczepu *H. pylori secAΔ842_wt*, analizowana metodą qPCR. Dane analizowano dla pięciu powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

porównywane szczepy	<i>secA</i>	<i>lolF</i>
<i>H. pylori secAΔ842</i> / <i>H. pylori wt</i>	1,2 ± 0,26	↓ 0,1 ± 0,01**
<i>H. pylori secAΔ842_wt</i> / <i>H. pylori wt</i>	1,6 ± 0,24	↓ 0,5 ± 0,09**
<i>H. pylori secAΔ842</i> / <i>H. pylori secAΔ842_wt</i>	1,2 ± 0,15	↑ 5,4 ± 0,9**

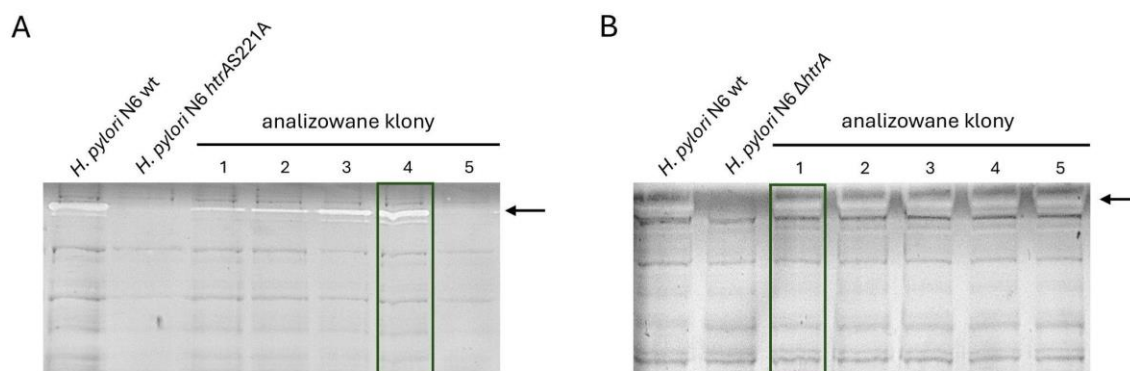
Analiza poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w uzyskanych szczepach wykazała, że wprowadzone mutacje zaburzyły prawidłowe funkcjonowanie operonu *secA-lolF*. Ekspresja genu *secA* nie została zaburzona, aczkolwiek w szczepie ze skróconym genem *secA* *H. pylori secAΔ842* zaobserwowano niewielkie podwyższenie poziomu mRNA *secA*. Z kolei ekspresja genu *lolF* była istotnie zmniejszona w szczepie *H. pylori secAΔ842*, a komplementacja C-końca w szczepie *H. pylori secAΔ842_wt* nie przywróciła poziomu ekspresji genu *lolF* do wartości obserwowanych w szczepie typu dzikiego (Rycina 25, Tabela 31). Wyniki te wskazują na wystąpienie efektu polarnego spowodowanego przerwaniem ciągłości operonu, co wyklucza uzyskane szczepy jako model do badania wpływu mutacji punktowych w genie *secA* na fizjologię komórki *H. pylori*.

7.5.2. Przywrócenie niezmutowanego genu *htrA* w szczepach z mutacjami supresorowymi w *secA*

Ze względu na zaobserwowany efekt polarny w operonie *secA/lolF*, zdecydowano się na zastosowanie alternatywnej strategii konstruowania szczepów. Ponieważ wcześniej skonstruowane szczepy z mutacjami w genie *htrA* zawierały równocześnie mutacje supresorowe na końcu 5' genu *secA*, uznano, że przywrócenie dzikiego genotypu w *htrA* pozwoli na uzyskanie szczepów *secA* bez wprowadzania zmian w operonie *secA-lolF*, a tym samym uniknięcie zaburzeń jego funkcjonowania.

W tym celu wykorzystano szczepy znajdujące się w kolekcji Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego: *H. pylori* N6 *htrAS221A*, zawierający mutację *secAC841Y* i *H. pylori* N6 Δ *htrA* zawierający mutację *secAC852Y* (Materiały 5.2.) [180]. W szczepie *H. pylori* N6 Δ *htrA* z mutacją *secAR837K* genotyp dziki *htrA* został przywrócony w ramach wcześniejszych badań [180]. Zmutowane szczepy *htrA* z dwoma pozostałymi mutacjami: *secAC843X* (substytucja w kodonie C843, powodująca powstanie kodonu STOP) oraz *secAP858L* wykazywały niską żywotność, co uniemożliwiło dalsze prowadzenie prac z ich wykorzystaniem.

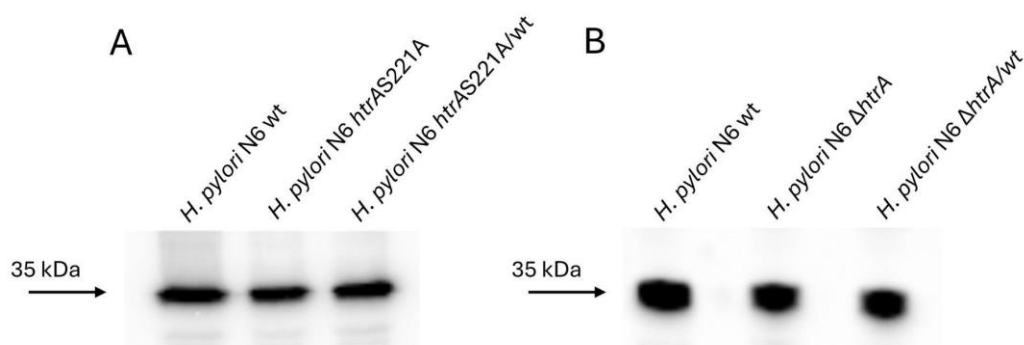
Z użyciem starterów nr 25 i 26 (Materiały 5.1., Tabela 6) powielono fragment DNA (Metody 6.9.) obejmujący lewe ramię homologii dla genu *htrA*, gen *htrA* typu dzikiego, kasetę oporności na chloramfenikol oraz prawe ramię homologii, używając jako matrycy genomowego DNA *H. pylori* N6 *secAR837K* (Metody 6.6.). Uzyskanym fragmentem transformowano szczepy *H. pylori* N6 *htrAS221A* oraz *H. pylori* N6 Δ *htrA* zawierające mutacje punktowe w genie *secA* (Metody 6.3.). Następnie, w celu potwierdzenia przywrócenia aktywności proteolitycznej HtrA w tych szczepach, wykonano zymografię kazeinową (Metody 6.19.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 26.



Rycina 26. Analiza aktywności proteolitycznej białka HtrA metodą zymografii kazeinowej w szczepach *H. pylori*. Strzałką wskazano położenie aktywnych proteolitycznie oligomerów HtrA (widoczny sygnał degradacji kazeiny). **A.** Analizowane klony szczepu *H. pylori* N6 *htrAS221A*, w których przywrócono wariant genu *htrA* typu dzikiego, w porównaniu do szczepu typu dzikiego *H. pylori* N6 wt (kontrola pozytywna) oraz szczepu z nieaktywnym proteolitycznie białkiem HtrA *H. pylori* N6 *htrAS221A* (kontrola negatywna). **B.** Analizowane klony szczepu *H. pylori* N6 Δ *htrA*, w których przywrócono wariant genu *htrA* typu dzikiego, w porównaniu do szczepu typu dzikiego *H. pylori* N6 wt (kontrola pozytywna) oraz szczepu z delecją genu *htrA* *H. pylori* N6 Δ *htrA* (kontrola negatywna). Zielonymi ramkami zaznaczono klony wykorzystane do dalszych analiz.

Analiza uzyskanych szczepów metodą zymografii kazeinowej potwierdziła przywrócenie aktywności proteolitycznej HtrA odpowiadającej fenotypowi typu dzikiego. Do dalszych badań wybrano klon nr 4 (dla szczepu *H. pylori* N6 *htrAS221A*) oraz klon nr 1 (dla szczepu *H. pylori* N6 Δ *htrA*).

Dodatkowo, w celu wykluczenia potencjalnego efektu polarnego wynikającego z obecności kasety oporności na antybiotyki za genem *htrA*, zbadano poziom białka HP1021, kodowanego przez gen znajdujący się w tym samym operonie co *htrA*. Przeprowadzono analizę uzyskanych klonów metodą immunoblottingu (Metody 6.21.) z użyciem przeciwciał anti-HP1021 (Materiały 5.9.). Na żele nanoszono równe ilości białek, co zweryfikowano elektroforetycznie oraz densytometrycznie. Wyniki przedstawiono na Rycinie 27.



Rycina 27. Analiza poziomu białka HP1021 metodą immunoblottingu w uzyskanych szczepach *H. pylori*. Masa cząsteczkowa białka HP_1021 - 35 kDa. **A.** Poziom białka HP_1021 w szczepie typu dzikiego (*H. pylori* N6 wt), w szczepie z mutacją w genie *htrA* (*H. pylori* N6 *htrAS221A*) oraz w szczepie, w którym przywrócono wariant genu *htrA* typu dzikiego (*H. pylori* N6 *htrAS221A*/wt). **B.** Poziom białka HP_1021 w szczepie typu dzikiego (*H. pylori* N6 wt), w szczepie z delecją genu *htrA* (*H. pylori* N6 Δ *htrA*) oraz w szczepie, w którym przywrócono gen *htrA* typu dzikiego (*H. pylori* N6 Δ *htrA*/wt).

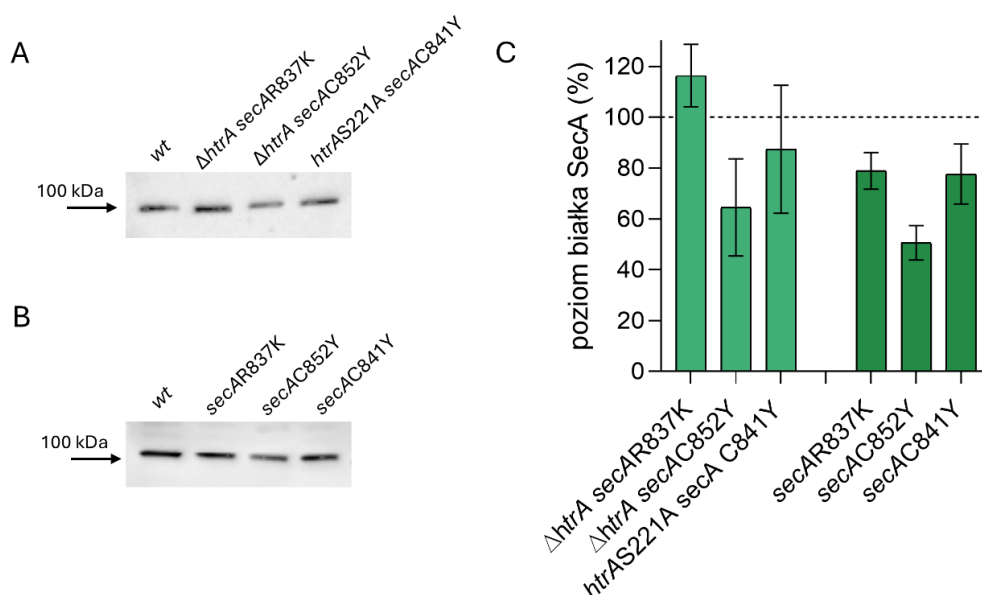
W obu przypadkach nie zaobserwowano różnic w poziomie białka HP1021 między analizowanymi szczepami, co wskazuje, że przeprowadzone manipulacje genetyczne nie spowodowały zaburzeń funkcjonowania operonu.

Dodatkowo, z wykorzystaniem starterów 27-28 oraz 5-11 (Materiały 5.1., Tabela 6) przeprowadzono sekwencjonowanie rejonów genomu zawierających geny *htrA* i *secA* w uzyskanych szczepach (Metody 6.8.). Sekwencjonowanie potwierdziło przywrócenie genotypu typu dzikiego w genie *htrA* oraz obecność mutacji punktowych w rejonie 5' genu *secA*. W ten sposób uzyskano szczepy *H. pylori* N6 *secAC841Y* i *H. pylori* N6

secAC852Y (Materiały 5.2.), które wraz ze szczepem *H. pylori* N6 *secAR837K* znajdującym się w kolekcji Katedry (Materiały 5.2.) – stanowiły zestaw do badań wpływu mutacji w rejonie C-końcowym *secA* na fizjologię bakterii *H. pylori*.

7.5.3. Analiza poziomu białka SecA w zmutowanych szczepach *H. pylori*

W celu oceny wpływu substytucji aminokwasowych w rejonie C-końcowym SecA, na jego poziom w komórkach *H. pylori* przeprowadzono analizę metodą immunoblottingu (Metody 6.21.) z wykorzystaniem przeciwciał anti-SecA (Materiały 5.9.). Analizowano szczepy *H. pylori* z mutacjami w genach *htrA* i *secA* ($\Delta htrA$ *secAR837K*, $\Delta htrA$ *secAC852Y*, *htrAS221A* *secAC841Y*), oraz te, w których przywrócono aktywność proteolityczną HtrA (*secAR837K*, *secAC852Y*, *secAC841Y*). Na żele nanoszono równe ilości białek, co zweryfikowano elektroforetycznie oraz densytometrycznie. Wyniki przedstawiono na Rycinie 28.



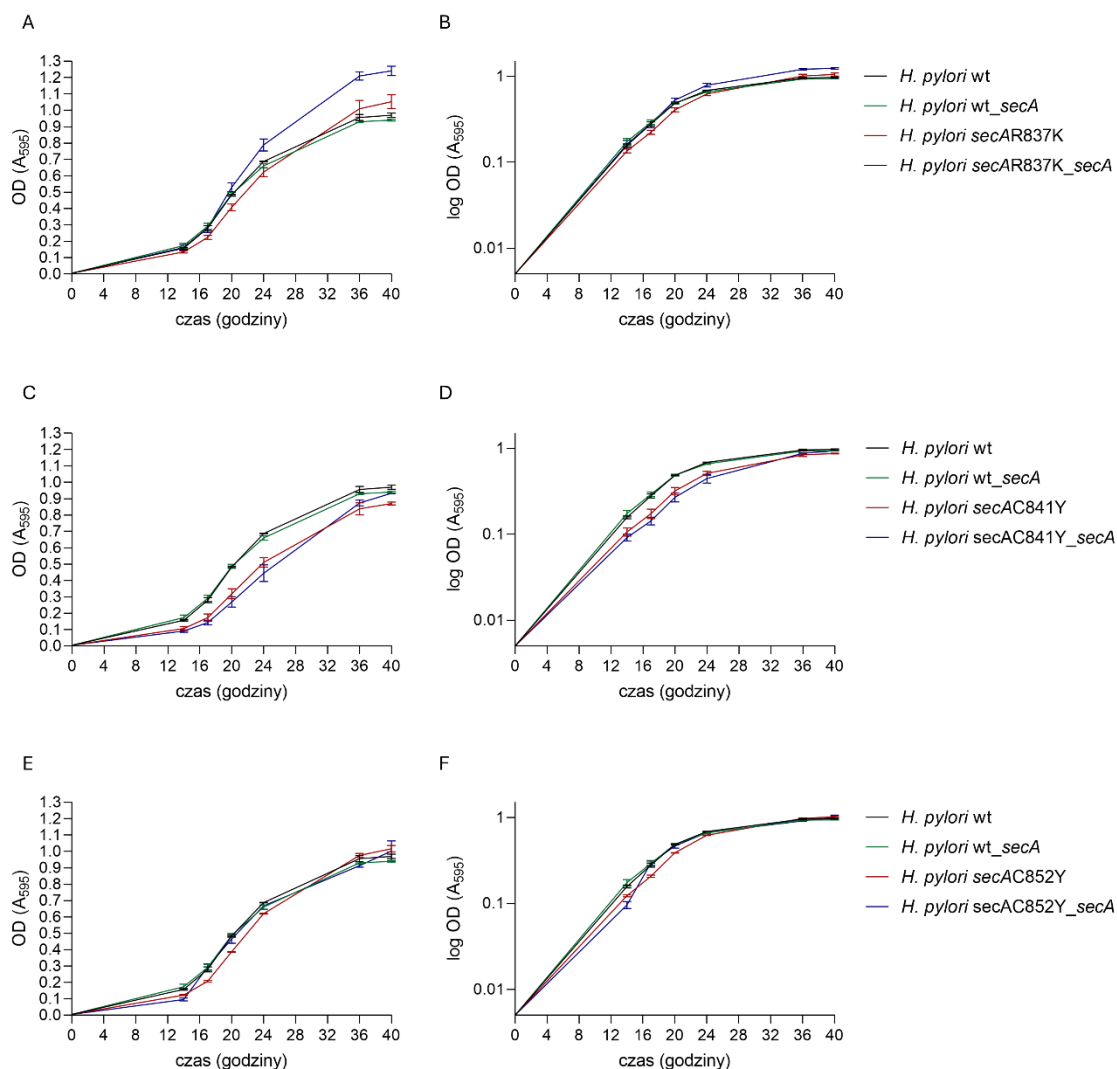
Rycina 28. Analiza poziomu białka SecA w szczepach *H. pylori*. Masa cząsteczkowa białka SecA - 99 kDa. **A.** Reprezentatywny wynik immunoblottingu lizatów komórkowych szczepu typu dzikiego (*H. pylori* N6 wt), oraz szczepów z mutacjami w genach *htrA* i *secA* ($\Delta htrA$ *secAR837K*, $\Delta htrA$ *secAC852Y*, *htrAS221A* *secAC841Y*). **B.** Reprezentatywny wynik immunoblottingu lizatów komórkowych szczepu typu dzikiego (*H. pylori* N6 wt), oraz szczepów z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K*, *secAC852Y*, *secAC841Y*). **C.** Wynik analizy densytometrycznej poziomu białka SecA w szczepach *H. pylori* przedstawiony jako średnie z odchyleniem standardowym z 3 niezależnych powtórzeń. Pozioma linia przerywana wskazuje poziom białka SecA w szczepie typu dzikiego (100%). Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallis, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Analiza poziomu białka SecA w zmutowanych szczepach *H. pylori* nie wykazała istotnych różnic w porównaniu ze szczepem typu dzikiego z wyjątkiem mutacji *secAC852Y*, która prowadziła do obniżenia ilości białka. Choć różnica ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej, zaobserwowano wyraźną tendencję spadkową. W przypadku pozostałych mutacji w rejonie C-końcowym SecA, zarówno w szczepach z mutacjami w *htrA* jak i w szczepach z mutacjami wyłącznie w *secA*, poziom SecA pozostawał porównywalny do kontroli.

7.5.4. Komplementacja *secA* w miejscu plastyczności

Aby uzyskać właściwe szczepy kontrolne do planowanych analiz fenotypowych, podjęto próbę uzyskania szczepów komplementacyjnych z przywróconym genem *secA* typu dzikiego. Ponieważ nie było możliwe wprowadzenie kasety oporności do operonu *secA-lolF*, wprowadzono dodatkowe kopie genu *secA* do chromosomu zmutowanych szczepów *H. pylori* (*secAR837K*, *secAC852Y*, *secAC841Y*) w tzw. miejscu plastyczności, zlokalizowanym pomiędzy genami *hp_0999* i *hp_1000*. Obszar ten stanowi neutralne miejsce insercji, szeroko wykorzystywane w badaniach nad *H. pylori*, ponieważ pozwala na wprowadzenie DNA bez zaburzania funkcjonowania komórki [195]. Konstrukcję do komplementacji uzyskano poprzez amplifikację genu *secA* na matrycy genomowego DNA *H. pylori* N6 z wykorzystaniem starterów 3 i 4 (Materiały 5.1., Tabela 6) a następnie przeprowadzenie reakcji PCR z wydłużaniem nakładających się odcinków (Metody 6.10.) z plazmidem p608 (Materiały 5.3.). Uzyskanym konstruktem, w którym gen *secA* umieszczono na plazmidzie pod kontrolą promotora *ure*, transformowano komórki *H. pylori* wt, *H. pylori secAR837K*, *H. pylori secAC852Y* i *H. pylori secAC841Y* (Metody 6.3.). Poprawność skonstruowanych szczepów potwierdzono poprzez sekwencjonowanie z wykorzystaniem starterów 12-14 (Metody 6.8.). Uzyskano szczepy *H. pylori wt_secA*, *H. pylori secAR837K_secA*, *H. pylori secAC841Y_secA* i *H. pylori secAC852_secA*. Dodatkową kopię genu *secA* wprowadzono również do szczepu typu dzikiego, aby uzyskać szczep kontrolny i ocenić, czy obecność dwóch kopii genu nie wpływa na fizjologię komórki.

W celu oceny wpływu wprowadzonych modyfikacji genetycznych na tempo wzrostu i kondycję komórek bakteryjnych wykonano analizę krzywych wzrostu uzyskanych szczepów *H. pylori* (Metody 6.2.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 29.



Rycina 29. Krzywe wzrostu szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA* i szczepów komplementacyjnych. Tempo wzrostu oceniano spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru gęstości optycznej hodowli przy długości fali 595 nm w funkcji czasu. **A. C. E.** Krzywe wzrostu przedstawione w skali liniowej. **B. D. F.** Krzywe wzrostu przedstawione w skali logarytmicznej. **A. B.** - krzywe wzrostu szczepów *H. pylori* wt, *H. pylori* wt/*secA*, *H. pylori* secAR837K, *H. pylori* secAR837K/*secA*. **C. D.** - krzywe wzrostu szczepów *H. pylori* wt, *H. pylori* wt/*secA*, *H. pylori* secAC841Y, *H. pylori* secAC841Y/*secA*. **E. F.** - krzywe wzrostu szczepów *H. pylori* wt, *H. pylori* wt/*secA*, *H. pylori* secAC852Y, *H. pylori* secAC852Y/*secA*. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z trzech powtórzeń.

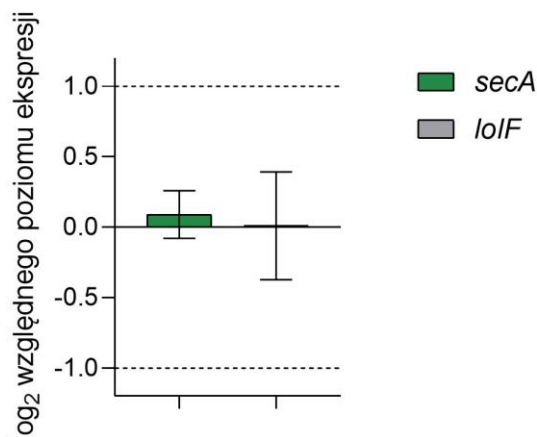
Analiza krzywych wzrostu wykazała, że mutacje punktowe w genie *secA* nie wpływają znacząco na zdolność *H. pylori* do wzrostu. Ponadto, obecność dodatkowej kopii genu *secA* w miejscu plastyczności również nie zmienia tempa wzrostu badanych szczepów.

7.5.5. Analiza poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w zmutowanych szczepach *H. pylori*

Ponieważ we wcześniejszych doświadczeniach wykazano, że delecja fragmentu C-końcowego w genie *secA* i zaburzenie ciągłości operonu *secA-lolF* prowadziła do zmian w ekspresji genu *lolF* (Wyniki 7.5.1.), w dalszej części pracy zbadano poziom ekspresji zarówno genu *secA*, jak i *lolF* w uzyskanych szczepach *H. pylori*. Analiza ta pozwoliła na określenie, czy obecność mutacji punktowych w genie *secA* wpływa na poziom ekspresji genów *secA* i *lolF*, oraz czy wprowadzenie drugiej kopii genu do miejsca plastyczności wpływa na poziom ekspresji tych genów. Analiza została ograniczona do dwóch typów mutacji – powodującej substytucję cysteiny *secAC841Y* oraz obejmującej substytucję innego niż cysteina aminokwasu, *secAR837K*.

Przeprowadzono reakcję qPCR (Metody 6.14.). Jako referencyjne wytypowano geny: dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori* wt_*secA* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori* *secAR837K* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* *secAR837K* i *H. pylori* *secAR837K_secA* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* wt_*secA* i *H. pylori* *secAR837K_secA* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori* *secAR837K_secA* - *adk* i *gyrA*, oraz dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori* *secAC841Y* - *gyrA* i *dnaG*, dla szczepów *H. pylori* *secAC841Y* i *H. pylori* *secAC841Y_secA* - *adk* i *gyrB*, dla szczepów *H. pylori* wt_*secA* i *H. pylori* *secAC852Y_secA* - *dnaG* i *gyrB*, dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori* *secAC841Y_secA* - *gyrA* i *adk*. Wyniki analizy ilościowego PCR przedstawiono w Tabelach 32 i 33 oraz na Rycinach 30 i 31.

W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę dla szczepu kontrolnego, w którym do szczepu typu dzikiego wprowadzono dodatkową kopię genu *secA*, aby ocenić, czy obecność dwóch kopii genu nie wpływa na fizjologię komórki. Wyniki przedstawiono na Rycinie 30 oraz w Tabeli 32.



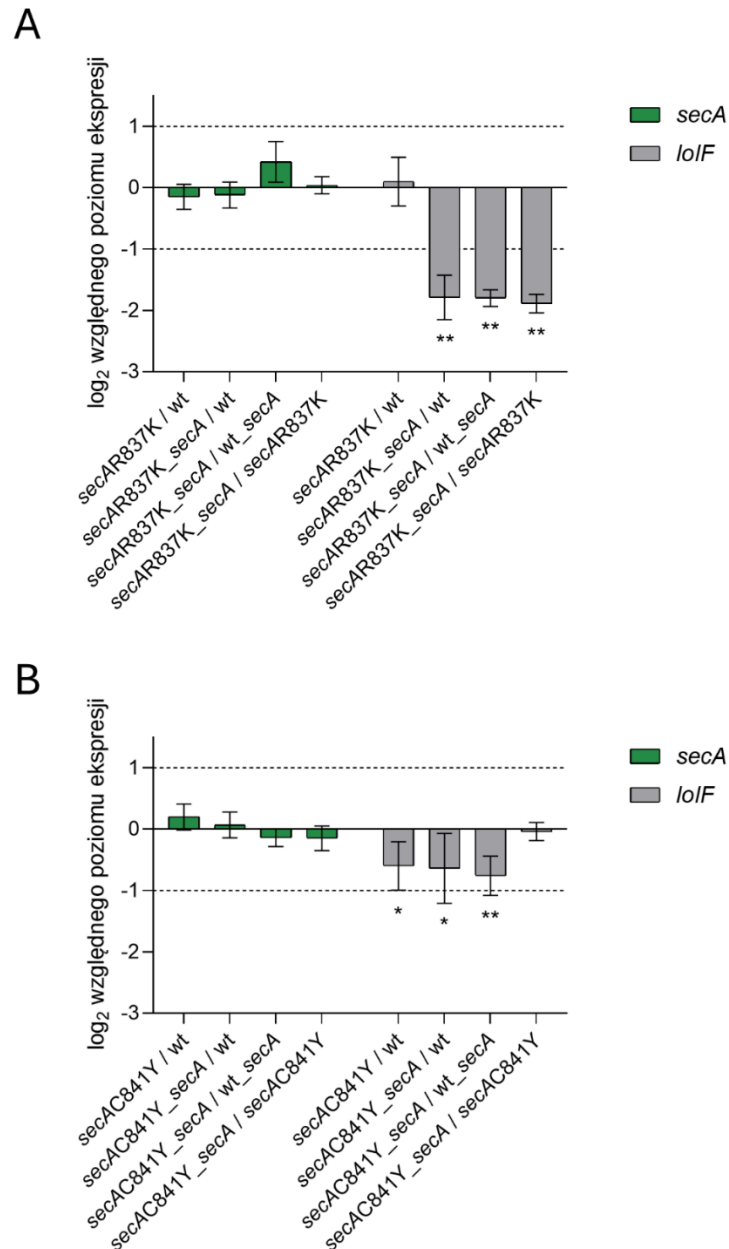
Rycina 30. Analiza poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w szczepie *H. pylori* wt z dodatkową kopią genu *secA*. Względna zmiana poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* wyrażona jako $\log_2$ w szczepie *H. pylori* wt_*secA* w porównaniu do szczepu typu dzikiego *H. pylori* wt, analizowana metodą qPCR. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z pięciu powtórzeń biologicznych. Dane analizowano dla trzech powtórzeń technicznych. Pozioma linia przerywana wskazuje względny dwukrotny wzrost poziomu ekspresji. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabela 32. Poziom ekspresji genów *secA* i *lolF* w szczepie *H. pylori* wt z dodatkową kopią genu *secA*. Względna zmiana poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w szczepie *H. pylori* wt_*secA* w porównaniu do szczepu typu dzikiego *H. pylori* wt, analizowana metodą qPCR. Dane analizowano dla pięciu powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

porównywane szczepy	<i>secA</i>	<i>lolF</i>
<i>H. pylori</i> wt_ <i>secA</i> / <i>H. pylori</i> wt	$1,1 \pm 0,12$	$1,0 \pm 0,26$

Zarówno dla genu *secA*, jak i *lolF* wartości względnego poziomu ekspresji są bardzo bliskie wartości 1,0, co oznacza brak istotnych zmian w poziomie ich ekspresji w badanych warunkach w porównaniu z kontrolą.

Następnie analogiczną analizę przeprowadzono dla pozostałych szczepów zawierających mutacje punktowe w genie *secA* oraz ich odpowiednich wariantów z dodatkową kopią niezmutowanego genu *secA*. Wyniki przedstawiono na Rycinie 31 oraz w Tabeli 33.



Rycina 31. Analiza poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* w zmutowanych szczepach *H. pylori* z dodatkową kopią genu *secA*. Względna zmiana poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* wyrażona jako log₂ analizowana metodą qPCR. **A.** Poziom ekspresji genów *secA* i *lolE* w szczepie: *H. pylori* *secAR837K* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt; *H. pylori* *secAR837K_secA* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt; *H. pylori* *secAR837K_secA* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt_secA oraz *H. pylori* *secAR837K_secA* w porównaniu do szczepu *H. pylori* *secAR837K*. **B.** Poziom ekspresji genów *secA* i *lolE* w szczepie: *H. pylori* *secAC841Y* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt; *H. pylori* *secAC841Y_secA* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt; *H. pylori* *secAC841Y_secA* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt_secA oraz *H. pylori* *secAC841Y_secA* w porównaniu do szczepu *H. pylori* *secAC841Y*. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z pięciu powtórzeń biologicznych. Dane analizowano dla trzech powtórzeń technicznych. Pozioma linia przerywana wskazuje względną dwukrotną zmianę poziomu ekspresji. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Tabela 33. Poziom ekspresji genów *secA* i *lolF* w zmutowanych szczepach *H. pylori* z dodatkową kopią genu *secA*. Względna zmiana poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* analizowana metodą qPCR. Dane analizowano dla pięciu powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

porównywane szczepy	<i>secA</i>	<i>lolF</i>
<i>H. pylori secAR837K</i> / <i>H. pylori wt</i>	0,9 ± 0,12	1,1 ± 0,27
<i>H. pylori secAR837K_secA</i> / <i>H. pylori wt</i>	0,9 ± 0,13	↓ 0,3 ± 0,07**
<i>H. pylori secAR837K_secA</i> / <i>H. pylori wt_secA</i>	1,4 ± 0,3	↓ 0,3 ± 0,03**
<i>H. pylori secAR837K_secA</i> / <i>H. pylori secAR837K</i>	1,0 ± 0,1	↓ 0,3 ± 0,028**
<i>H. pylori secAC841Y</i> / <i>H. pylori wt</i>	1,2 ± 0,16	↓ 0,7 ± 0,18*
<i>H. pylori secAC841Y_secA</i> / <i>H. pylori wt</i>	1,1 ± 0,15	↓ 0,7 ± 0,27*
<i>H. pylori secAC841Y_secA</i> / <i>H. pylori wt_secA</i>	0,9 ± 0,09	↓ 0,6 ± 0,12**
<i>H. pylori secAC841Y_secA</i> / <i>H. pylori secAC841Y</i>	0,9 ± 0,12	1,0 ± 0,1

Wyniki analizy poziomu ekspresji genów *secA* i *lolF* wskazują, że w szczepach z mutacjami punktowymi w *secA* powodującymi substytucje aminokwasowe R837K i C841Y, ich poziom pozostaje zbliżony tego w szczepie typu dzikiego, a uzyskane wartości względnej zmiany poziomu ekspresji nie są wyższe od 2 ani niższe od 0,5, co potwierdza brak istotnych zmian. Ponadto, poziom ekspresji genu *secA* pozostał niezmienny we wszystkich badanych szczepach. Odmienny efekt zaobserwowano dla genu *lolF*: po wprowadzeniu drugiej kopii genu *secA* do genomu zmutowanych szczepów *H. pylori*, poziom ekspresji *lolF* jest obniżony, szczególnie w szczepach z mutacją *secA* R837K. Wyniki te wskazują, że same mutacje w genie *secA* nie wpływają na ekspresję genów *secA* i *lolF*, natomiast obecność dodatkowej kopii genu *secA* prowadzi do zaburzeń w regulacji ekspresji genu *lolF*. W związku z tym, uzyskane szczepy komplementacyjne nie mogą być traktowane jako odpowiednie modele do dalszych analiz, gdyż obecność drugiej kopii genu *secA* zaburza fizjologię komórek.

7.5.6. Sekwencjonowanie genomów szczepów *H. pylori* secAR837K, *H. pylori* secAC841Y i *H. pylori* secAC852Y

W związku z brakiem możliwości uzyskania odpowiednich szczepów komplementacyjnych przeprowadzono sekwencjonowanie całych genomów szczepów z mutacjami punktowymi w genie *secA* (*H. pylori* secAR837K, *H. pylori* secAC841Y i *H. pylori* secAC852Y) oraz szczepu typu dzikiego (*H. pylori* wt) jako szczepu referencyjnego (Metody 6.7.), w celu wykluczenia obecności dodatkowych zmian genetycznych mogących wpływać na obserwowane fenotypy.

Genomowe DNA badanych szczepów zostało poddane sekwencjonowaniu z wykorzystaniem technologii Element Biosciences AVITI (Genomed, Polska). Uzyskane dane zostały poddane wstępnej analizie bioinformatycznej, a następnie sekwencje DNA porównano przy użyciu algorytmu BLAST NCBI (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Analizy BLAST potwierdziły obecność mutacji punktowych w genie *secA* oraz brak mutacji w genie *htrA* i obecność kasety oporności na chloramfenikol w szczepach *H. pylori* secAR837K, *H. pylori* secAC841Y i *H. pylori* secAC852Y. Sekwencjonowanie wykazało także obecność niepożądanych mutacji w innych miejscach genomu. W celu weryfikacji uzyskanych wyników, przeprowadzono amplifikację fragmentów DNA obejmujących zidentyfikowane zmiany w sekwencjach nukleotydowych (Metody 6.9.), a następnie ponownie sekwencjonowano z wykorzystaniem metody Sanger (Eurofins, Luksemburg). Do amplifikacji i sekwencjonowania użyto starterów 37-44 (Materiały 5.1., Tabela 6) Wyniki przedstawiono w Tabeli 34.

Weryfikacja metodą Sanger potwierdziła tylko jedną mutację nonsensowną - w genie *hp_1167* (HofH, 156C>T, Q53STOP) w szczepie *H. pylori* secAR837K. Pozostałe zmiany zidentyfikowane po sekwencjonowaniu AVITI w genach *hp_1369*, *hp_0580*, *hp_0251*, *hp_1329* nie zostały potwierdzone lub były mutacjami synonimicznymi.

Tabela 34. Analiza wyników sekwencjonowania genomów zmutowanych szczepów *H. pylori*.

analiza mutacji po sekwencjonowaniu metodą AVITI					weryfikacja mutacji metodą Sangera
porównywane szczepy	gen	kodowane białko	mutacja nukleotydowa	zmiana aminokwasowa	
<i>H. pylori</i> secAR837K / <i>H. pylori</i> wt	<i>hp_1167</i>	HofH	156C>T	Q53STOP	potwierdzono
	<i>hp_1369</i>	HP1369	1400T>G	N467K	brak mutacji
<i>H. pylori</i> secAC852Y / <i>H. pylori</i> wt	<i>hp_1369</i>	HP1369	1354G>A	D452N	brak mutacji
	<i>hp_0580</i>	HP0580	454T>G	W152G	brak mutacji
<i>H. pylori</i> secAC841Y / <i>H. pylori</i> wt	<i>hp_0251</i>	OppC	342A>C	mutacja synonimiczna P114P	-
	<i>hp_1329</i>	CzcA	2418C>T	mutacja synonimiczna G806G	-

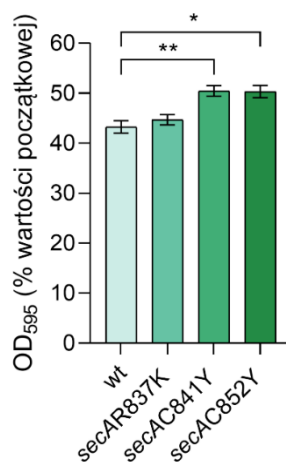
Wyniki sekwencjonowania potwierdziły, że uzyskane szczepy stanowią odpowiednie modele do dalszych analiz wpływu mutacji w rejonie C-końca SecA na fizjologię komórek *H. pylori*.

7.6. Zbadanie wpływu mutacji genu *secA* na fizjologię komórek *H. pylori*

7.6.1. Ocena stopnia autoaglutynacji zmutowanych szczepów *secA* *H. pylori*

Autoaglutynacja stanowi jeden ze wskaźników zmian właściwości powierzchniowych komórek bakteryjnych, mogących wynikać z zaburzeń w profilu białek błonowych związanych z funkcjonowaniem układów sekrecyjnych. Zjawisko to polega na tworzeniu się skupisk bakteryjnych osadzających się na dnie probówek hodowlanych i zmniejszeniu zmętnienia w górnej warstwie zawiesiny.

W celu określenia, czy mutacje w rejonie C-końcowym SecA wpływają na zdolność komórek *H. pylori* do autoaglutynacji, przeprowadzono analizę porównawczą zmutowanych szczepów oraz szczepu typu dzikiego (Metody 6.31.2.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 32.



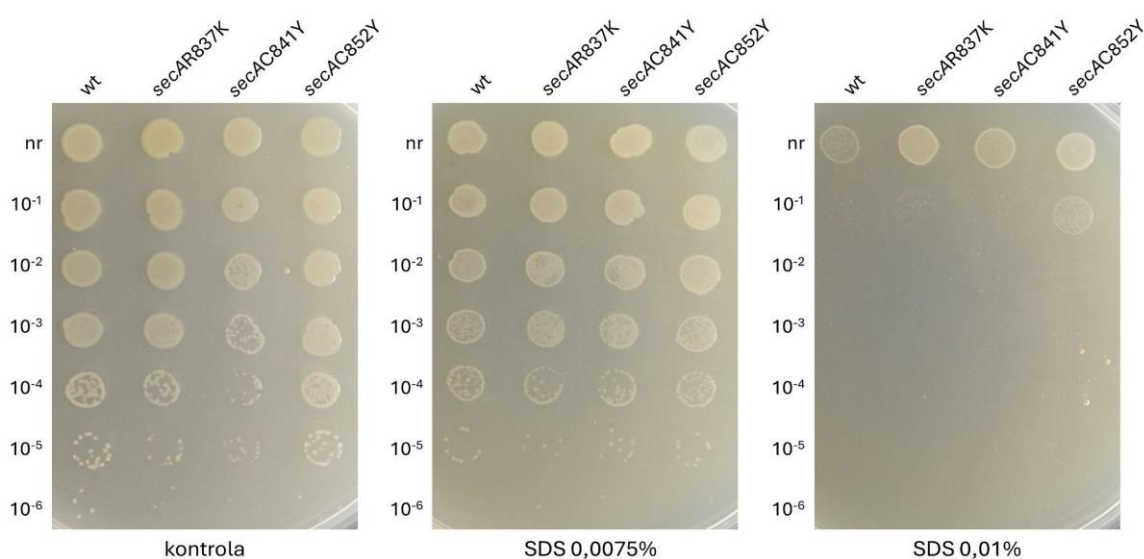
Rycina 32. Ocena stopnia autoaglutynacji szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA*. Wartości przedstawiono jako OD₅₉₅ po 24 godzinach inkubacji, wyrażone w procentach względem początkowej wartości OD₅₉₅. Analizowano szczepy *H. pylori* wt, *H. pylori* secAR837K, *H. pylori* secAC852Y oraz *H. pylori* secAC841Y. Wynik analizy przedstawiono jako średnie z odchyleniem standardowym z 5 niezależnych powtórzeń. Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że szczep *H. pylori* secAR837K charakteryzuje się autoaglutynacją o stopniu porównywalnym do tej u typu dzikiego. Natomiast w przypadku mutantów *H. pylori* secAC841Y i secAC852Y wartości OD₅₉₅ były istotnie wyższe, co wskazuje na ich mniejszą zdolność do autoaglutynacji. Wyniki te sugerują, że mutacje skutkujące substytucją cysteiny w C-końcowym regionie białka SecA mogą osłabiać zdolność komórek *H. pylori* do tworzenia skupisk bakterii.

7.6.2. Ocena wrażliwości szczepów *H. pylori* na niskie stężenia dodecylosiarczanu sodu (SDS) – test przeżywalności na podłożu stałym

W celu określenia, czy badane przeze mnie mutacje punktowe w genie *secA* wpływają na integralność błony zewnętrznej, oceniono przeżywalność zmutowanych szczepów *H. pylori* na podłożu stałym zawierającym dodecylosiarczan sodu (SDS). SDS jest anionowym detergentem, który zaburza strukturę błon, prowadząc do obniżonej żywotności komórek w przypadku naruszenia ich bariery ochronnej.

Analizowano wzrost komórek hodowanych w optymalnych warunkach, a następnie wysiewanych na podłoże z dodatkiem detergentu (Metody 6.31.3.). Wyniki przedstawiono na Rycinie 33.



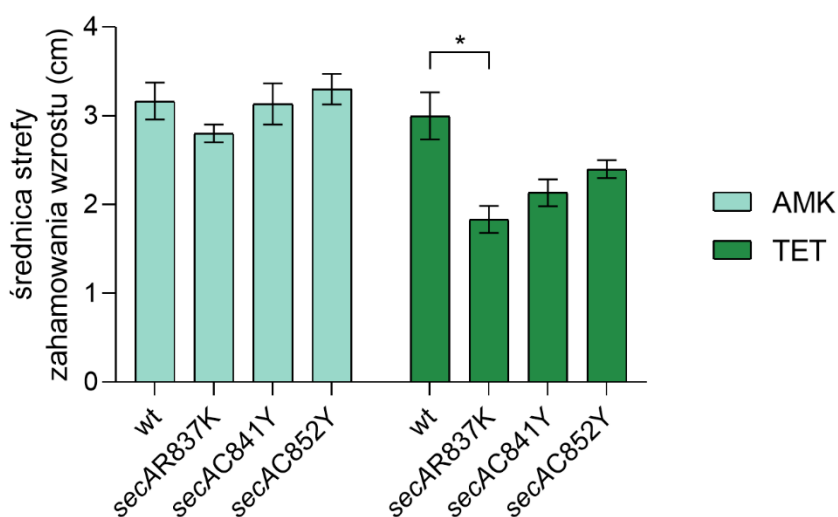
Rycina 33. Ocena przeżywalności szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA* w obecności SDS. Wpływ siarczanu dodecyłu sodu (SDS) na zdolność do tworzenia jednostek koloniotwórczych (CFU, ang. *colony forming units*). Przedstawiono zdjęcia reprezentatywnego wzrostu szczepów typu dzikiego (wt) oraz mutantów (*secAR837K*, *secAC841Y*, *secAC852Y*) na podłożu stałym bez detergentu (kontrola) oraz z dodatkiem SDS (stężenia końcowe: 0,0075% i 0,01%).

W obecności SDS o stężeniu 0,0075% wzrost wszystkich analizowanych szczepów był porównywalny z kontrolą, bez zauważalnych różnic w liczbie kolonii w całej serii rozcieńczeń. Natomiast w obecności SDS o stężeniu 0,01% obserwuje się wyraźne ograniczenie przeżywalności u wszystkich badanych szczepów, jednakże szczep typu dzikiego charakteryzował się najsłabszym wzrostem (Rycina 33). W związku z tym, można wnioskować, że mutacje punktowe w *secA* nie zmieniają znacząco wrażliwości

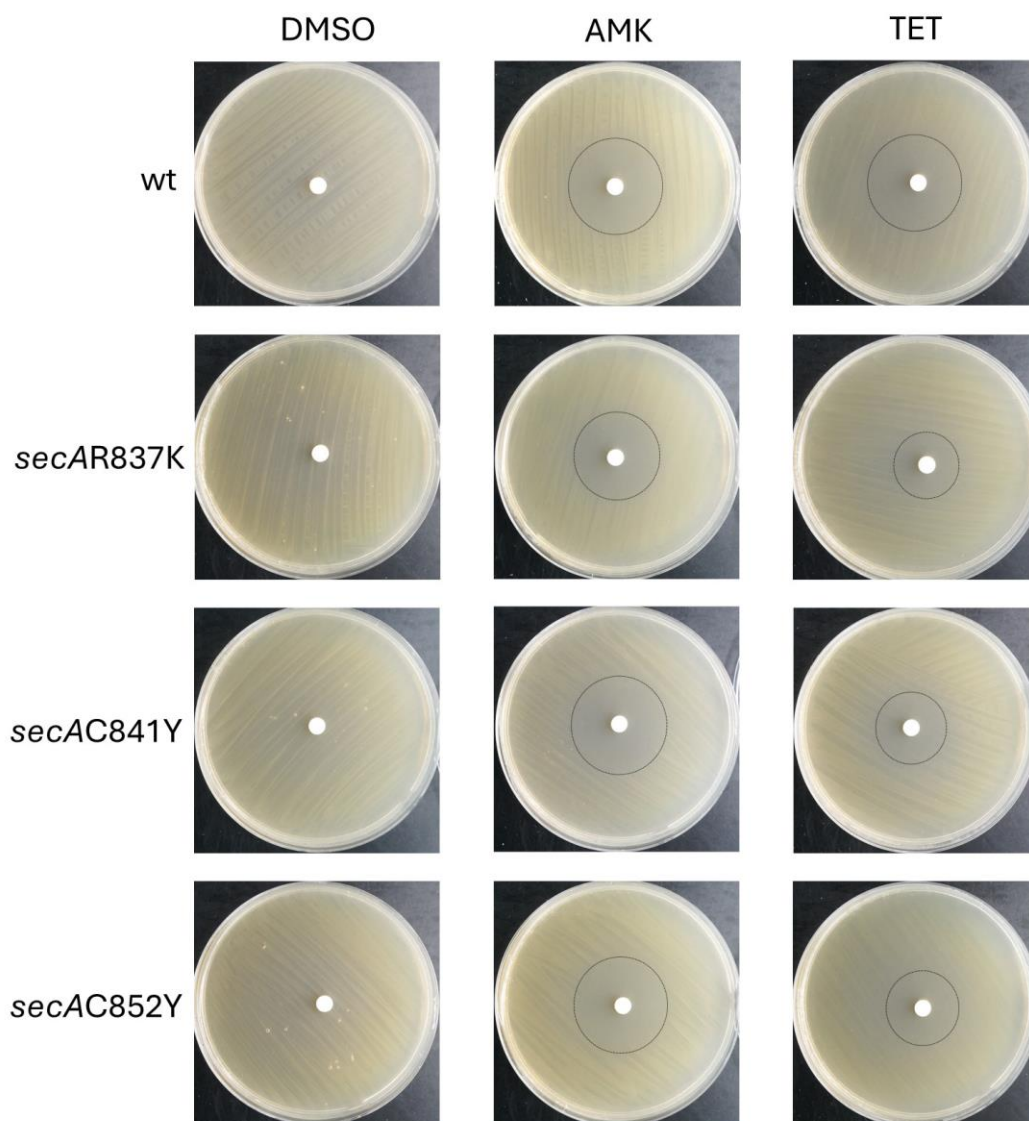
H. pylori na SDS w testowanym zakresie stężeń i wszystkie badane szczepy zachowały zdolność do tworzenia kolonii w obecności niskich stężeń SDS. Co więcej, wydaje się, że mutanty charakteryzowały się nawet nieznacznie niższą wrażliwością na działanie tego detergentu.

7.6.3. Ocena wrażliwości zmutowanych szczepów *H. pylori* na tetracyklinę i amoksycylinę metodą dyskowo-dyfuzyjną

Test dyskowo - dyfuzyjny jest powszechnie stosowaną metodą oceny wrażliwości bakterii na antybiotyki. W celu sprawdzenia czy mutacje w genie *secA* wpływają na antybiotykooporność *H. pylori*, przeprowadzono analizę z wykorzystaniem dysków nasączonych amoksycyliną oraz tetracykliną, a po inkubacji mierzono średnicę stref zahamowania wzrostu bakterii (Metody 6.21.1.). Wyniki przedstawiono na Rycinach 34 i 35.



Rycina 34. Ocena wrażliwości szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA* na amoksycylinę i tetracyklinę metodą dyskowo - dyfuzyjną. Przedstawiono średnice stref zahamowania wzrostu (cm) dla szczepu typu dzikiego (wt) oraz szczepów z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K*, *secAC841Y*, *secAC852Y*). AMK - amoksycylina, TET - tetracyklina. Wynik analizy przedstawiono jako średnie z odchyleniem standardowym z 3 niezależnych powtórzeń. Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

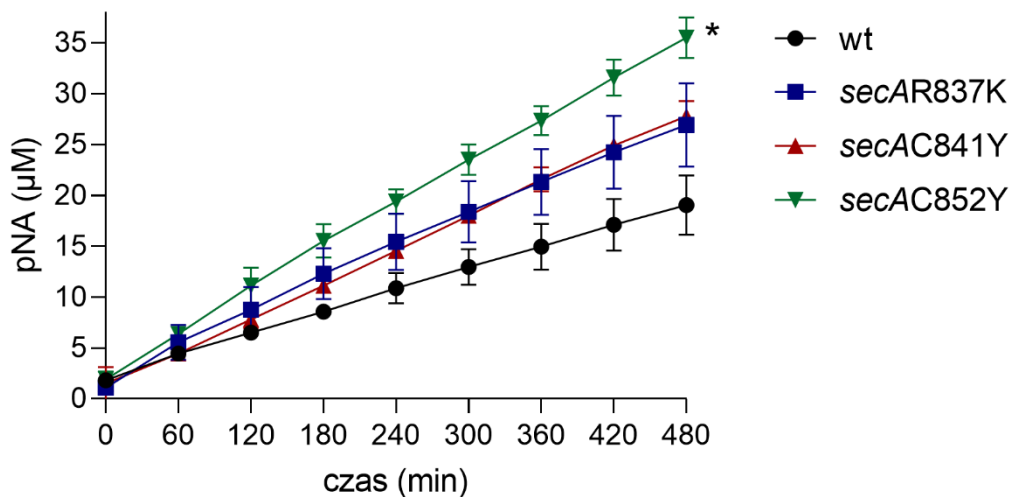


Rycina 35. Reprezentatywne wyniki oceny wrażliwości szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA* na amoksycylinę i tetracyklinę metodą dyskowo-dyfuzyjną. Przedstawiono strefy zahamowania wzrostu dla szczepu typu dzikiego (wt) oraz szczepów z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K*, *secAC841Y*, *secAC852Y*). Strefy zahamowania wzrostu wokół dysków z antybiotykami zostały zaznaczone przerywaną linią. AMK - amoksycylina, TET - tetracyklina. Dyski nasączone DMSO służyły jako kontrola negatywna.

Przeprowadzone testy dyskowo - dyfuzyjne wykazały, że w przypadku amoksycyliny wszystkie analizowane szczepy *H. pylori* wykazywały porównywalną wrażliwość. Odmienne wyniki uzyskano dla tetracykliny - wszystkie analizowane szczepy z mutacjami w *secA* charakteryzowały się mniejszymi strefami zahamowania wzrostu w porównaniu ze szczepem typu dzikiego, przy czym istotność statystyczną potwierdzono jedynie dla szczepu z mutacją *secAR837K*, co wskazuje na obniżoną wrażliwość na ten antybiotyk.

7.6.4. Oznaczanie wydajności sekrecji γ -glutamylotransferazy (gGT) w zmutowanych szczepach *H. pylori*

γ -Glutamylotransferaza (gGT) jest enzymem transportowanym przez system SEC, a jego aktywacja zachodzi dopiero po transporcie przez błonę cytoplazmatyczną. Enzym ten syntetyzowany jest w postaci proenzymu, który w peryplazmie ulega autokatalitycznemu cięciu na dwa fragmenty o masie około 40 i 20 kDa, warunkującemu powstanie formy aktywnej [196]. W związku z tym, poziom aktywności gGT może stanowić wskaźnik efektywności translokacji białek zależnych od SecA. W celu określenia, czy mutacje punktowe w genie *secA* bakterii *H. pylori* wpływają na proces translokacji, oznaczono aktywność gGT w zmutowanych szczepach (Metody 6.31.4.). Jako kontrolę negatywną zastosowano supernatanty uzyskane ze szczepu *H. pylori* z delecją genu *ggt* (Materiały 5.2.). Zebrane dane posłużyły do wyznaczenia krzywych regresji zależności stężenia p-nitroaniliny (μM) od czasu (minuty), na podstawie których obliczano szybkość reakcji jako nachylenie prostej regresji liniowej (v). Wyniki przedstawiono na Rycinie 36 i w Tabeli 35.



Rycina 36. Aktywność γ -glutamylotransferazy (gGT) w supernatantach hodowli szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA*. Analizowano aktywność gGT w szczepie typu dzikiego (wt) oraz szczepów z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K*, *secAC841Y*, *secAC852Y*). Aktywność enzymu monitorowano w czasie, oznaczając stężenie produktu reakcji – p-nitroaniliny (pNA, μM). Wynik analizy przedstawiono jako średnie z odchyleniem standardowym z 3 niezależnych powtórzeń. Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabela 35. Aktywność γ -glutamylotransferazy (gGT) w supernatantach hodowli szczepów *H. pylori* - wartości szybkości reakcji. Wartości nachylenia prostych regresji liniowej zależności stężenia p-nitroaniliny (μM) od czasu (minuty), na podstawie których obliczano szybkość reakcji (v). Wynik analizy przedstawiono jako średnie z odchyleniem standardowym z 3 niezależnych powtórzeń. Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

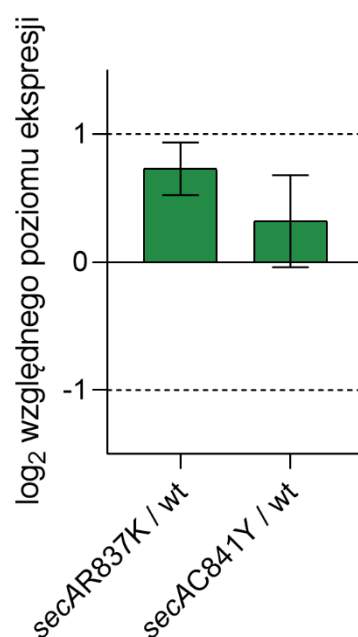
szczep <i>H. pylori</i>	wartości v ($\mu\text{M}/\text{min}$)
wt	$0,036 \pm 0,007$
<i>secAR837K</i>	$0,052 \pm 0,009$
<i>secAC841Y</i>	$0,056 \pm 0,006$
<i>secAC852Y</i>	$0,070 \pm 0,006^*$

We wszystkich analizowanych szczepach z mutacjami w genie *secA* aktywność wydzielonej poza komórkę γ -glutamylotransferazy była nieco wyższa niż w szczepie typu dzikiego. Najwyższy poziom aktywności zaobserwowano dla mutacji skutkującej substitucją aminokwasową C852Y, podczas gdy warianty R837K i C841Y prowadziły jedynie do nieznacznego, nieistotnego statystycznie wzrostu w stosunku do szczepu typu dzikiego.

7.6.5. Analiza poziomu ekspresji genu *ggt* oraz ilości białka gGT w zmutowanych szczepach *H. pylori*

W celu określenia, czy obserwowane różnice w aktywności γ -glutamylotranspeptydazy (gGT) wynikają z podwyższonej translokacji, a nie ze zmian w poziomie ekspresji genu *ggt* lub ilości białka gGT w badanych szczepach, przeprowadzono ilościową reakcję PCR (Metody 6.14.) oraz analizę metodą immunoblottingu (Metody 6.21.) z wykorzystaniem przeciwciał anty-gGT (Materiały 5.9.). Analiza qPCR została ograniczona do dwóch typów mutacji – powodującej substitucję cysteiny *secAC841Y* oraz obejmującej substitucję innego niż cysteina aminokwasu, *secAR837K*. Jako referencyjne wytypowano geny: dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori secAR837K* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori secAC841Y* - *gyrA* i *dnaG*. Wyniki analizy qPCR przedstawiono na Rycinie 37 i w Tabeli 36. Wyniki

analizy metodą immunoblottingu przedstawiono na Rycinie 38. Na żele nanoszono równe ilości białek, co zweryfikowano elektroforetycznie oraz densytometrycznie.



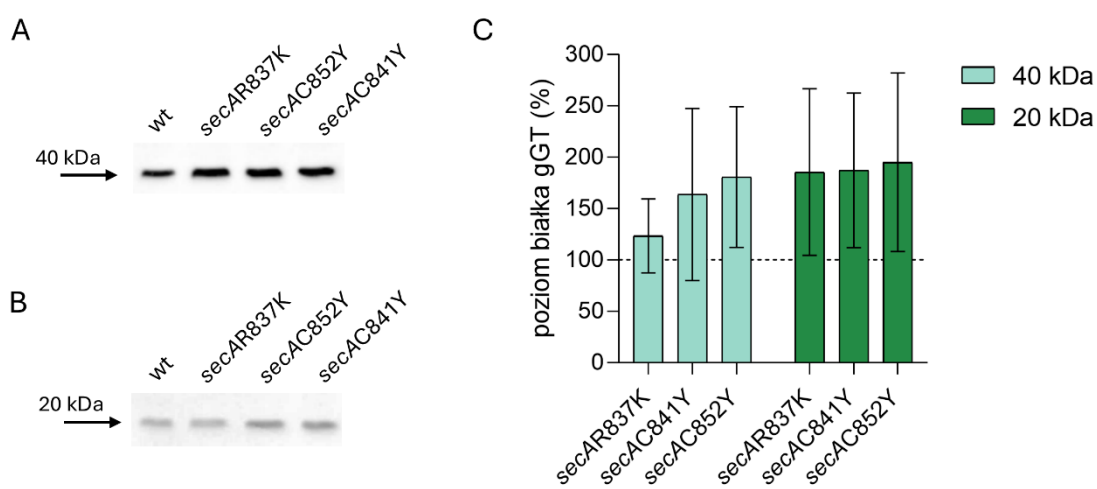
Rycina 37. Analiza poziomu ekspresji genu *ggt* w zmutowanych szczepach *H. pylori*. Względna zmiana poziomu ekspresji genu *ggt* wyrażona jako log₂ analizowana metodą qPCR w szczepach *H. pylori* secAR837K i *H. pylori* secAC841Y w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z pięciu powtórzeń biologicznych. Dane analizowano dla trzech powtórzeń technicznych. Pozioma linia przerywana wskazuje względny dwukrotny wzrost poziomu ekspresji. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Tabela 36. Poziom ekspresji genu *ggt* w zmutowanych szczepach *H. pylori*. Względna zmiana poziomu ekspresji genu *ggt* analizowana metodą qPCR. Dane analizowano dla pięciu powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

porównywane szczepy	<i>ggt</i>
<i>H. pylori</i> secAR837K / <i>H. pylori</i> wt	1,7 ± 0,25
<i>H. pylori</i> secAC841Y / <i>H. pylori</i> wt	1,3 ± 0,34

Uzyskane wyniki wykazały nieznaczne podwyższenie poziomu mRNA *ggt* w zmutowanych szczepach, jednakże wartości te nie były istotne statystycznie. W związku z tym nie można było jednoznacznie przypisać wzrostu aktywności gGT

w *H. pylori* R837K i *H. pylori* C841Y zwiększonej ekspresji genu *ggt*. Z tego względu określono zawartość białka gGT w komórkach bakterii (Rycina 38). Zaobserwowano wzrost poziomu podjednostek dojrzałych form białka w komórkach mutantów, ale i w tym przypadku wyniki nie były powtarzalne, a analiza statystyczna nie potwierdziła istotności różnic. Podsumowując, uzyskane wyniki dowodzą, że mutacje w rejonie C-końca SecA nie powodują obniżenia translokacji gGT; co więcej możliwa jest wzmożona efektywność eksportu tego białka.

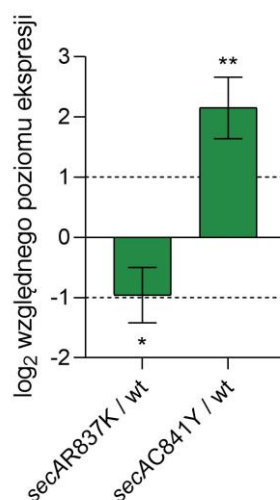


Rycina 38. Analiza poziomu białka gGT w szczepach *H. pylori*. Masa cząsteczkowa podjednostek białka gGT ~ 40 kDa i 20 kDa. Reprezentatywne wyniki immunoblotingu lizatów komórkowych szczepu typu dzikiego (*H. pylori* N6 wt), oraz szczepów z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K*, *secAC852Y*, *secAC841Y*): **A.** dla podjednostki ~ 40 kDa; **B.** dla podjednostki ~ 20 kDa. **C.** Wynik analizy densytometrycznej poziomu białka gGT w szczepach *H. pylori* przedstawiony jako średnie z odchyleniem standardowym z 3 niezależnych powtórzeń. Pozioma linia przerywana wskazuje poziom białka gGT w szczepie typu dzikiego (100%). Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7.6.6. Analiza poziomu ekspresji genu *cagA* oraz ilości białka CagA w zmutowanych szczepach *H. pylori*

W celu oceny, czy mutacje w genie *secA* wpływają na wytwarzanie przez komórki jednego z głównych czynników wirulencji *H. pylori*, onkoproteiny CagA, zbadano poziom ekspresji genu *cagA* oraz poziom białka CagA w zmutowanych szczepach *H. pylori* (Metody 6.14.; 6.21.). Analiza qPCR została ograniczona do dwóch typów mutacji – powodującej substytucję cysteiny *secAC841Y* oraz obejmującej substytucję innego niż cysteina aminokwasu, *secAR837K*. Jako referencyjne wytypowano geny: dla szczepów *H. pylori* wt i *H. pylori* *secAR837K* - *adk* i *gyrA*, dla szczepów *H. pylori* wt

i *H. pylori secAC841Y* - *gyrA* i *dnaG*. Wyniki analizy qPCR przedstawiono na Rycinie 39 i w Tabeli 37. Wyniki analizy metodą immunoblottingu przedstawiono na Rycinie 40. Na żele nanoszono równe ilości białek, co zweryfikowano elektroforetycznie oraz densytometrycznie.



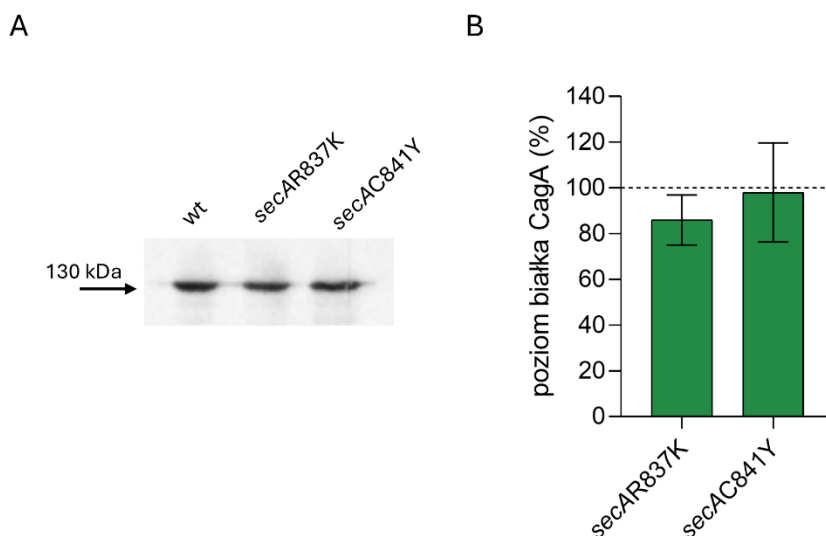
Rycina 39. Analiza poziomu ekspresji genu *cagA* w zmutowanych szczepach *H. pylori*. Względna zmiana poziomu ekspresji genu *cagA* wyrażona jako log₂ analizowana metodą qPCR w szczepach *H. pylori secAR837K* i *H. pylori secAC841Y* w porównaniu do szczepu *H. pylori* wt. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z pięciu powtórzeń biologicznych. Dane analizowano dla trzech powtórzeń technicznych. Pozioma linia przerywana wskazuje względny dwukrotny wzrost poziomu ekspresji. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Tabela 37. Poziom ekspresji genu *cagA* w zmutowanych szczepach *H. pylori*. Względna zmiana poziomu ekspresji genu *cagA* analizowana metodą qPCR. Dane analizowano dla pięciu powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

porównywane szczepy	<i>cagA</i>
<i>H. pylori secAR837K</i> / <i>H. pylori</i> wt	↓ 0,5 ± 0,18*
<i>H. pylori secAC841Y</i> / <i>H. pylori</i> wt	↑ 4,7 ± 1,5**

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że poziom ekspresji genu *cagA* w szczepie *H. pylori* z mutacją w genie *secA* powodującą substytucję aminokwasową R837K, powoduje jedynie umiarkowane obniżenie poziomu transkryptu w porównaniu do szczepu typu dzikiego, co mimo istotności statystycznej można uznać

za zmianę o ograniczonym znaczeniu biologicznym. Natomiast mutacja powodująca substytucję aminokwasową SecAC841Y skutkowała wyraźnym, ponad czterokrotnym wzrostem ekspresji *cagA*.



Rycina 40. Analiza poziomu białka CagA w szczepach *H. pylori*. Masa cząsteczkowa białka CagA – 130 kDa. **A.** Reprezentatywne wyniki immunoblottingu lizatów komórkowych szczepu typu dzikiego (*H. pylori* N6 wt), oraz szczepów z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K*, *secAC852Y*, *secAC841Y*). **B.** Wynik analizy densytometrycznej poziomu białka CagA w szczepach *H. pylori* przedstawiony jako średnie z odchyleniem standardowym z 3 niezależnych powtórzeń. Pozioma linia przerywana wskazuje poziom białka CagA w szczepie typu dzikiego (100%). Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

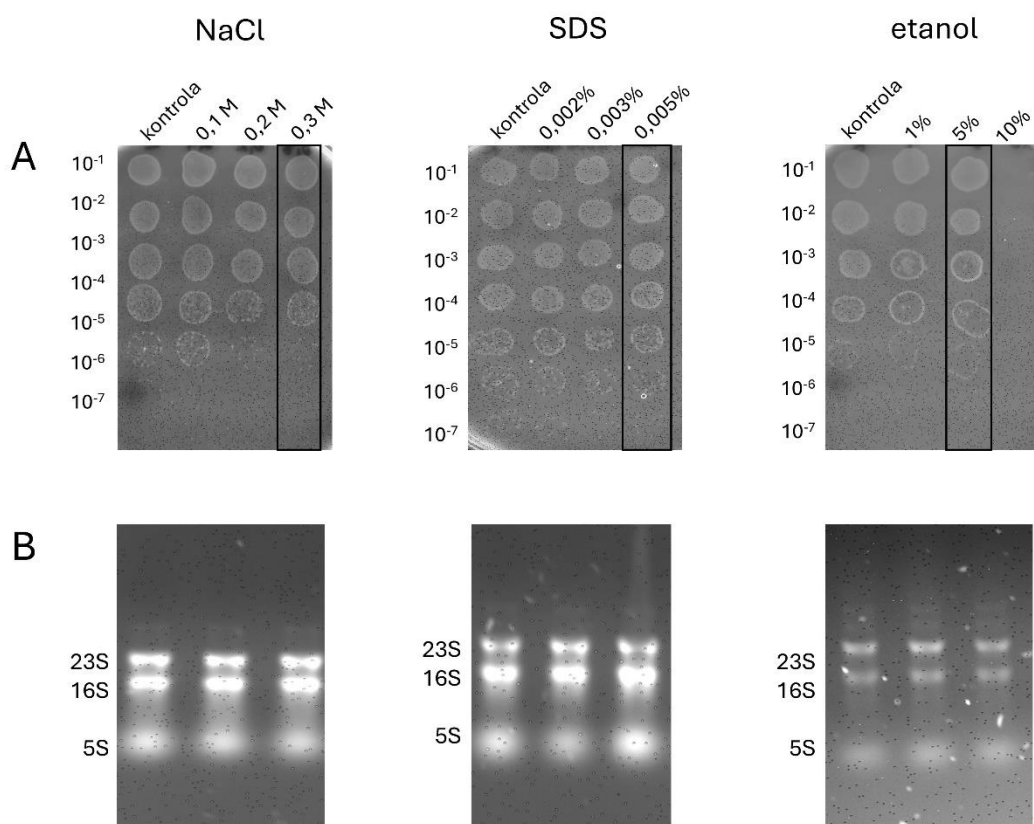
Analiza poziomu białka CagA w szczepach *H. pylori* z mutacjami w genie *secA* (*secAR837K* i *secAC841Y*) nie wykazała różnic w porównaniu ze szczepem typu dzikiego.

7.7. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC u *H. pylori* w odpowiedzi na warunki stresowe

Utrzymanie homeostazy w przestrzeni pozacytoplazmatycznej jest istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej, a jej zaburzenia mogą wpływać na proces sekrecji białek z cytoplazmy. Zakłada się, że w warunkach zaburzających pozacytoplazmatyczną homeostazę regulacji może podlegać ekspresja genów kodujących elementy translokonu SEC. Celem przedstawionych doświadczeń było zbadanie poziomu transkrypcji genów kodujących białka wchodzące w skład translokonu SEC w komórkach *H. pylori* narażonych na czynniki zaburzające homeostazę peryplazmatyczną i błonową.

7.7.1. Optymalizacja warunków do badania ekspresji genów *H. pylori* w odpowiedzi na stres

W pierwszym etapie przeprowadzono optymalizację hodowli bakterii w warunkach stresowych, badając przeżywalność komórek *H. pylori* w obecności różnych stężeń czynników stresogennych (NaCl, SDS i etanol) (Metody 6.32.). Na tej podstawie wybrano stężenia związków, które ograniczały wzrost bakterii, ale jednocześnie nie powodowały całkowitej utraty żywotności (NaCl – 0,3 M, SDS – 0,003%, etanol – 5%) (Rycina 41, A). Następnie, wyizolowano RNA z komórek poddanych stresowi i oceniano jego integralność, aby upewnić się, że materiał nie uległ degradacji pod wpływem zastosowanych czynników stresowych (Metody 6.14.1.) (Rycina 41, B). Wyniki przedstawiono na Rycinie 41.

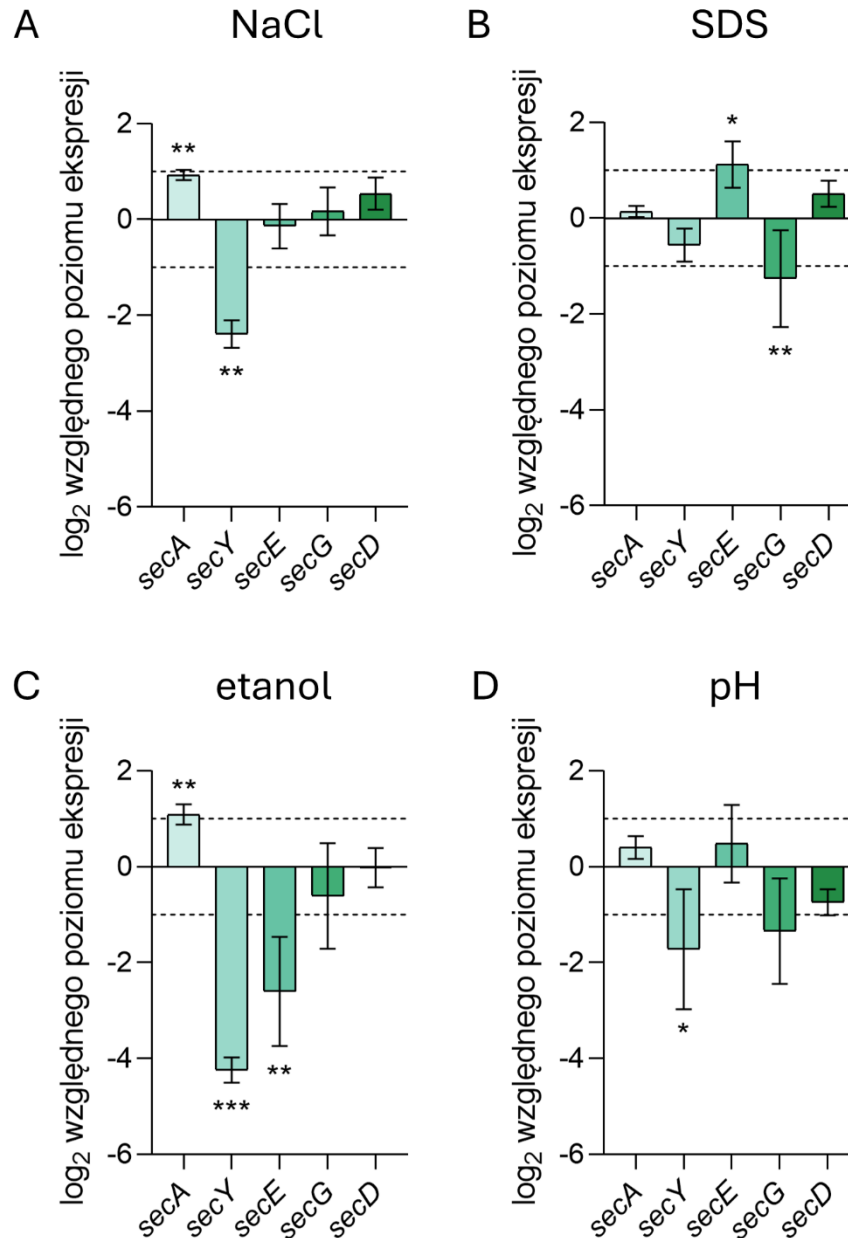


Rycina 41. Optymalizacja warunków do badania ekspresji genów *H. pylori* w odpowiedzi na stres. **A.** Reprezentatywne wyniki analizy przeżywalności komórek *H. pylori* w obecności różnych stężeń NaCl, SDS i etanolu. Wybrane do dalszych analiz stężenia zaznaczono ramkami. **B.** Ocena integralności RNA wyizolowanego z hodowli poddanych działaniu czynników stresowych (NaCl – 0,3 M, SDS – 0,003%, etanol – 5%). Trzy ścieżki odpowiadają trzem powtórzeniom biologicznym.

Ocena integralności RNA potwierdziła, że izolaty nie uległy degradacji pod wpływem czynników stresowych (widoczne wyraźne prążki odpowiadające 23S, 16S i 5S rRNA).

7.7.2. Analiza poziomu ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC w odpowiedzi na stres

W drugim etapie, w bakteriach traktowanych wybranymi stężeniami czynników stresogennych zbadano poziom ekspresji genów kodujących elementy translokonu SEC. Ponadto, zbadano poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC w odpowiedzi na niskie pH (Metody 6.14.). Niektóre geny kodujące komponenty translokonu SEC znajdują się w tym samym operonie (*secD*, *secF* i *yajC*), dlatego do analizy wybrano jeden gen z tej jednostki transkrypcyjnej. Wybrane do analizy geny to: *secA*, *secY*, *secE*, *secG*, *secD*. Do analizy ekspresji tych genów w komórkach *H. pylori* traktowanych poszczególnymi czynnikami stresogennymi wytypowano osobne zestawy genów referencyjnych: dla NaCl - *ftsZ* i *dnaG*, dla SDS - *ftsZ* i *dnaG*, dla etanolu - *dnaG* - *gyrB*, dla stresu pH - *adk* i *gyrB*. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 42 oraz w Tabeli 38.



Rycina 42. Zmiany w ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC (*secA*, *secY*, *secE*, *secG*, *secD*) bakterii *H. pylori* w odpowiedzi na stres. Względna zmiana poziomu ekspresji genów wyrażona jako log₂ analizowana metodą qPCR w szczepie *H. pylori* wt. **A.** Zmiana ekspresji genów w obecności NaCl. **B.** Zmiana ekspresji genów w obecności SDS. **C.** Zmiana ekspresji genów w obecności etanolu. **D.** Zmiana ekspresji genów w kwaśnym pH (5,0). Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe ze średniej z co najmniej trzech powtórzeń biologicznych. Dane analizowano dla trzech powtórzeń technicznych. Pozioma linia przerywana wskazuje względny dwukrotny wzrost poziomu ekspresji. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001.

Tabela 38. Poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC (*secA*, *secY*, *secE*, *secG*, *secD*) bakterii *H. pylori* w odpowiedzi na stres. Względna zmiana poziomu ekspresji genów analizowana metodą qPCR w szczepie *H. pylori* wt w warunkach stresowych (NaCl, SDS, etanol, kwaśne pH). Dane analizowano dla co najmniej trzech powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analizę statystyczną przeprowadzano przy użyciu oprogramowania REST2009, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

gen	czynnik stresowy			
	NaCl	SDS	etanol	pH 5,0
<i>secA</i>	↑ 1,9 ± 0,15**	1,1 ± 0,09	↑ 2,1 ± 0,33**	1,3 ± 0,23
<i>secY</i>	↓ 0,2 ± 0,04**	0,69 ± 0,16	↓ 0,1 ± 0,01***	↓ 0,4 ± 0,33*
<i>secE</i>	0,9 ± 0,28	↑ 2,3 ± 0,69*	↓ 0,2 ± 0,16**	1,6 ± 0,88
<i>secG</i>	1,2 ± 0,39	↓ 0,5 ± 0,24**	0,8 ± 0,72	1,23 ± 1,51
<i>secD</i>	1,5 ± 0,34	1,4 ± 0,29	1,0 ± 0,28	0,6 ± 0,1

Analiza zmian w poziomie ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC wykazała, że odpowiedź bakterii *H. pylori* była zróżnicowana w zależności od zastosowanego czynnika stresogennego. W obecności NaCl doszło do represji genu *secY* i wzrostu ekspresji *secA*. W warunkach stresu wywołanego SDS zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genu *secE* oraz obniżenie poziomu ekspresji *secG*, w przypadku pozostałych genów nie zaobserwowano zmian. Najbardziej na poziom ekspresji badanych genów wpływał etanol – prowadził wzrostu poziomu ekspresji genu *secA*, jednocześnie obniżając poziom ekspresji genów *secY* i *secE*. W warunkach kwaśnego pH również odnotowano zmiany - ekspresja genu *secY* uległa biologicznie istotnemu obniżeniu. Wyniki te wskazują, że gen *secY* jest najbardziej podatny na represję w odpowiedzi na stres osmotyczny i alkoholowy, oraz stres spowodowany obniżeniem pH. Natomiast poziom ekspresji genu *secE* w zależności od zastosowanego czynnika stresowego - zwiększa się w obecności SDS i obniża w obecności etanolu. W obecności SDS obniża się także poziom ekspresji genu *secG*. Zmiany w poziomie ekspresji dotyczyły więc głównie genów *secY*, *secE* i *secG*, które kodują białka tworzące kanał translokonu SecYEG w błonie cytoplazmatycznej.

8. Dyskusja

Zachowanie proteostazy w peryplazmie i błonach komórkowych jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej. Utrzymanie tego stanu równowagi zależy zarówno od zdolności komórki do przeciwdziałania negatywnym skutkom niekorzystnych czynników środowiskowych, jak i od właściwego funkcjonowania szlaków metabolicznych, w tym syntezy, eksportu i dojrzewania pozacytoplazmatycznych białek. Zaburzenie homeostazy w obszarach pozacytoplazmatycznych wpływa na funkcjonowanie systemów cytoplazmatycznych i w konsekwencji uruchamia szereg procesów obronnych.

W przypadku bakterii *H. pylori* niewiele jest wiadomo na temat mechanizmów odpowiedzi na stres oddziałujący na błony komórkowe i peryplazmę. Niniejsza praca jest próbą uzupełnienia wiedzy w tym zakresie. Badania uprzednio prowadzone w Katedrze Biochemii Ogólnej o Medycnej UG wskazują, że brak proteazy/białka opiekuńczego HtrA zaburza homeostazę powłok komórkowych bakterii [197]. U *H. pylori* przejawia się to między innymi zmienionym profilem białkowym błon komórkowych, ale także zmianą poziomu wielu białek metabolizmu podstawowego bakterii [197]. Należy mieć jednak na względzie fakt, iż wprowadzenie mutacji do genu *htrA* udało się tylko w przypadku jednego szczepu - *H. pylori* N6. Co więcej, w genomach zmutowanych szczepów *H. pylori* N6 $\Delta htrA$ i *htrAS221A* zaobserwowano dodatkowe mutacje, występujące w genie *secA*, w rejonie kodującym domenę C-kończową tego białka (MBD) (substytucje C843X, P858L, R837K, C841Y, C852Y) [180]. Nasunęło to przypuszczenie, iż zmutowane białko SecA umożliwia przeżycie komórkom pozbawionym aktywnego HtrA, być może poprzez zmienioną aktywność translokacyjną.

Białko SecA jest kluczowym elementem systemu sekrecyjnego SEC, odpowiedzialnym za rekrutację i dostarczanie substratów białkowych do kanału translokacyjnego i równocześnie zapewniającym energię do transportu polipeptydu [46]. Funkcjonalne SecA jest niezbędne dla przeżycia komórki, a jego aktywność podlega wielopoziomowej regulacji, obejmującej zmiany struktury i aktywności [198]. Dotychczasowe badania nad białkiem SecA koncentrowały się przede wszystkim na homologach pochodzących z modelowych organizmów, takich jak *Escherichia coli* czy *Bacillus subtilis*, natomiast wiedza o strukturze i funkcjonowaniu SecA u bakterii *H. pylori* pozostaje nieznana [180]. U *H. pylori* zidentyfikowano większość homologów

komponentów systemu SEC, jednakże nie znaleziono dotychczas homologu białka SecB [137]. Ponadto poziom homologii między komponentami systemu SEC u *H. pylori* i *E. coli* nie jest wysoki, co może sugerować, że mechanizm funkcjonowania systemu SEC u tych bakterii jest różny.

Aby poszerzyć wiedzę na temat białka SecA *H. pylori* i jego roli w zachowaniu homeostazy komórki bakteryjnej zastosowano różnorodne eksperymentalne podejścia, które zmierzały do: (1) biochemicznej charakterystyki białka SecA *H. pylori* i mutein SecA, (2) określenia zmian fenotypowych u *H. pylori* wywołanych mutacjami w rejonie C-końcowym SecA, (3) oraz zbadania, jak czynniki stresogenne uszkadzające błony komórkowe i wywołujące stres w peryplazmie mogą wpływać na ekspresję genów kodujących główne komponenty translokonu SEC.

8.1. Biochemiczna charakterystyka białka SecA *H. pylori*

W literaturze brak jest doniesień na temat własności biochemicznych białka SecA *H. pylori*. Sekwencje aminokwasowe modelowego białka SecA *E. coli* i SecA *H. pylori* znacząco się różnią (Rycina 43 i 44). W związku z tym trudno było wywnioskować, jakie efekty spowodują mutacje w rejonie C-końca *per analogiam*. Z tego powodu uznaliśmy za zasadne przeprowadzenie charakterystyki biochemicznej SecA *H. pylori* i jego zmutowanych wariantów. W tym celu zostały skonstruowane plazmidy ekspresyjne niosące zmutowane geny *secA*, przeprowadzono wydajną nadprodukcję mutein SecA w systemie *E. coli* i uzyskano preparaty oczyszczonych białek do dalszych analiz (Wyniki 7.1.).

	NBD1	
<i>E. coli</i> K12	MLIKLLTKVFGSRNDRTRLRRMRKVNIINAMEPEMEKLSDEELKGKTAEFRARLEK----	56
<i>H. pylori</i> 26695	MIKAIIGKIIIGTRNDRWIKQYKKQVLTINALEPTYEKMSDDELQNAFEELKKRVRSTEDK	60
<i>H. pylori</i> N6	MIKAIIGKIIIGTRNDRWIKQYKKQVLTINALEPTYEKMSDDELQNAFEELKKRVRSTEDK	60
	*: :: *:*:***** ::*: * ****:* **:*:***: . *: :*..	
<i>E. coli</i> K12	--GEVLENLIPEAFVAVREASKRVFGMRHFDVQLLGGMVLNERCIAEMRTGEGKTLTATL	114
<i>H. pylori</i> 26695	LQEKTLLEVLPEFAITREASKRILKMCHFDVQLIGGMVLNDGKIAEMKTGEGKTLVATL	120
<i>H. pylori</i> N6	LQEKILLEVLPEFAITREASKRILKMCHFDVQLIGGMVLNDGKIAEMKTGEGKTLVATL	120
	: * ::*:***:***:*****: : * *****:*****: *****:*****:***	
<i>E. coli</i> K12	PAYLNALTGKGHVVTVDYLAQRDAENNRPLFEFLGLTVGINLEGPMPA-PAKREAYAAD	173
<i>H. pylori</i> 26695	AVALNALKGESVYVVTVDYLAHRDSKEMEPLYHFLGYSVGTITASVRDDDERLEIYSKD	180
<i>H. pylori</i> N6	AVALNALKGESVYVVTVDYLAHRDSKEMEPLYQFLGYSVGTITASVRDDDERLEIYSKD	180
	. ***:*.*:*:*****:***: : .*:*** :** : : : * * : *	
	PPXD	
<i>E. coli</i> K12	ITYGTNNEYGFDYLRDNMAFSPEERVQRKLHYALVDEVDSILIDEARTPLIISGPAEDSS	233
<i>H. pylori</i> 26695	IVYGTNNEFGFDYLRDNMKYSLEHKVQKSHAFIVDEVDSILIDEARTPLIISGPVDRRM	240
<i>H. pylori</i> N6	IVYGTNNEFGFDYLRDNMKYSLEHKVQKSHAFIVDEVDSILIDEARTPLIISGPVDRRM	240
	*.*****:*****: : * *.:***: . :*:*****:*****:*****: : *	
<i>E. coli</i> K12	EMYKRVNKIIPHILIRQEKEDSETFQGEHFSVDEKSRQVNLTERGLVLIEELLVKEGIMD	293
<i>H. pylori</i> 26695	ENYNKADEVA-----KSMQVEIDFTIDEKNRAILITEEGIKKAENLF-----	282
<i>H. pylori</i> N6	ENYNKADEVA-----KSMQVETDFTIDEKNRAILITEEGIKKAENLF-----	282
	* *.:***: :*: * *.***:***: : :*:***: *.:*	
<i>E. coli</i> K12	EGESLYSPANIMLMHHVTAALRAHALFTRVDYIVKDGEVIVDEHTGRTMQGRWSDGL	353
<i>H. pylori</i> 26695	GVDNLYKIENAALSHHLDQALKANYLFFIDKDYIVANNEVVIVDEFTGRLESGRRFSEGL	342
<i>H. pylori</i> N6	GVDNLYKIENAALSHHLDQALKANYLFFIDKDYIVANNEVVIVDEFTGRLESGRRFSEGL	342
	:.***. * * ** : ***: * * * **** :.***:***.*** :***:***	
	NBD1	
<i>E. coli</i> K12	HQAVEAKEGVQIQNENQTLASITFQNYFRLYEKLAMGTGTADTEAFEFSSYKLDTVVVP	413
<i>H. pylori</i> 26695	HQALEAKEGVSIKEESQTLADITFQNYFRMFSLKAGMTGTAQTEATEFLEIYNLEVVSIP	402
<i>H. pylori</i> N6	HQALEAKEGVSIKEESQTLADITFQNYFRMFSLKAGMTGTAQTEATEFLEIYNLEVVSIP	402
	:**.*:*.***.*****:..*****:*** ** .*:***: : *	
	NBD2	
<i>E. coli</i> K12	TNRPMIRKDLPLDVYMTAEAKIQAIIEDIKERTAKGQPVLVGTISIEKSELVSNELTKAG	473
<i>H. pylori</i> 26695	TNLAIKRKDLNDLIYKSEKEKFDVAILKIKELHDKGQPVLVGTASIEKSETLHALLKKER	462
<i>H. pylori</i> N6	TNLAIKRKDLNDLIYKSEKEKFDVAILKIKELHDKGQPVLVGTASIEKSETLHALLKKER	462
	** : **** *:*: : * *:***:*.*** ***** ***** : *.*	
<i>E. coli</i> K12	IKHNVLNAKFHANEAAIIVAQAGYPAAVTIATNMAGRGTDIVLGGSWQAEVAALENPTAEQ	533
<i>H. pylori</i> 26695	IPHTVLNAKQHTKEAEIIKDAGLGKAVTIATNMAGRGVDIKLT-----	505
<i>H. pylori</i> N6	IPHTVLNAKQHTKEAEIIKDAGLGKAVTIATNMAGRGVDIKLT-----	505
	* *.***** *:*** *: :** .*****:*** *	
<i>E. coli</i> K12	IEKIKADWQVRHDAVLEAGGLHIIGTERHESRRIDNQLRGRSGRQGDAGSSRFYLSMEDA	593
<i>H. pylori</i> 26695	-----DEIKELGGLYIIIGTERHESRRIDNQLRGRSGRQGDGPGTSQFYLSLEDN	553
<i>H. pylori</i> N6	-----DEIKELGGLYIIIGTERHESRRIDNQLRGRSGRQGDGPGTSQFYLSLEDN	553
	* : * ***:*****:*****:***** *.:***:***	

Rycina 43. Porównanie sekwencji aminokwasowych białka SecA *E. coli* K12 i SecA *H. pylori* (26695 i N6). Domeny SecA oznaczono kolorami: NBD1 - kolor cyjanowy, PPXD - kolor szary, NBD2 - kolor żółty. „* ” - pozycje, w których wszystkie aminokwasy są identyczne; „: ” - pozycje z substytucjami aminokwasowymi, które mają podobne właściwości biochemiczne; „.” - pozycje z substytucjami aminokwasowymi o niskim podobieństwie właściwości biochemicznych; „brak symbolu” - pozycje, w których aminokwasy różnią się znacząco pod względem właściwości biochemicznych. Ramkami zaznaczono reszty aminokwasowe biorące udział w dimeryzacji SecA.

	NBD2	HSD	
<i>E. coli</i> K12	LMRIFASDRVSGMMRKLGMKPGEAIE	HPWVTKAIANAQRKVESRNFDIRKQLLEYDDVAN	653
<i>H. pylori</i> 26695	LLRIFGSDRIKGVMEKLGKDGEGHIE	SKLVTRAVENAQKKVENLHFESRKHLLLEYDDVAN	613
<i>H. pylori</i> N6	LLRIFGSDRIKGVMEKLGKDGEGHIE	SKLVTRAVENAQKKVENLHFESRKHLLLEYDDVAN	613
	*:***.***:*.**:***.* ** ** ** **:***:***:***. **: **:*		
	HWD		
<i>E. coli</i> K12	DQRRAIYSQRNELLDVSDV-SETINSIREDVFKAT---	IDAYIPQSLSEEMWDIPGLQER	709
<i>H. pylori</i> 26695	EQRKSVYKFRDELDDVNYDISAKIAENREYALNQIFSKLKAFDH-QNL-SEEELLGLKNI		671
<i>H. pylori</i> N6	EQRKSVYKFRDELDDVNYDISAKIAENREYALNQIFSKLKAFDH-QNL-SEEELLGLKNI		671
	:***:*. **:***:.. * . * . ** .:: :.**: * . * . : : **:		
		IRA1	
<i>E. coli</i> K12	LKNDFDLPLIAEWLDKEPELHEETLRERILAQSIIEVYQRKEEVVGAEMMRHFEKGVMLQ		769
<i>H. pylori</i> 26695	LKEDFNAHVSLEDLKKASPI-----ENFVAEKLKSDYENKMKVLDSEQRSRIERIVYLQ		725
<i>H. pylori</i> N6	LKEDFNAHVTLEDLKKAAPI-----ENFVAEKLKNDYENKMKVLDSEQRSRIERIVYLQ		725
	:: .: : : . * .: : : . *:.* **:.* :*: * **		
<i>E. coli</i> K12	TLDLWKEHLAAMDYLRLQGIHLRGYAKQDPKQEQYKRESFSMFAAMLESKYEVISTLSKV		829
<i>H. pylori</i> 26695	ILDNAWREHLYTMDNLKTGINLRGYNQKDPLVEYKKESYNLFLEFIEDIKTEAIKTFSKI		785
<i>H. pylori</i> N6	ILDNAWREHLYTMDNLKTGINLRGYNQKDPLVEYKKESYNLFLELIEDIKIEAIKTFSKI		785
	** . *:*** :** *: **:*** ** ** *:***:.* :*:.* *:.* **:		
	FLD	MBD	
<i>E. coli</i> K12	QVRMPPEVEEELQQR-MEAERLAQMQLSHQDDDSAAAAALAAQTGERKVGGRNDPCPCG		888
<i>H. pylori</i> 26695	QFENEQDSSDAERYLDNFSEEREHESVTYRHE-EALDEDLNVAMKAFKTPKRNEPCPCQ		844
<i>H. pylori</i> N6	QFENEQDSSDAERYLDNFSEEREHESVTYRHE-ETLDEDLNVAMKAFKTPKRNEPCPCQ		844
	*.. :. :. *: .: ** : * : : * : : . **:*		
<i>E. coli</i> K12	SGKKYKQCHGRILQ-----		901
<i>H. pylori</i> 26695	SGKKYKDCCAKSGPKKGLFAK		865
<i>H. pylori</i> N6	SGKKYKDCCAKSGPKKGLFAK		865
	*****.* .:		

Rycina 44. Porównanie sekwencji aminokwasowych białka SecA *E. coli* K12 i SecA *H. pylori* (26695 i N6). Domeny SecA oznaczono kolorami: NBD2 - kolor żółty, HSD - kolor fioletowy, HWD - kolor zielony, IRA1 - kolor niebieski, FLD - kolor pomarańczowy, MBD - kolor czerwony. „* ” - pozycje, w których wszystkie aminokwasy są identyczne; „: ” - pozycje z substytucjami aminokwasowymi, które mają podobne właściwości biochemiczne; „. ” - pozycje z substytucjami aminokwasowymi o niskim podobieństwie właściwości biochemicznych; „brak symbolu” - pozycje, w których aminokwasy różnią się znacząco pod względem właściwości biochemicznych.

8.1.1. Analizy strukturalne

Uważa się, że domena końca C SecA bakterii *E. coli* tworzy kontakty z rdzeniem katalitycznym białka [73]. Można było się więc spodziewać, że w przypadku podobnych oddziaływań w SecA *H. pylori* badane mutacje wpłyną na te międzydomenowe kontakty, co może doprowadzić do zmian w strukturze III-rzędowej białka. O zmianach takich pośrednio może świadczyć odmienny profil denaturacji białka. W celu weryfikacji tego przypuszczenia przeprowadzono analizę stabilności termicznej mutein metodą dichroizmu kołowego w dalekim ultrafiolecie (Wyniki 7.2.1.; 7.2.2.).

Niezmutowane białko SecA odznaczało się znaczącą stabilnością struktury z temperaturą topnienia o wartości 46,83°C. Wskazuje to, iż białko SecA *H. pylori* jest mniej podatne na denaturację termiczną niż SecA *E. coli*, dla którego wartości T_m wyznaczone metodą CD wynoszą 40,7°C ± 0,09°C [73] lub 43,6 ± 0,5°C [199]. Wyższa stabilność struktury SecA *H. pylori* może stanowić adaptację do specyficznych warunków środowiskowych w jakich funkcjonuje ten patogen.

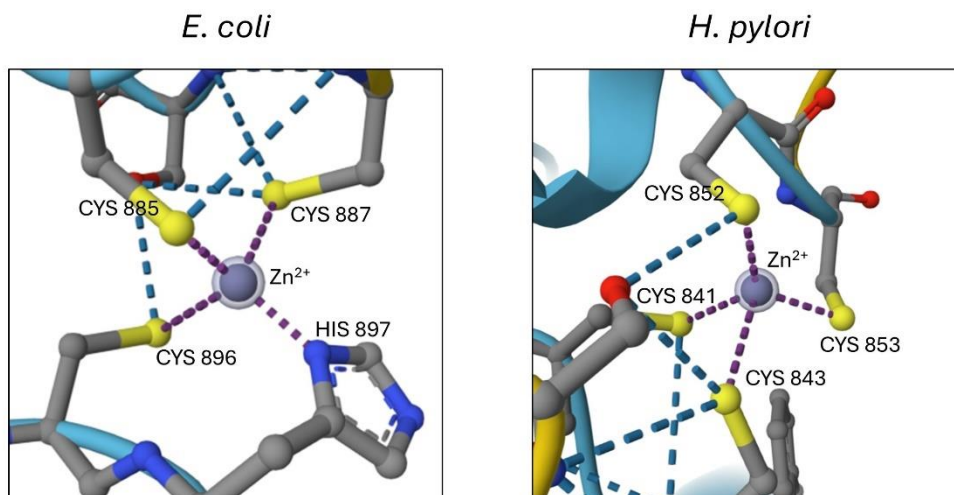
Większość mutein charakteryzowała się profilem denaturacji zbliżonym do obserwowanego dla białka typu dzikiego. Wyjątkami były białka SecAC841Y i SecAC843X. Pierwsza muteina charakteryzowała się podobną do białka typu dzikiego wartością T_m (48,12°C), jednakże zmiany eliptyczności molowej pojawiały się już przy niższych temperaturach niż w przypadku pozostałych wariantów. Wariant skrócony SecAC843X (kodon STOP powodujący skrócenie białka o 23 aminokwasy - delecja domeny MBD) wykazywał wyższą o około 8°C stabilność termiczną ($T_m = 54,5^\circ\text{C}$) w porównaniu do SecA typu dzikiego ($T_m = 46,8^\circ\text{C}$). Nieznaczny efekt zwiększonej stabilności po usunięciu domeny MBD opisano również w literaturze [73]. Wykazano, że SecA ΔMBD *E. coli* charakteryzował się o 1,3°C wyższą stabilnością termiczną ($T_m = 42^\circ\text{C}$) od wariantu typu dzikiego ($T_m = 40,7^\circ\text{C}$). Można więc przypuszczać, iż zmiany strukturalne wywołane delecją C-końca w SecA *H. pylori* mają znacznie mocniejszy wpływ na strukturę przestrzenną tego białka. Nieznaczne zmiany w strukturze trzeciorzędowej mogą także występować w muteinie SecAC481Y. Natomiast mutacja C852Y nie wpływała na stabilność termiczną białka. Można więc było oczekiwać, iż reszty te w różny sposób są odpowiedzialne za stabilizację struktury SecA.

Należy podkreślić, że reszty cysteinowe w domenie MBD SecA tworzą zachowaną ewolucyjnie sekwencję CXC_xC(H/C) (gdzie *x* oznacza dowolny aminokwas) wiążącą jon metalu. Porównanie sekwencji aminokwasowej obejmującej ten region u bakterii *E. coli*, *C. jejuni* i *H. pylori* przedstawiono na Rycinie 45.

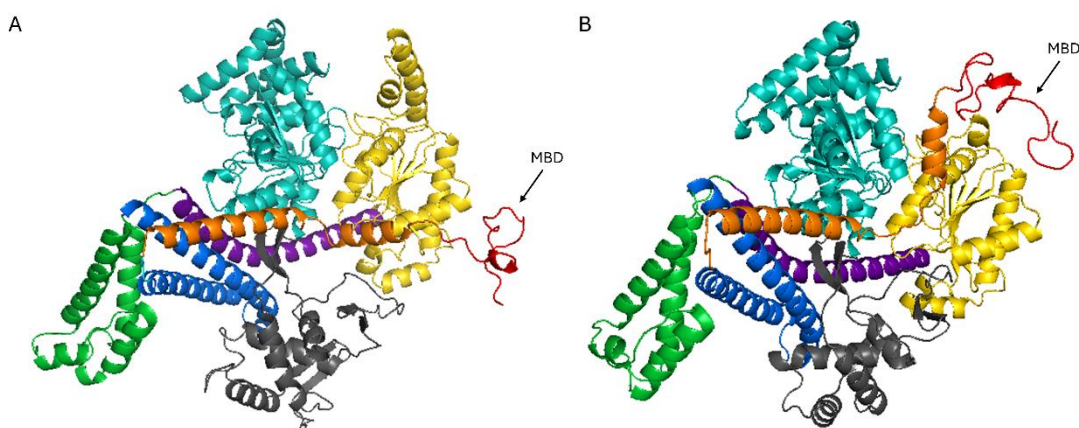
	FLD	MBD	
<i>E. coli</i> K12	QVRMP EEEVEE LEQQRRMEAE RL AQMQQLSHQDDDSAAAAALAAQTGERKVG RNDP	CHCGSGKKYKQCHGR LQ-----	901
<i>C. jejuni</i> 11169	QFNQEEAQNLN-----KANEEN-EKLLQSSVEMGASEDNLGAEF-KKVPRNAP	CHCGSGKKPFKECHGKSGPKQGILA	862
<i>H. pylori</i> 26695	QFENEQDSSDAERYLDNFSEEREHESVTYRHEEALDEDLNVAMKAFKTPKRNEP	CHCGSGKKYKDCCAKSGPKKGLFAK	865
<i>H. pylori</i> N6	QFENEQDSSDAERYLDNFSEEREHESVTYRHEETLDEDLNVAMKAFKTPKRNEP	CHCGSGKKYKDCCAKSGPKKGLFAK	865
	*.. : . : : : . : . : . ** **** ***,*:* .:		

Rycina 45. Porównanie sekwencji aminokwasowych domen FLD i MBD białka SecA *E. coli* K12, *C. jejuni* 11169 i *H. pylori* (26695 i N6). Domeny SecA oznaczono kolorami: FLD - kolor pomarańczowy, MBD - kolor czerwony. „, * ” - pozycje, w których wszystkie aminokwasy są identyczne; „, : ” - pozycje z substytucjami aminokwasowymi, które mają podobne właściwości biochemiczne; „, . ” - pozycje z substytucjami aminokwasowymi o niskim podobieństwie właściwości biochemicznych; „brak symbolu” - pozycje, w których aminokwasy różnią się znacząco pod względem właściwości biochemicznych. Reszty aminokwasowe koordynujące jon metalu zaznaczono czerwonymi ramkami.

Ponieważ nie jest dostępna struktura krystaliczna SecA *H. pylori*, a struktury SecA *E. coli* nie uwidaczniają domeny C-końcowej, zostało wykonane modelowanie struktury SecA *H. pylori* z jonem cynkowym za pomocą modelu AlphaFold [92,93] (<https://alphafoldserver.com/>) (Rycina 46). Dodatkowo przeprowadzono modelowanie struktur całych białek SecA *E. coli* i *H. pylori* (Rycina 47). Według modelu obie reszty Cys są zaangażowane w koordynację jonu metalu. Ponadto, C481 może tworzyć dodatkowe kontakty stabilizujące strukturę białka. Model nie pokazuje oddziaływań rejonu C-końcowego z rdzeniem katalitycznym SecA (reszty aminokwasowe ~1-832). Biorąc pod uwagę niską wiarygodność modelu dla tego fragmentu białka oraz sugerowaną jego dużą ruchliwość (w białku SecA *E. coli*), nie można wykluczyć istnienia takich kontaktów. Ponadto, model sugeruje odmienną orientację rejonu C-końcowego białka SecA *H. pylori* wobec rdzenia katalitycznego w porównaniu do SecA z *E. coli* (domenę MBD wskazano strzałką na Rycinie 47).



Rycina 46. Porównanie motywu wiążącego jon cynku w domenie MBD białka SecA *E. coli* i *H. pylori*. W przypadku *E. coli* Zn^{2+} koordynowany jest przez trzy reszty cysteinowe (Cys885, Cys887, Cys896) oraz histydynę (His897). W *H. pylori* jon Zn^{2+} wiązany jest przez cztery reszty cysteinowe (Cys841, Cys843, Cys852, Cys853). Struktura wygenerowana za pomocą modelu AlphaFold [92,93].



Rycina 47. Modele strukturalne białka SecA bakterii *E. coli* i *H. pylori*. A. SecA z *E. coli*. B. SecA z *H. pylori* N6. Domeny SecA oznaczono kolorami: NBD1 - kolor cyjanowy, PPXD - kolor szary, NBD2 - kolor żółty, HSD - kolor fioletowy, HWD - kolor zielony, IRA1 - kolor niebieski, FLD - kolor pomarańczowy, MBD - kolor czerwony. Strzałką wskazano domenę MBD. Struktury wygenerowane za pomocą modelu AlphaFold [92,93].

W następnym etapie przeanalizowano struktury IV rzędowe SecA *H. pylori* (Wyniki 7.2.3.). Oczyszczone białko SecA bakterii *E. coli* tworzy dimery jako główne formy oligomeryczne [95,96,98,200]. Przeprowadzone w ramach tej pracy badania wskazują, że główną frakcję preparatu białka SecA typu dzikiego *H. pylori* stanowią monomery (56%), a dimery, tetramery i inne formy oligomeryczne odpowiednio 4, 7 i 26%. Mutacje w rejonie C-końcowym nie wpływały znacząco na strukturę IV rzędową SecA. Można było jednak zaobserwować, że mutacje zaburzające rejon wiążący metal powodowały nieznaczne zmiany stosunków pomiędzy poszczególnymi formami oligomerycznymi. Należy podkreślić, że reszty aminokwasowe zaangażowane w tworzenie dimerów w domenach SecA *E. coli* (reszty aminokwasowe protomerów w domenach NBD1: N132, Y134, Q137, P159 i G160 i NBD2: T470, K471, H476, N477, F483, H484, N486 i A489; oraz reszty aminokwasowe protomeru α : K475, W519 i P529 i protomeru β : E141, M161, A525 i L526 [72]) nie są zachowane w SecA *H. pylori*, co może przynajmniej częściowo wyjaśniać przewagę monomerów w preparatach tego białka. Reszty aminokwasowe odpowiedzialne za tworzenie struktury dimerycznej zaznaczono na Rycinie 43.

8.1.2. Analiza aktywności

Główną funkcją SecA jest wiązanie prekursorów białek przeznaczonych do sekrecji translokonom SEC, a następnie przeprowadzenie procesu translokacji przez błonę cytoplazmatyczną kanałem SecYEG, wykorzystując energię z hydrolizy ATP. Centrum aktywne ATPazy jest zlokalizowane w domenie NBD1 [80], miejscu odległym w sekwencji liniowej od domeny C-końcowej. C-koniec SecA *E. coli* nie został uwidoczniiony w opublikowanych strukturach krystalicznych, jednakże analizy danych uzyskanych techniką SAXS sugerują, że w natywnej cząsteczce SecA rejon końca C jest usytuowany w pobliżu rdzenia katalitycznego białka [73]. W związku z tym, można było przypuszczać, że badane mutacje mogą modulować aktywność tego białka.

Aktywność ATPazy oczyszczonych preparatów SecA *E. coli* (aktywność spoczynkowa) jest nieduża. Dane literaturowe wskazują wartość k_{kat} $0,05 \text{ s}^{-1}$ [73]. W przypadku SecA *H. pylori* aktywność ta mieściła się w podobnym zakresie wartości ($k_{\text{kat}} = 0,0248 \text{ s}^{-1}$). Stała Michaelisa wyznaczona dla ATP w przypadku SecA *H. pylori* wynosi $0,04 \text{ mM}$ i jest ona niższa od wartości wyznaczonej dla SecA *E. coli* ($0,24 \text{ mM}$) [201], co wskazywałoby na wyższe powinowactwo SecA *H. pylori* do tego substratu.

Hydroliza ATP przez SecA *E. coli* jest silnie stymulowana w obecności fizjologicznych ligandów, przede wszystkim błon komórkowych i prekursorów wydzielanych białek [192,202]. Badania w układzie *in vitro* wskazują, że efektywne są np. oczyszczone białko preOmpA, preSecM lub osobno dodane peptydy sygnałowe i rozwinięte dojrzałe białka [192,193,202,203], a funkcję błon komórkowych mogą pełnić liposomy uzyskane z ekstraktów lipidów białkowych *E. coli* lub oczyszczonych fosfolipidów zmieszanych w odpowiednich proporcjach [121,192]. Aktywność ATPazy SecA *E. coli* wzrastała 10 - 80-krotnie, a stopień stymulacji zależał od kompozycji ligandów [192,201,202].

Układ wykorzystany w tej pracy zawierał liposomy wykonane z ekstraktu lipidów *E. coli*, peptyd sygnałowy cytochromu C *H. pylori* oraz rozwinięte dojrzałe białko HtrA *H. pylori*. Według danych literaturowych [121,204] sama obecność lipidów stymuluje ATPazę SecA *E. coli*, przy czym istotne jest stężenie lipidów w mieszaninie reakcyjnej. Aktywność ATPazy SecA *H. pylori* była także wyższa w obecności liposomów, a dodatek peptydu sygnałowego i rozwiniętego białka HtrA dalej stymulował hydrolizę ATP. Podobne obserwacje zostały opublikowane dla SecA *E. coli*. W tym przypadku równoczesny dodatek syntetycznych peptydów sygnałowych i rozwiniętych białek sekrecyjnych stymulował hydrolizę ATP w podobnym stopniu jak obecność rozwiniętych prekursorowych białek [192]. Co ciekawe, dodatek samego peptydu sygnałowego nie powodował inhibicji ATPazy SecA *H. pylori*, jak to było wykazane dla SecA *E. coli* [192,201]. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że mechanizmy regulacji ATPazy SecA u obu gatunków bakterii są podobne.

Mutacje w rejonie C-końcowym SecA miały zróżnicowany wpływ na jego aktywność enzymatyczną: od neutralnego (P858L, R837K), przez umiarkowanie aktywujące (skrócenie SecA - C843X), po wyraźnie stymulujące (C841Y, C852Y) (Wyniki 7.4.). Badania przeprowadzone na białku SecA *E. coli* [73] wykazały, że wariant pozbawiony domeny MBD (SecA Δ MBD), oraz podwójny mutant SecAC885A/C887A nie posiadały wykrywalnej aktywności ATPazowej; natomiast usunięcie całego regionu C-terminalnego SecA zwiększało aktywność ATPazową ponad 10-krotnie. Domena FLD najprawdopodobniej wiąże się do kieszeni wiążącej peptydowy substrat i powoduje zmiany strukturalne w domenie PPXD, prowadząc do autoinhibicji aktywności ATPazowej SecA. Zostało zaproponowane, że wiązanie substratu i aktywacja ATPazy jest zależna od domeny MBD; stąd jej brak lub obecność mutacji uniemożliwiających

koordynację jonu metalu prowadzą do zaniku aktywności [73]. Muteina SecAC843X jest najbardziej zbliżona do mutantu SecA Δ MBD *E. coli*. W obu przypadkach w części C-końcowej zostaje usunięta domena wiążąca metal, a pozostaje domena FLD. Jednakże mutacja C843X nie doprowadziła do utraty aktywności ATPazy; przeciwnie, aktywność spoczynkowa ATPazy SecAC843X była porównywalna do tej w białku niezmutowanym. Co więcej wartość k_{kat} w obecności ligandów była wyższa niż dla białka dzikiego, co sugeruje, iż wiązanie ligandów, w tym rozwiniętego białka substratowego, nie jest zaburzone. Wyniki te pozwalają przypuszczać, że w przypadku SecA *H. pylori* nie występuje autoinhibicja poprzez blokowanie miejsca wiązania substratu białkowego domeną FLD i wariant pozbawiony domeny MBD, w przeciwieństwie do SecA Δ MBD *E. coli*, zachowuje zdolność do wiązania substratów białkowych.

8.2. Wpływ mutacji w genie *secA* na cechy fenotypowe *H. pylori*

W celu określenia zmian fenotypowych u *H. pylori* wywołanych obecnością SecA z mutacjami w rejonie C-końcowym podjęto próbę uzyskania szczepów niosących poszczególne mutacje w genie *secA*. Niestety ze względu na budowę operonu i występującego w nim nakładania się genów *secA* i *lolF*, przeprowadzone manipulacje genetyczne wywołały efekt polarny manifestujący się znaczącym obniżeniem ekspresji genu *lolF* (Wyniki 7.5.). Geny o nakładającej się sekwencji często podlegają dodatkowym regulacjom, w których ekspresja pierwszego genu wpływa na ekspresję kolejnego. Dodatkowo w przypadku nakładających się genów odczytywanych w tym samym kierunku (jak w przypadku operonu *secA-lolF*) często obserwuje się sprzężenie translacyjne, polegające na zależności translacji drugiego genu od efektywności translacji pierwszego [205]. Najprawdopodobniej przerwanie ciągłości operonu spowodowało zaburzenia w procesie transkrypcji, powodujące obniżenie poziomu mRNA z genem *lolF*. W związku z tym konieczne było zastosowanie strategii pozwalającej na uzyskanie szczepów zawierających mutacje w genie *secA*, ale nie modyfikujące struktury operonu. Ponieważ zmutowane szczepy *H. pylori* N6 Δ *htrA* i *htrAS221A*, zawierają równocześnie mutacje w genie *secA*, przywrócono niezmutowany gen *htrA* w jego naturalny locus na chromosomie, pozostawiając mutacje *secA*. W ten sposób uzyskano szczepy *H. pylori* N6 *secAC841Y*, *H. pylori* N6 *secAC852Y* i *H. pylori* N6 *secAR837K* (Wyniki 7.5.1.). Podjęto także próbę uzyskania szczepów komplementacyjnych. Ponieważ nie było możliwe przywrócenie wariantu niezmutowanego genu *secA* w jego naturalny locus,

wprowadzono dodatkową kopię genu *secA* typu dzikiego w alternatywne miejsce na chromosomie (Wyniki 7.5.3.). Obecność dodatkowej kopii genu *secA* nie zmieniła poziomu transkryptu tego genu. Nie zaburzyła także wzrostu bakterii ani w przypadku szczepu *H. pylori* N6 typu dzikiego, ani szczepów *H. pylori* z mutacjami w genie *secA*. Niestety, ponownie w komórkach mutantów zaobserwowano spadek ekspresji genu *lolF*. Można więc przypuszczać, że obecność dwóch kopii genu *secA*, zmutowanego i niezmutowanego, zaburza regulację operonu *secA-lolF*. Dodatkowa kopia genu *secA* znajduje się pod kontrolą silnego promotora genu *ureA*. W związku z tym transkrypcja genu *secA* odbywa się niezależnie od transkrypcji operonu *secA-lolF*. Poziom białka SecA jest u bakterii *E. coli* ściśle regulowany [122]; przypuszczalnie u *H. pylori* jest podobnie. Jedną z możliwych przyczyn spadku poziomu mRNA *lolF* jest wydajna ekspresja *secA* z kopii genu pod kontrolą promotora *ure*, co może powodować zahamowanie transkrypcji operonu *secA-lolF* w naturalnym locus na chromosomie. Ta hipoteza nie wyjaśnia jednak, dlaczego w komórkach zawierających dwie kopie niezmutowanego *secA* nie był obserwowany spadek ekspresji *lolF*. W literaturze nie ma danych na temat regulacji operonu *secA-lolF*, w związku z tym trudno jest jednoznacznie określić przyczynę tego zjawiska. Konieczne jest więc przeprowadzenie dalszych badań wyjaśniających mechanizm regulacji ekspresji genu *lolF* u *H. pylori*.

W związku z brakiem odpowiednich szczepów komplementacyjnych, genomy zmutowanych szczepów (*H. pylori* *secAR837K*, *H. pylori* *secAC852Y* i *H. pylori* *secAC841Y*) zostały poddane sekwencjonowaniu w firmie zewnętrznej. Przeprowadzona przeze mnie analiza otrzymanych sekwencji wykazała potencjalną obecność mutacji punktowych, powodujących substytucje aminokwasowe w kilku genach: *hp_1167*, *hp_1369* i *hp_0580* (Wyniki 7.5.5., Tabela 34). Występowanie tych zmian w sekwencji zostało zweryfikowane sekwencjonowaniem powielonych fragmentów DNA, obejmujących zidentyfikowane mutacje. Ostatecznie, potwierdzono obecność tylko jednej mutacji niesynonimicznej, obecnej w szczepie *H. pylori* *secAR837K*: 156C>T w genie *hp_1167*, skutkującej wprowadzeniem kodonu STOP w pozycji Q53. Gen *hp_1167* koduje przypuszczalne białko błony zewnętrznej HP1167 znane jako Omp3 lub HofH. Ilość danych literaturowych odnośnie tego białka jest bardzo ograniczona, jednak w badaniach nad opornością bakterii *H. pylori* na amoksycylinę wykazano, że substytucja G228W w białku HofH pojawiła się spontanicznie w wyniku presji antybiotykowej i przyczyniła się do zwiększonej oporności zmutowanego szczepu na ten antybiotyk

[206]. Mimo, że mutacja w przeprowadzonej analizie wskazała na inny rodzaj zmiany sekwencji aminokwasowej, zbadalam oporność szczepów *H. pylori* *secAR837K*, *H. pylori* *secAC852Y* i *H. pylori* *secAC841Y* na antybiotyk amoksycylinę (Wyniki 7.6.3.). Uzyskane wyniki wskazały, że szczep *H. pylori* *secAR837K* nie różnił się poziomem oporności na amoksycylinę od pozostałych analizowanych szczepów. W związku z brakiem innych doniesień literaturowych odnośnie roli białka HofH oraz brakiem wpływu zidentyfikowanej mutacji na fenotyp, uznano że szczep *H. pylori* *secAR837K* może być wykorzystany w dalszych analizach. Brak obecności istotnych mutacji w sekwencjach kodujących pozwolił nam na wykorzystanie niezmutowanego szczepu macierzystego *H. pylori* N6 jako szczepu kontrolnego dla mutantów w genie *secA*.

Zdecydowana większość białek błony zewnętrznej jest eksportowana systemem SEC. W związku z tym zmiany w funkcjonowaniu translokonu mogą przekładać się na skład błony zewnętrznej i własności powierzchniowe komórki bakteryjnej. Jednym z indykatorów zmian w powierzchni komórki jest zdolność do autoaglutynacji (autoagregacji), objawiającej się tworzeniem wielokomórkowych skupisk. Proces ten jest zwykle regulowany przez rozpoznające się struktury powierzchniowe, takie jak białka i inne makrocząsteczki (np. egzopolisacharydy i eDNA), określane zbiorczo jako autoaglutyniny [207]. Autoaglutynacja jest uważana za istotny wyznacznik interakcji komórek bakteryjnych z komórką gospodarza oraz czynnik związany z wirulencją szczepów patogennych [208].

W ramach tej pracy wykazano, że mutacje powodujące zaburzenie miejsca wiążącego jon metalu w SecA (C841Y, C852Y) powodowały istotne statystycznie obniżenie autoaglutynacji. Efekt ten natomiast nie był widoczny w przypadku mutantu *H. pylori* *secAR837K* (Wyniki 7.6.1.). Uzyskany wynik wskazuje, iż mutacje zaburzające miejsce wiązania metalu w SecA mogą wpływać na własności powierzchni komórki *H. pylori*, co sugeruje odmienną kompozycję makrocząsteczek powierzchniowych.

Do tej pory nie zostały zidentyfikowane autoaglutyniny u *H. pylori*, w związku z tym trudno jest zweryfikować, który składnik błony zewnętrznej jest translokowany w odmienny sposób w komórkach mutantów *H. pylori* N6 *secAC841Y* i *H. pylori* N6 *secAC852Y*. Dalsze badania, w tym planowana analiza proteomów mutantów, powinny wskazać prawdopodobne autoaglutyniny *H. pylori*.

W analizach fenotypowych nie zaobserwowano natomiast zmian w integralności błony zewnętrznej u zmutowanych bakterii po zastosowaniu jonowego detergentu jakim jest SDS (Wyniki 7.6.2.). Znacząca odporność na niskie stężenia SDS obserwowana u bakterii Gram-ujemnych wynika z ujemnego ładunku błonowych sacharydów [209,210]. W związku z tym można spodziewać się, że odmienne funkcjonowanie translokonu SEC w mutantach nie prowadzi do zmian w strukturze lipopolisacharydu.

Bardzo ciekawym wynikiem było wykazanie, iż zmutowane szczepy *H. pylori* N6 *secAC841Y*, *H. pylori* N6 *secAC852Y* i *H. pylori* N6 *secAR837K* charakteryzują się niższą wrażliwością na antybiotyk tetracyklinę (Wyniki 7.6.3.). Tetracyklina jest związkiem hamującym syntezę białek bakteryjnych poprzez wiązanie się do cząsteczki 16S rRNA w podjednostce 30S rybosomu, uniemożliwiając przyłączenie aminoacylo - tRNA [211]. Znane są 4 główne mechanizmy oporności na tetracyklinę u bakterii, wykorzystujące: (1) pompy efluksyjne (EFF), (2) białka chroniące rybosomy (RPP), (3) destruktazy typu 1 (DES1) i (4) destruktazy typu 2 (DES2) [212]. Wpływ mutacji w genie *secA* na funkcjonowanie powyższych mechanizmów wydaje się mało prawdopodobny. Bardziej zasadne jest przypuszczenie, że mutacje te prowadzą do obniżonej wydajności pobierania tego antybiotyku przez zmutowane komórki. W przypadku *E. coli*, tetracyklina dyfunduje biernie przez poryny błony zewnętrznej OmpF i OmpC, o czym świadczą badania demonstrujące, że mutacje poryn powodują zmniejszoną wrażliwość na tetracykliny [213]. Następnie, zgromadzone w peryplazmie, nieznacznie lipofilowe cząsteczki tetracykliny dyfundują do cytoplazmy przez błonę wewnętrzną. Proces wnikania do cytoplazmy jest częściowo zależny od energii i wymaga siły protonomotorycznej oraz hydrolizy wiązania fosforanowego ATP [214]. Można przypuszczać, że w mutantach *H. pylori secA* dochodzi do obniżenia poziomu poryn, przez które tetracyklina wnika do komórek. Warto też zauważyć, że zarówno działanie translokonu SEC, jak i wnikanie tetracykliny do cytoplazmy są zależne od takich samych źródeł energii. Być może w komórkach mutantów występuje konkurencja o dostęp do ATP lub siły protonomotorycznej.

Ponieważ nie wiadomo, w jaki sposób mutacje w rejonie C-końcowym SecA wpływają na translokację białek przez błonę wewnętrzną, podjęto próbę określenia wydajności tego procesu. Jako modelowy substrat dla SEC zastosowano białko gGT. Jest to wydzielany poza komórkę *H. pylori* czynnik wirulencji, który ulega dojrzewaniu

w przestrzeni peryplazmatycznej. Powstanie formy aktywnej gGT wymaga autokatalitycznego cięcia pomiędzy resztami Gln390 a Thr391 białka, prowadząc do powstania dwóch fragmentów o masie około 40 i 20 kDa [215]. Proces ten zachodzi dopiero po translokacji białka przez system SEC i odcięciu peptydu sygnałowego przez peptydazę sygnałową. W związku z tym poziom aktywności tego białka może świadczyć o wydajności translokacji. Aktywność białka gGT wydzielonego przez szczepy z mutacjami w genie *secA* była porównywalna lub nawet nieco wyższa (dla SecAC852Y) niż ta w szczepie typu dzikiego *H. pylori*. Poziom ekspresji genu *ggt* w dwóch przetestowanych szczepach *H. pylori* N6 *secAC841Y* i *H. pylori* N6 *secAR837K* był porównywalny do tego w szczepie *H. pylori* wt. Z kolei analiza poziomu białka wykazała zwiększoną ilość podjednostek dojrzałych form gGT w szczepach zmutowanych w porównaniu do szczepu dzikiego. Jednakże, różnice te nie były istotne statystycznie (Wyniki 7.6.4.; 7.6.5.; 7.6.6.). Wyniki te wskazują, iż mutacje w genie *secA* nie obniżają translokacji białka gGT. Wynik ten był zaskakujący, gdyż poprzednio uważano, że mutacje w *secA* suprymują negatywny efekt mutacji *htrA* poprzez obniżenie efektywności eksportu białek z cytoplazmy systemem SEC [180]. Należy jednak podkreślić, że gGT jest białkiem rozpuszczalnym. Uważa się, że rozpuszczalne białka peryplazmatyczne posiadają naturalną zdolność do zwijania się w struktury natywne, nie wykazują tendencji do agregacji i być może nie wymagają asysty białek opiekuńczych w procesie zwijania [216]. Z kolei białka błony zewnętrznej (OMP) przyjmują natywną strukturę dopiero po inkorporacji do dwuwarstwy lipidowej. Podczas tranzytu do OM wymagają one asysty białek opiekuńczych i przy zaburzeniach w funkcjonowaniu PSKJB często wchodzą w nienaturalne, szkodliwe dla komórki oddziaływania i tworzą agregaty [217]. Proteaza HtrA, istotny komponent PSKJB, bierze udział w przeciwdziałaniu skutkom stresu wywołanego przez błędnie zwinięte białka (ang. *protein folding stress*) usuwając białka o nieprawidłowej strukturze i zapobiegając ich agregacji [218]. Jest więc możliwe, że różnice w efektywności translokacji dotyczą białek OMP, a nie rozpuszczalnych białek peryplazmatycznych. W ramach tej pracy ta ewentualność nie została sprawdzona, głównie ze względu na brak odpowiedniego białka modelowego. Białka błony zewnętrznej nie wykazują znanych mierzalnych aktywności enzymatycznych i nie posiadamy przeciwciał skierowanych przeciw białkom OMP *H. pylori*. Dobrym reporterem dla eksportu białek błony zewnętrznej byłaby toksyna VacA, która jest autotransporterem typu V i zawiera domenę β -baryłki, ulegającą inkorporacji do OM [219]. Jednakże, w przypadku szczepu *H. pylori* N6 monitorowanie eksportu VacA nie

jest możliwe, gdyż białko to jest w nim niewykrywalne. Analiza sekwencji genu *vacA* wykazała, że zawiera on mutację przedwcześnie powodującą terminację transkrypcji (Mirosław Jarząb, wyniki nieopublikowane) i prawdopodobnie transkrypt lub skrócone białko są wysoce niestabilne. W najbliższej przyszłości zostanie przeprowadzona analiza proteomiczna komórek zmutowanych szczepów *H. pylori* *secA*, która może ujawnić zmiany w poziomie białek OMP w odniesieniu do szczepu kontrolnego.

Kolejnym zaskakującym wynikiem okazał się wpływ mutacji w genie *secA* na poziom ekspresji genu *cagA*: mutacja *secAR837K* powodowała spadek, natomiast *secAC841Y* - wzrost poziomu mRNA *cagA*. CagA, jest białkiem efektorowym *H. pylori*, które nie jest wydzielane systemem SEC, lecz za pośrednictwem systemu sekrecji typu czwartego (T4SS) jest wprowadzane bezpośrednio do komórki gospodarza [220]. W związku z tym CagA nie jest substratem dla SecA. Nie ma wielu doniesień literaturowych na temat regulacji ekspresji *cagA* w komórce *H. pylori*, jednak istnieją prace wskazujące na stymulację syntezy mRNA *cagA* w odpowiedzi na stres wywołany podwyższonym stężeniem soli [221] i po nagłym obniżeniu pH [222]. Można więc przypuszczać, że obserwowany wzrost poziomu ekspresji *cagA* w szczepie *H. pylori* N6 *secAC841Y* jest spowodowany wystąpieniem warunków stresowych związanych z mutacją *secAC841Y*. Natomiast, obniżenie syntezy mRNA *cagA* w szczepie *H. pylori* N6 *secAR837K* jest trudne do wytłumaczenia, gdyż brakuje doniesień opisujących spadek transkrypcji tego genu w warunkach stresowych. Niemniej, spadek ekspresji *cagA* występuje w komórkach traktowanych interferonem γ [223], co wskazuje na istnienie mechanizmów hamujących transkrypcję tego genu. Jednakże, we wszystkich opublikowanych pracach poziom mRNA *cagA* korelował z zawartością białka CagA w komórkach; w przypadku mutantów *H. pylori* *secA* poziom CagA był porównywalny do zawartości tego białka w szczepie niezmutowanym (Wyniki 7.6.6.). Mechanizm leżący u podstaw przeciwnego wpływu obu mutacji w genie *secA* na ekspresję genu *cagA* pozostaje niejasny i będzie wymagał dalszych badań.

8.3. Wpływ czynników stresogennych na poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC

Zaburzenia w procesie fałdowania/dojrzwania białek peryplazmatycznych i błonowych mogą negatywnie wpływać na funkcjonowanie wielu układów komórkowych. W warunkach stresu związanego ze zwijaniem się i tranzytem białek w przestrzeni peryplazmatycznej oraz ich inkorporacją i tworzeniem właściwych struktur w błonie zewnętrznej, kontrolowanie napływu nowych polipeptydów z cytoplazmy może stanowić mechanizm zapobiegający gromadzeniu się nieprawidłowo zwiniętych białek. U bakterii *E. coli*, w warunkach stresu pozacytoplazmatycznego, obserwuje się obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących białka błony zewnętrznej i białka składowe struktur pozakomórkowych, np. rzęsek [224–226]. Przykładowo, większość mutacji supresorowych fenotypu wrażliwości na podwyższoną temperaturę u mutantów *E. coli htrA* zmniejsza stres powłok komórkowych poprzez eliminację lub zwiększony wpływ substratów HtrA, bądź też poprzez obniżenie syntezy białek, które w warunkach braku HtrA mogą mieć toksyczny wpływ na komórkę bakteryjną [227]. U *H. pylori*, w szczepach pozbawionych funkcjonalnego genu *htrA*, zaobserwowano obecność dodatkowych, najprawdopodobniej supresorowych mutacji w genie *secA* [180]. Fakt ten sugerował, że zaburzenie homeostazy białek peryplazmatycznych i błonowych może wymagać modulowania efektywności transportu poprzez translokon SEC. Ponieważ wprowadzenie mutacji zmieniającej funkcjonowanie kluczowego enzymu systemu SEC jest dość drastycznym sposobem modyfikacji wydajności translokacji białek przez błonę wewnętrzną, założyliśmy, że istnieją także inne mechanizmy regulujące ten proces. Jednym z nich może być modulowanie poziomu ekspresji genów kodujących komponenty systemu SEC w odpowiedzi na stres związany ze zwijaniem białek poza cytoplazmą. W związku z tym kolejnym podjętym w tej pracy krokiem było określenie, w jaki sposób czynniki stresogenne uszkodzające błony komórkowe i wywołujące stres w peryplazmie wpływają na ekspresję genów kodujących kluczowe składniki systemu SEC.

Zastosowane w moich badaniach czynniki stresogenne obejmują podwyższone stężenie soli (NaCl), detergent jonowy SDS, etanol i kwaśne pH. Każdy z nich oddziałuje na powłoki komórkowe bakterii, ale mechanizmy ich działania są odmienne. Stresy solny i kwasowy są typowymi, fizjologicznymi stresami dla bakterii *H. pylori*. Według danych

literaturowych, użyte w pracy stężenie soli wynoszące 300 mmol/l może być powszechnie osiągnięte lub przekraczane w jamie żołądka w niektórych populacjach [221]. Podwyższone stężenie NaCl wywołuje szok osmotyczny jonowy, a dodatkowo nadmiar jonów sodu może prowadzić do depolaryzacji błony komórkowej oraz zaburzeń w strukturze i aktywności białek [228,229]. Obniżenie wartości pH prowadzi do uprotonowania cząsteczek biologicznych, zmieniając ich ładunek, co może niekorzystnie wpłynąć zarówno na ich strukturę, dynamikę oraz funkcję, poprzez modulację oddziaływań międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych [230]. SDS, jak zostało wspomniane wcześniej, jest czynnikiem uszkadzającym błony komórkowe. Natomiast etanol jest związkiem indukującym systemy odpowiedzi stresowej u *E. coli*, w tym odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny, powodując uszkodzenia błon komórkowych oraz zaburzenia procesów energetycznych komórki [231,232].

Każdy z zastosowanych stresorów wpływał na poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC (Wyniki 7.7.2.). Warto jednak podkreślić, że zakres zmian oraz zestaw genów o zmienionym poziomie ekspresji były odmienne, co można uznać za zgodne z różnymi mechanizmami działania użytych czynników stresowych. Najsilniejszy efekt zaobserwowano w przypadku etanolu, który silnie hamował ekspresję genów kodujących białka tworzące kanał w błonie wewnętrznej (*secY*, *secE*), a jednocześnie stymulował ekspresję genu *secA*. Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi wskazującymi na pleiotropowe działanie etanolu i jego istotny wpływ na fizjologię komórki [231,232]. Najmniejsze zmiany w poziomie ekspresji genów spowodowało obniżenie pH środowiska do wartości 5,0, powodujące jedynie nieznaczne obniżenie transkrypcji genu *secY*. Wynik ten może odzwierciedlać zdolność *H. pylori* do adaptacji do zmiennych warunków pH w błonie śluzowej żołądka. *H. pylori* jest neutralofilem przystosowanym do życia w środowisku kwaśnym, a wartość pH=5,0 nie hamuje wzrostu tego organizmu. Mechanizmy adaptacji do niskiego pH są u tego organizmu unikatowe i pozwalają utrzymać odpowiednie pH przestrzeni peryplazmatycznej, w kwaśnym środowisku żołądka, przy którym zarówno pH cytoplazmy, jak i potencjał błony komórkowej są odpowiednie dla wzrostu bakterii [233]. W związku z tym zastosowany w badaniach stres pH mógł nie spowodować znaczącego stresu w osłonach komórkowych i w rezultacie nie doprowadził do istotnych zmian poziomu ekspresji genów systemu SEC. Zaobserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów *secG* i *secE* w komórkach traktowanych detergentem SDS mogą wynikać

z konieczności stabilizacji struktury kanału i modulowaniu jego funkcjonowania w warunkach zaburzonej integralności dwuwarstwy lipidowej błon. W warunkach stresu solnego zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji genu *secY* przy jednoczesnym nieznacznym wzroście poziomu ekspresji *secA*. Zjawisko to również może wynikać z zaburzeń w integralności i funkcjonowaniu błony komórkowej spowodowanych wysokim stężeniem NaCl.

U bakterii *H. pylori* nie został dotychczas opisany mechanizm regulacji odpowiedzi na stres pozacytoplazmatyczny. Nie zidentyfikowano alternatywnych czynników sigma ani systemów dwuskładnikowych funkcjonujących w warunkach stresu oddziałującego na powłoki komórkowe; nie są także znane przekaźniki sygnału stresowego do cytoplazmy. W niniejszej pracy zaobserwowano, że czynniki stresogenne wywierały zróżnicowany wpływ na ekspresję genów kodujących komponenty systemu SEC. W przypadku wyraźnej represji genu *secY* występowała równoczesna stymulacja transkrypcji *secA* (działanie NaCl i etanolu), a obniżonemu poziomowi ekspresji genu *secG* towarzyszył wzrost poziomu mRNA *secE* (działanie SDS). Jest to ciekawa obserwacja, do tej pory nie odnotowana w literaturze dla bakterii poddanych działaniu czynników stresowych. Zróżnicowana ekspresja genów *secA*, *secY* i *secF* została natomiast opisana przy przejściu bakterii z fazy logarytmicznej do stacjonarnej: poziom *secA* wzrastał, podczas gdy zawartość mRNA *secY* i *SecF* malała. Obserwacja ta dotyczyła zarówno bakterii Gram-dodatniej *Bacillus subtilis*, jak i Gram ujemnej *E. coli* [234], co może wskazywać na zjawisko powszechnie występujące u bakterii.

Istnieje ewidentny związek pomiędzy ekspozycją bakterii na warunki stresowe a przejściem hodowli w stacjonarną fazę wzrostu. Tranzycja z fazy intensywnego wzrostu do stacjonarnej fazy wzrostu następuje w wyniku braku substancji odżywczych, obecności toksyn lub działania stresu abiotycznego i wiąże się z dużymi zmianami metabolicznymi [235]. W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach bakterie znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu były poddawane godzinnej ekspozycji na czynniki stresogenne. Być może, pod wpływem stresu hodowla mogła stopniowo przechodzić w stacjonarną fazę wzrostu. Alternatywnie, opisane przez autorów zmiany w ekspresji genów *sec* mogły być skutkiem stresu pojawiającego się w starzejącej się hodowli bakteryjnej.

Trudno jest jednoznacznie ocenić znaczenie zróżnicowanej ekspresji genów *secA* i *secY*. SecY jest białkiem tworzącym transbłonowy kanał przewodzący preproteinę do peryplazmy [236], natomiast pozostałe komponenty kanału SecYEG – SecE i SecG, pełnią funkcje pomocnicze polegające na stabilizacji struktury kanału i modulowaniu wydajności translokacji [237,238]. Obniżenie poziomu mRNA *secY* może więc ograniczać transport białek przez translokon SEC. W takiej sytuacji wzrost poziomu ekspresji genu *secA* mógłby umożliwiać eksport białek w mechanizmie zależnym wyłącznie od SecA. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, samo białko SecA *E. coli*, niezależnie od kompleksu SecYEG, może transportować białka przez błonę komórkową. Proces ten jest mniej wydajny i charakteryzuje się ograniczoną specyficznością względem peptydów sygnałowych, ale potencjalnie może stanowić alternatywny szlak eksportu białek w warunkach stresowych [121,239].

Podsumowując, stres środowiskowy wpływający negatywnie na powłoki komórkowe może modulować poziom ekspresji genów kodujących komponenty translokonu SEC. Można więc oczekiwać, że w odpowiedzi na stres dochodzi do zmian w wydajności funkcjonowania translokonu SEC.

9. PODSUMOWANIE

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wskazują, że modulowanie tempa translokacji białek poprzez system SEC może być elementem odpowiedzi komórki na stres występujący w powłokach komórkowych bakterii. Stres ten może być wywołany deregulacją pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek (brak funkcjonalnego białka HtrA) lub działaniem czynników abiotycznych, a jego efektem może być zaburzenie homeostazy w peryplazmie i błonach komórkowych.

Wykonane w ramach mojej pracy doktorskiej badania pozwalają na zaproponowanie następujących wniosków:

- (1) Działanie translokonu SEC może być modulowane poprzez mutacje w genie *secA*, zmieniające region C-końcowy SecA. Efektem tych mutacji mogą być zmienione własności powierzchni zmutowanych komórek i ich obniżona wrażliwość na antybiotyki tetracyklinę. Nie zaobserwowano natomiast wpływu mutacji na wydajność sekrecji rozpuszczalnego białka gGT, co może wskazywać na odmienną efektywność translokacji białek błonowych i rozpuszczalnych w obecności mutein SecA.
- (2) Mutacje w rejonie C-końcowym SecA wywierają zróżnicowany wpływ na właściwości tego białka oraz fenotypy zmutowanych szczepów *H. pylori secA*. Można je jednak podzielić na dwie główne grupy: (A) mutacje zaburzające miejsce wiązania metalu (C841Y, C852Y) i (B) mutacje znajdujące się poza tym miejscem (R837K, P858L). Efekty mutacji w pierwszej grupie wykazują bardziej wyraźne efekty i obejmują podwyższoną aktywność ATPazy, zmiany w poziomie autoagregacji komórek, wzmożoną ekspresję genu *cagA*.
- (3) Czynniki stresogenne działające na komórkę i wywołujące stres w błonach oraz przestrzeni peryplazmatycznej powodowały zróżnicowaną ekspresję genów *sec*. W warunkach stresu indukowanego NaCl i etanolem, efekt ten przypominał zmiany ekspresji genów *secY* i *secF* przy przejściu bakterii *E. coli* i *B. subtilis* do stacjonarnej fazy wzrostu.

Ponadto efektem niniejszej pracy jest charakterystyka biochemiczna dotąd niezbadanego pod tym względem białka SecA *H. pylori* i wstępne porównanie jego własności do

dokładnie opisanego w literaturze białka SecA bakterii *E. coli*. Białka te, mimo istnienia wielu podobieństw, wykazują istotnie różnice:

- (1) Struktury trzeciorzędowe obu białek wydają się być nieco odmienne. Ułożenie przestrzenne rejonów C-końcowych SecA *H. pylori* i SecA *E. coli* najprawdopodobniej różni się. Świadczą o tym różne odmienne stabilności termiczne cząsteczek wariantów pozbawionych domeny MBD, przy czym wartość T_m białka SecAC843X *H. pylori* była o ok. 7°C wyższa niż T_m muteiny SecA Δ MBD *E. coli*. Ponadto obie muteiny różniły się aktywnością ATPazy: wariant z *H. pylori* zachowywał tę aktywność, podczas gdy wariant z *E. coli* był pozbawiony zdolności do hydrolizy ATP. Może to świadczyć o odmiennych strategiach regulacji aktywności obu białek.
- (2) Białka SecA *H. pylori* i SecA *E. coli* różnią się strukturą czwartorzędową. Główną formą SecA *H. pylori* w roztworze jest monomer, podczas gdy SecA *E. coli* występuje przede wszystkim jako dimer.

10. Literatura

1. Weiner, J.H.; Li, L. Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778*, 1698–1713, doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.020.
2. Green, E.R.; Mecsas, J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* **2016**, *4*, doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
3. Ruiz, N.; Kahne, D.; Silhavy, T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4*, 57–66, doi:10.1038/nrmicro1322.
4. Trivedi, A.; Gosai, J.; Nakane, D.; Shrivastava, A. Design principles of the rotary Type 9 Secretion System. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fmicb.2022.845563.
5. Koster, M.; Bitter, W.; Tommassen, J. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **2000**, *290*, 325–331, doi:10.1016/S1438-4221(00)80033-8.
6. Filloux, A. Bacterial protein secretion systems: Game of Types. *Microbiology* **2022**, *168*, 001193, doi:10.1099/mic.0.001193.
7. Natale, P.; Brüser, T.; Driessen, A.J.M. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778*, 1735–1756, doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
8. Rêgo, A.T.; Chandran, V.; Waksman, G. Two-Step and One-Step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: Contrasting the Type IV Secretion System and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **2010**, *425*, 475–488, doi:10.1042/BJ20091518.
9. Figaj, D.; Ambroziak, P.; Rzepka, I.; Skórko-Glonek, J. SurA-like and Skp-like proteins as important virulence determinants of the Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Mol Sci* **2022**, *24*, 295, doi:10.3390/ijms24010295.
10. Morgan, J.L.W.; Acheson, J.F.; Zimmer, J. Structure of a Type-I Secretion System ABC transporter. *Structure* **2017**, *25*, 522–529, doi:10.1016/j.str.2017.01.010.
11. Young, J.; Holland, I.B. ABC Transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1461*, 177–200, doi:10.1016/S0005-2736(99)00158-3.
12. Korotkov, K.V.; Sandkvist, M.; Hol, W.G.J. The Type II Secretion System: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **2012**, *10*, 336–351, doi:10.1038/nrmicro2762.
13. Korotkov, K.V.; Sandkvist, M. Architecture, function, and substrates of the Type II Secretion System. *EcoSal Plus* **2019**, *8*, doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018.
14. Pais, S.V.; Kim, E.; Wagner, S. Virulence-associated Type III Secretion Systems in Gram-negative bacteria. *Microbiology* **2023**, *169*, 001328, doi:10.1099/mic.0.001328.
15. Fronzes, R.; Christie, P.J.; Waksman, G. The structural biology of Type IV Secretion Systems. *Nat Rev Microbiol* **2009**, *7*, 10.1038/nrmicro2218.
16. Li, Y.G.; Hu, B.; Christie, P.J. Biological and structural diversity of Type IV Secretion Systems. *Microbiol Spectr* **2019**, *7*, doi:10.1128/microbiolspec.PSIB-0012-2018.
17. Fan, E.; Chauhan, N.; Udatha, D.B.R.K.G.; Leo, J.C.; Linke, D. Type V Secretion Systems in bacteria. *Microbiol Spectr* **2016**, *4*, doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0009-2015.
18. Meuskens, I.; Saragliadis, A.; Leo, J.C.; Linke, D. Type V Secretion Systems: An overview of passenger domain functions. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 1163, doi:10.3389/fmicb.2019.01163.
19. Cherrak, Y.; Flaugnatti, N.; Durand, E.; Journet, L.; Cascales, E. Structure and activity of the Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr* **2019**, *7*, 10.1128/microbiolspec.psib-0031-2019.
20. Silverman, J.M.; Brunet, Y.R.; Cascales, E.; Mougous, J.D. Structure and regulation of the Type VI Secretion System. *Annu Rev Microbiol* **2012**, *66*, 453–472, doi:10.1146/annurev-micro-121809-151619.

21. Bhoite, S.; van Gerven, N.; Chapman, M.R.; Remaut, H. Curli biogenesis: bacterial amyloid assembly by the Type VIII Secretion pathway. *EcoSal Plus* **2019**, *8*, doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0037-2018.
22. Depluvere, S.; Devos, S.; Devreese, B. The role of bacterial secretion systems in the virulence of Gram-negative airway pathogens associated with cystic fibrosis. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01336
23. Lasica, A.M.; Ksiazek, M.; Madej, M.; Potempa, J. The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and recent insights into its structure and function. *Front Cell Infect Microbiol* **2017**, *7*, 215, doi:10.3389/fcimb.2017.00215.
24. Gorasia, D.G.; Veith, P.D.; Reynolds, E.C. The Type IX Secretion System: advances in structure, function and organisation. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1173, doi:10.3390/microorganisms8081173.
25. Sandkvist, M. Type II Secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **2001**, *69*, 3523–3535, doi:10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001.
26. Costa, T.R.D.; Felisberto-Rodrigues, C.; Meir, A.; Prevost, M.S.; Redzej, A.; Trokter, M.; Waksman, G. Secretion Systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **2015**, *13*, 343–359, doi:10.1038/nrmicro3456.
27. Naskar, S.; Hohl, M.; Tassinari, M.; Low, H.H. The structure and mechanism of the bacterial Type II Secretion System. *Molecular Microbiology* **2021**, *115*, 412–424, doi:10.1111/mmi.14664.
28. Cianciotto, N.P. Type II Secretion: A protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **2005**, *13*, 581–588, doi:10.1016/j.tim.2005.09.005.
29. Durand, É.; Bernadac, A.; Ball, G.; Lazdunski, A.; Sturgis, J.N.; Filloux, A. Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: The pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **2003**, *185*, 2749–2758, doi:10.1128/JB.185.9.2749-2758.2003.
30. Zielke, R.A.; Simmons, R.S.; Park, B.R.; Nonogaki, M.; Emerson, S.; Sikora, A.E. The Type II Secretion pathway in *Vibrio cholerae* is characterized by growth phase-dependent expression of exoprotein genes and is positively regulated by σ^E . *Infect Immun* **2014**, *82*, 2788–2801, doi:10.1128/IAI.01292-13.
31. Dautin, N. Folding control in the path of Type 5 Secretion. *Toxins (Basel)* **2021**, *13*, 341, doi:10.3390/toxins13050341.
32. Bernstein, H.D. Type V Secretion in Gram-negative bacteria. *EcoSal Plus* **8**, doi:10.1128/ecosalplus.esp-0031-2018.
33. Coppens, F.; Castaldo, G.; Debraekeleer, A.; Subedi, S.; Moonens, K.; Lo, A.; Remaut, H. Hop-Family *Helicobacter* outer membrane adhesins form a novel class of type 5-like secretion proteins with an Interrupted β -barrel domain. *Molecular Microbiology* **2018**, *110*, 33–46, doi:10.1111/mmi.14075.
34. Pohlner, J.; Halter, R.; Beyreuther, K.; Meyer, T.F. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **1987**, *325*, 458–462, doi:10.1038/325458a0.
35. Fiocca, R.; Necchi, V.; Sommi, P.; Ricci, V.; Telford, J.; Cover, T.L.; Solcia, E. Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* **1999**, *188*, 220–226, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<220::AID-PATH307>3.0.CO;2-C.
36. Cover, T.L.; Blanke, S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 320–332, doi:10.1038/nrmicro1095.
37. Rangarajan, M.; Aduse-Opoku, J.; Paramonov, N.; Hashim, A.; Bostanci, N.; Fraser, O.P.; Tarelli, E.; Curtis, M.A. Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol* **2008**, *190*, 2920–2932, doi:10.1128/JB.01868-07.
38. El Rayes, J.; Rodríguez-Alonso, R.; Collet, J.-F. Lipoproteins in Gram-negative bacteria: new insights into their biogenesis, subcellular targeting and functional roles. *Current Opinion in Microbiology* **2021**, *61*, 25–34, doi:10.1016/j.mib.2021.02.003.

39. Narita, S.; Tokuda, H. Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2017**, *1862*, 1414–1423, doi:10.1016/j.bbalip.2016.11.009.
40. Crane, J.M.; Randall, L.L. The Sec system: Protein export in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* **2017**, *7*, doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2017.
41. Shruthi, H.; Anand, P.; Murugan, V.; Sankaran, K. Twin Arginine Translocase pathway and fast-folding lipoprotein biosynthesis in *E. coli*: interesting implications and applications. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 999–1007, doi:10.1039/B916510J.
42. Konovalova, A.; Silhavy, T.J. Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2015**, *370*, 20150030, doi:10.1098/rstb.2015.0030.
43. Grabowicz, M. Lipoprotein transport: greasing the machines of outer membrane biogenesis. *BioEssays* **2018**, *40*, 1700187, doi:10.1002/bies.201700187.
44. Orfanoudaki, G.; Economou, A. Proteome-wide subcellular topologies of *E. coli* polypeptides database (STEPdb). *Mol Cell Proteomics* **2014**, *13*, 3674–3687, doi:10.1074/mcp.O114.041137.
45. Chatzi, K.E.; Sardis, M.F.; Economou, A.; Karamanou, S. SecA-mediated targeting and translocation of secretory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 1466–1474, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.02.014.
46. Cranford-Smith, T.; Huber, D. The way is the goal: how SecA transports proteins across the cytoplasmic membrane in bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **2018**, *365*, fny093, doi:10.1093/femsle/fny093.
47. Kusters, I.; Driessen, A.J.M. SecA, a remarkable nanomachine. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 2053–2066, doi:10.1007/s00018-011-0681-y.
48. Smets, D.; Loos, M.S.; Karamanou, S.; Economou, A. Protein transport across the bacterial plasma membrane by the Sec pathway. *Protein J* **2019**, *38*, 262–273, doi:10.1007/s10930-019-09841-8.
49. Koch, H.-G.; Moser, M.; Müller, M. Signal Recognition Particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **2003**, *146*:55-94, doi: 10.1007/s10254-002-0002-9.
50. Driessen, A.J.M.; Nouwen, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* **2008**, *77*, 643–667, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.160747.
51. Hegde, R.S.; Bernstein, H.D. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* **2006**, *31*, 563–571, doi:10.1016/j.tibs.2006.08.004.
52. Luirink, J.; Heijne, G. von; Houben, E.; Gier, J.-W. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology* **2005**, *59*, 329–355, doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121246.
53. Schibich, D.; Gloge, F.; Pöhner, I.; Björkholm, P.; Wade, R.C.; von Heijne, G.; Bukau, B.; Kramer, G. Global profiling of SRP interaction with nascent polypeptides. *Nature* **2016**, *536*, 219–223, doi:10.1038/nature19070.
54. Oswald, J.; Njenga, R.; Natriashvili, A.; Sarmah, P.; Koch, H.-G. The dynamic SecYEG translocon. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, doi:10.3389/fmolb.2021.664241.
55. Rawat, S.; Zhu, L.; Lindner, E.; Dalbey, R.E.; White, S.H. SecA drives transmembrane insertion of RodZ, an unusual single-span membrane protein. *Journal of Molecular Biology* **2015**, *427*, 1023–1037, doi:10.1016/j.jmb.2014.05.005.
56. Huber, D.; Jamshad, M.; Hanmer, R.; Schibich, D.; Döring, K.; Marcomini, I.; Kramer, G.; Bukau, B. SecA cotranslationally interacts with nascent substrate proteins *in vivo*. *Journal of Bacteriology* **2016**, *199*, doi:10.1128/jb.00622-16.
57. Steinberg, R.; Origi, A.; Natriashvili, A.; Sarmah, P.; Licheva, M.; Walker, P.M.; Kraft, C.; High, S.; Luirink, J.; Shi, W.Q.; Helmstädter, M.; Ulbrich, M.H.; Koch, H.G. Posttranslational Insertion of small membrane proteins by the bacterial signal recognition particle. *PLoS Biol* **2020**, *18*, e3000874, doi:10.1371/journal.pbio.3000874.

58. Walter, P.; Ibrahimi, I.; Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal Recognition Protein (SRP) binds to *in vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **1981**, *91*, 545–550, doi:10.1083/jcb.91.2.545.
59. Walter, P.; Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal Recognition Protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **1981**, *91*, 557–561, doi:10.1083/jcb.91.2.557.
60. Bahari, L.; Parlitz, R.; Eitan, A.; Stjepanovic, G.; Bochkareva, E.S.; Sinning, I.; Bibi, E. Membrane targeting of ribosomes and their release require distinct and separable functions of FtsY. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 32168–32175, doi:10.1074/jbc.M705429200.
61. Focia, P.J.; Shepotinovskaya, I.V.; Seidler, J.A.; Freymann, D.M. Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science* **2004**, *303*, 373–377, doi:10.1126/science.1090827.
62. Schulze, R.J.; Komar, J.; Botte, M.; Allen, W.J.; Whitehouse, S.; Gold, V.A.M.; Lycklama a Nijeholt, J.A.; Huard, K.; Berger, I.; Schaffitzel, C.; Collinson, I. Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holotranslocon SecYEG–SecDF–YajC–YidC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 4844–4849, doi:10.1073/pnas.1315901111.
63. Ambroziak, P.; Rzepka, I.; Skorko-Glonek, J. SecA - a multidomain and multitask bacterial export protein. *Acta Biochim Pol* **2021**, *68*, 427–436, doi:10.18388/abp.2020_5761.
64. Oliver, D.B.; Beckwith, J. *E. coli* mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins. *Cell* **1981**, *25*, 765–772, doi:10.1016/0092-8674(81)90184-7.
65. Oliver, D.B.; Beckwith, J. Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* **1982**, *30*, 311–319, doi:10.1016/0092-8674(82)90037-x.
66. Cabelli, R.J.; Dolan, K.M.; Qian, L.P.; Oliver, D.B. Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and SecA51(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 24420–24427.
67. Seinen, A.-B.; Spakman, D.; van Oijen, A.M.; Driessen, A.J.M. Cellular dynamics of the SecA ATPase at the single molecule level. *Sci Rep* **2021**, *11*, 1433, doi:10.1038/s41598-021-81081-2.
68. Pohlschröder, M.; Prinz, W.A.; Hartmann, E.; Beckwith, J. Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **1997**, *91*, 563–566, doi:10.1016/s0092-8674(00)80443-2.
69. Rapoport, T.A. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **2007**, *450*, 663–669, doi:10.1038/nature06384.
70. Baron, C. Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems. *Current Opinion in Microbiology* **2010**, *13*, 100–105, doi:10.1016/j.mib.2009.12.003.
71. Segers, K.; Anné, J. Traffic jam at the bacterial Sec translocase: targeting the SecA nanomotor by small-molecule inhibitors. *Chemistry & Biology* **2011**, *18*, 685–698, doi:10.1016/j.chembiol.2011.04.007.
72. Papanikolaou, Y.; Papadovasilaki, M.; Ravelli, R.B.G.; McCarthy, A.A.; Cusack, S.; Economou, A.; Petratos, K. Structure of dimeric SecA, the *Escherichia coli* preprotein translocase motor. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *366*, 1545–1557, doi:10.1016/j.jmb.2006.12.049.
73. Jamshad, M.; Knowles, T.J.; White, S.A.; Ward, D.G.; Mohammed, F.; Rahman, K.F.; Wynne, M.; Hughes, G.W.; Kramer, G.; Bukau, B.; Huber, D. The C-terminal tail of the bacterial translocation ATPase SecA modulates its activity. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.48385.
74. Yazdi, A.K.; Vezina, G.C.; Shilton, B.H. An alternate mode of oligomerization for *E. coli* SecA. *Sci Rep* **2017**, *7*, 11747, doi:10.1038/s41598-017-11648-5.

75. Khalili Yazdi, A.; Namjoshi, S.; Hackett, J.; Ghonaim, N.; Shilton, B.H. Characterization of a polypeptide-binding site in the DEAD motor of the SecA ATPase. *FEBS Letters* **2017**, *591*, 3378–3390, doi:10.1002/1873-3468.12832.
76. Or, E.; Boyd, D.; Gon, S.; Beckwith, J.; Rapoport, T. The bacterial ATPase SecA functions as a monomer in protein translocation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9097–9105, doi:10.1074/jbc.M413947200.
77. Na, B.; You, Z.; Yang, H.; Tai, P.C. Characterization of the minimal length of functional SecA in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *456*, 213–218, doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.061.
78. Koonin, E.V.; Gorbalenya, A.E. Autogenous translation regulation by *Escherichia coli* ATPase SecA may be mediated by an intrinsic RNA helicase activity of this protein. *FEBS Lett* **1992**, *298*, 6–8, doi:10.1016/0014-5793(92)80009-6.
79. Mitchell, C.; Oliver, D. Two distinct ATP-Binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 483–497, doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00921.x.
80. Zito, C.R.; Antony, E.; Hunt, J.F.; Oliver, D.B.; Hingorani, M.M. Role of a conserved glutamate residue in the *Escherichia coli* SecA ATPase mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 14611–14619, doi:10.1074/jbc.M414224200.
81. Das, S.; Grady, L.M.; Michtav, J.; Zhou, Y.; Cohan, F.M.; Hingorani, M.M.; Oliver, D.B. The variable subdomain of *Escherichia coli* SecA functions to regulate SecA ATPase activity and ADP release. *J Bacteriol* **2012**, *194*, 2205–2213, doi:10.1128/JB.00039-12.
82. Sianidis, G.; Karamanou, S.; Vrontou, E.; Boulias, K.; Repanas, K.; Kyripides, N.; Politou, A.S.; Economou, A. Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J* **2001**, *20*, 961–970, doi:10.1093/emboj/20.5.961.
83. Hunt, J.F.; Weinkauff, S.; Henry, L.; Fak, J.J.; McNicholas, P.; Oliver, D.B.; Deisenhofer, J. Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* **2002**, *297*, 2018–2026, doi:10.1126/science.1074424.
84. Bauer, B.W.; Rapoport, T.A. Mapping polypeptide interactions of the SecA ATPase during translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 20800–20805, doi:10.1073/pnas.0910550106.
85. Erlandson, K.J.; Miller, S.B.M.; Nam, Y.; Osborne, A.R.; Zimmer, J.; Rapoport, T.A. A role for the two-helix finger of the SecA ATPase in protein translocation. *Nature* **2008**, *455*, 984–987, doi:10.1038/nature07439.
86. Karamanou, S.; Vrontou, E.; Sianidis, G.; Baud, C.; Roos, T.; Kuhn, A.; Politou, A.S.; Economou, A. A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol Microbiol* **1999**, *34*, 1133–1145, doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01686.x.
87. Breukink, E.; Nouwen, N.; van Raalte, A.; Mizushima, S.; Tommassen, J.; de Kruijff, B. The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 7902–7907, doi:10.1074/jbc.270.14.7902.
88. Fekkes, P.; de Wit, J.G.; Boorsma, A.; Friesen, R.H.E.; Driessen, A.J.M. Zinc stabilizes the SecB binding site of SecA. *Biochemistry* **1999**, *38*, 5111–5116, doi:10.1021/bi982818r.
89. Matousek, W.M.; Alexandrescu, A.T. NMR structure of the C-terminal domain of SecA in the free state. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1702*, 163–171, doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.012.
90. Zhou, J.; Xu, Z. Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial protein translocation. *Nat Struct Biol* **2003**, *10*, 942–947, doi:10.1038/nsb980.
91. Cranford-Smith, T.; Jamshad, M.; Jeeves, M.; Chandler, R.A.; Yule, J.; Robinson, A.; Alam, F.; Dunne, K.A.; Aponte Angarita, E.H.; Alanazi, M.; Carter, C.; Henderson, I.R.; Lovett, J.E.; Winn, P.; Knowles, T.; Huber, D. Iron is a ligand of SecA-like Metal-Binding Domains *in vivo*. *J Biol Chem* **2020**, *295*, 7516–7528, doi:10.1074/jbc.RA120.012611.
92. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.;

- Kohl, S.A.A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstern, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589, doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
93. Varadi, M.; Bertoni, D.; Magana, P.; Paramval, U.; Pidruchna, I.; Radhakrishnan, M.; Tsenkov, M.; Nair, S.; Mirdita, M.; Yeo, J.; Kovalevskiy, O.; Tunyasuvunakool, K.; Laydon, A.; Židek, A.; Tomlinson, H.; Hariharan, D.; Abrahamson, J.; Green, T.; Jumper, J.; Birney, E.; Steinegger, M.; Hassabis, D.; Velankar, S. AlphaFold protein structure database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res* **2024**, *52*, D368–D375, doi:10.1093/nar/gkad1011.
 94. Del Val, C.; Bondar, A. N. Diversity and sequence motifs of the bacterial SecA protein motor. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2020**, *1862*, 183319, doi:10.1016/j.bbamem.2020.183319.
 95. Akita, M.; Shinkai, A.; Matsuyama, S.; Mizushima, S. SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *174*, 211–216, doi:10.1016/0006-291X(91)90507-4.
 96. Kusters, I.; van den Bogaart, G.; Kedrov, A.; Krasnikov, V.; Fulyani, F.; Poolman, B.; Driessen, A.J.M. Quaternary structure of SecA in solution and bound to SecYEG probed at the single molecule level. *Structure* **2011**, *19*, 430–439, doi:10.1016/j.str.2010.12.016.
 97. Gouridis, G.; Karamanou, S.; Sardis, M.F.; Schärer, M.A.; Capitani, G.; Economou, A. Quaternary dynamics of the SecA motor drive translocase catalysis. *Mol Cell* **2013**, *52*, 655–666, doi:10.1016/j.molcel.2013.10.036.
 98. Roussel, G.; White, S.H. Binding of SecA ATPase monomers and dimers to lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2020**, *1862*, 183112, doi:10.1016/j.bbamem.2019.183112.
 99. Benach, J.; Chou, Y.-T.; Fak, J.J.; Itkin, A.; Nicolae, D.D.; Smith, P.C.; Wittrock, G.; Floyd, D.L.; Golsaz, C.M.; Gierasch, L.M.; Hunt, JF. Phospholipid-induced monomerization and signal-peptide-induced oligomerization of SecA. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 3628–3638, doi:10.1074/jbc.M205992200.
 100. Musial-Siwiek, M.; Rusch, S.L.; Kendall, D.A. Probing the affinity of SecA for signal peptide in different environments. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13987–13996, doi:10.1021/bi050882k.
 101. Jilaveanu, L.B.; Zito, C.R.; Oliver, D. Dimeric SecA is essential for protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 7511–7516, doi:10.1073/pnas.0502774102.
 102. Gelis, I.; Bonvin, A.M.J.J.; Keramisanou, D.; Koukaki, M.; Gouridis, G.; Karamanou, S.; Economou, A.; Kalodimos, C.G. Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* **2007**, *131*, 756–769, doi:10.1016/j.cell.2007.09.039.
 103. Grady, L.M.; Michtavy, J.; Oliver, D.B. Characterization of the *Escherichia coli* SecA signal peptide-binding site. *J Bacteriol* **2012**, *194*, 307–316, doi:10.1128/JB.06150-11.
 104. Chatzi, K.E.; Sardis, M.F.; Tsirigotaki, A.; Koukaki, M.; Šoštarić, N.; Konijnenberg, A.; Sobott, F.; Kalodimos, C.G.; Karamanou, S.; Economou, A. Preprotein mature domains contain translocase targeting signals that are essential for secretion. *J Cell Biol* **2017**, *216*, 1357–1369, doi:10.1083/jcb.201609022.
 105. Kimura, E.; Akita, M.; Matsuyama, S.; Mizushima, S. Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 6600–6606.
 106. Gierasch, L.M. Signal sequences. *Biochemistry* **1989**, *28*, 923–930, doi:10.1021/bi00429a001.
 107. Zhang, Q.; Li, Y.; Olson, R.; Mukerji, I.; Oliver, D. Conserved SecA signal peptide-binding site revealed by engineered protein chimeras and Förster Resonance Energy Transfer. *Biochemistry* **2016**, *55*, 1291–1300, doi:10.1021/acs.biochem.5b01115.

108. Randall, L.L.; Crane, J.M.; Lilly, A.A.; Liu, G.; Mao, C.; Patel, C.N.; Hardy, S.J.S. Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export. *J Mol Biol* **2005**, *348*, 479–489, doi:10.1016/j.jmb.2005.02.036.
109. Suo, Y.; Hardy, S.J.S.; Randall, L.L. Orientation of SecA and SecB in complex, derived from disulfide cross-linking. *J Bacteriol* **2011**, *193*, 190–196, doi:10.1128/JB.00975-10.
110. Singh, R.; Kraft, C.; Jaiswal, R.; Sejwal, K.; Kasaragod, V.B.; Kuper, J.; Bürger, J.; Mielke, T.; Lührink, J.; Bhushan, S. Cryo-electron microscopic structure of SecA protein bound to the 70S ribosome. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 7190–7199, doi:10.1074/jbc.M113.506634.
111. Knüpfner, L.; Fehrenbach, C.; Denks, K.; Erichsen, V.; Petriman, N.-A.; Koch, H.-G. Molecular mimicry of SecA and signal recognition particle binding to the bacterial ribosome. *mBio* **2019**, *10*, doi:10.1128/mBio.01317-19.
112. Koch, S.; de Wit, J.G.; Vos, I.; Birkner, J.P.; Gordiichuk, P.; Herrmann, A.; van Oijen, A.M.; Driessen, A.J.M. Lipids activate SecA for high affinity binding to the SecYEG complex. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 22534–22543, doi:10.1074/jbc.M116.743831.
113. Ma, C.; Wu, X.; Sun, D.; Park, E.; Catipovic, M.A.; Rapoport, T.A.; Gao, N.; Li, L. Structure of the substrate-engaged SecA-SecY protein translocation machine. *Nat Commun* **2019**, *10*, 2872, doi:10.1038/s41467-019-10918-2.
114. Ernst, I.; Haase, M.; Ernst, S.; Yuan, S.; Kuhn, A.; Leptihn, S. Large conformational changes of a highly dynamic pre-protein binding domain in SecA. *Commun Biol* **2018**, *1*, 130, doi:10.1038/s42003-018-0133-4.
115. van der Wolk, J.P.; de Wit, J.G.; Driessen, A.J. The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J* **1997**, *16*, 7297–7304, doi:10.1093/emboj/16.24.7297.
116. Komarudin, A.G.; Driessen, A.J.M. SecA-mediated protein translocation through the SecYEG channel. *Microbiology Spectrum* **2019**, *7*, doi:10.1128/microbiolspec.PSIB-0028-2019.
117. Catipovic, M.A.; Bauer, B.W.; Loparo, J.J.; Rapoport, T.A. Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism. *EMBO J* **2019**, *38*, e101140, doi:10.15252/embj.2018101140.
118. Gupta, R.; Toptygin, D.; Kaiser, C.M. The SecA motor generates mechanical force during protein translocation. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3802, doi:10.1038/s41467-020-17561-2.
119. Wang, H.-W.; Chen, Y.; Yang, H.; Chen, X.; Duan, M.-X.; Tai, P.C.; Sui, S.-F. Ring-like pore structures of SecA: implication for bacterial protein-conducting channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 4221–4226, doi:10.1073/pnas.0737415100.
120. Hsieh, Y.; Zhang, H.; Wang, H.; Yang, H.; Jiang, C.; Sui, S.; Tai, P.C. Reconstitution of functionally efficient SecA-dependent protein-conducting channels: transformation of low-affinity SecA-liposome channels to high-affinity SecA-SecYEG-SecDF-YajC channels. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *431*, 388–392, doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.042.
121. Hsieh, Y.-H.; Huang, Y.-J.; Zhang, H.; Liu, Q.; Lu, Y.; Yang, H.; Houghton, J.; Jiang, C.; Sui, S.-F.; Tai, P.C. Dissecting structures and functions of SecA-only protein-conducting channels: ATPase, pore structure, ion channel activity, protein translocation, and interaction with SecYEG/SecDF-YajC. *PLoS One* **2017**, *12*, e0178307, doi:10.1371/journal.pone.0178307.
122. Nakatogawa, H.; Murakami, A.; Ito, K. Control of SecA and SecM translation by protein secretion. *Current Opinion in Microbiology* **2004**, *7*, 145–150, doi:10.1016/j.mib.2004.01.001.
123. Jack, R.L.; Sargent, F.; Berks, B.C.; Sawers, G.; Palmer, T. Constitutive expression of *Escherichia coli* Tat genes indicates an important role for the Twin-Arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *Journal of Bacteriology* **2001**, *183*, 1801–1804, doi:10.1128/JB.183.5.1801-1804.2001.

124. Downing, W.L.; Sullivan, S.L.; Gottesman, M.E.; Dennis, P.P. Sequence and transcriptional pattern of the essential *Escherichia coli* *secE-nusG* operon. *J Bacteriol* **1990**, *172*, 1621–1627, doi:10.1128/jb.172.3.1621-1627.1990.
125. Bernstein, H.D. The coupling of SecA expression to secretion efficiency by SecM-mediated translation arrest. In *Regulatory Nascent Polypeptides*; Ito, K., Ed.; Springer Japan: Tokyo, 2014; pp. 241–256 ISBN 978-4-431-55052-5.
126. Schmidt, M.O.; Brosh, R.M.; Oliver, D.B. *Escherichia coli* SecA helicase activity is not required *in vivo* for efficient protein translocation or autogenous regulation. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 37076–37085, doi:10.1074/jbc.M104584200.
127. Brown, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* **2000**, *22*, 283–297, doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040.
128. Waite, D.W.; Vanwonterghem, I.; Rinke, C.; Parks, D.H.; Zhang, Y.; Takai, K.; Sievert, S.M.; Simon, J.; Campbell, B.J.; Hanson, T.E.; Woyke, T.; Klotz, M. G.; Hugenholtz, P. Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (Phyl. Nov.). *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.00682.
129. Waite, D.W.; Chuvochina, M.S.; Hugenholtz, P. Road map of the phylum Campylobacterota. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, **2019**, pp. 1–11 ISBN 978-1-118-96060-8.
130. Zetterström, R. The Nobel Prize in 2005 for the discovery of *Helicobacter pylori*: implications for child health. *Acta Paediatrica* **2006**, *95*, 3–5, doi:10.1111/j.1651-2227.2006.tb02171.x.
131. Alm, R.A.; Ling, L.S.; Moir, D.T.; King, B.L.; Brown, E.D.; Doig, P.C.; Smith, D.R.; Noonan, B.; Guild, B.C.; deJonge, B.L.; Carmel, G.; Tummino, P. J.; Caruso, A.; Uriá-Nickelsen, M.; Mills, D. M.; Ives, C.; Gibson, R.; Merberg, D.; Mills, S. D.; Jiang, Q.; Taylor, D. E.; Vovis, G. F.; Trust, T. J. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **1999**, *397*, 176–180, doi:10.1038/16495.
132. Blattner, F.R.; Plunkett, G.; Bloch, C.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J.D.; Rode, C.K.; Mayhew, G.F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **1997**, *277*, 1453–1462, doi:10.1126/science.277.5331.1453.
133. Varon, C.; Azzi-Martin, L.; Khalid, S.; Seeneevassen, L.; Ménard, A.; Spuul, P. *Helicobacters* and cancer, not only gastric cancer? *Seminars in Cancer Biology* **2022**, *86*, 1138–1154, doi:10.1016/j.semcancer.2021.08.007.
134. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cancer, **1994**.
135. Baj, J.; Forma, A.; Sitarz, M.; Portincasa, P.; Garruti, G.; Krasowska, D.; Maciejewski, R. *Helicobacter pylori* virulence factors - mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells* **2021**, *10*, 27, doi:10.3390/cells10010027.
136. Ansari, S.; Yamaoka, Y. *Helicobacter pylori* virulence factors exploiting gastric colonization and its pathogenicity. *Toxins* **2019**, *11*, 677, doi:10.3390/toxins11110677.
137. Liechti, G.; Goldberg, J. Outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, and *Helicobacter pylori*: paradigm deviations in *H. pylori*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2012**, *2*.
138. Fischer, W. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion apparatus. *The FEBS Journal* **2011**, *278*, 1203–1212, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08036.x.
139. Anwari, K.; Webb, C.T.; Poggio, S.; Perry, A.J.; Belousoff, M.; Celik, N.; Ramm, G.; Lovering, A.; Sockett, R.E.; Smit, J.; et al. The evolution of new lipoprotein subunits of the bacterial outer membrane BAM complex. *Molecular Microbiology* **2012**, *84*, 832–844, doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08059.x.
140. McClain, M.S.; Voss, B.J.; Cover, T.L. Lipoprotein processing and sorting in *Helicobacter pylori*. *mBio* **2020**, *11*, 10.1128/mbio.00911-20, doi:10.1128/mbio.00911-20.

141. McClain, M.S.; Bryant, K.N.; McDonald, W.H.; Algood, H.M.S.; Cover, T.L. Identification of an essential LolD-like protein in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* **2023**, *205*, e00052-23, doi:10.1128/jb.00052-23.
142. Jaiman, D.; Persson, K. Structural and functional analysis of the *Helicobacter pylori* Lipoprotein chaperone LolA. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, doi:10.3389/fmicb.2024.1512451.
143. Smith, H.C.; May, K.L.; Grabowicz, M. Teasing apart the evolution of lipoprotein trafficking in Gram-negative bacteria reveals a bifunctional LolA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2023**, *120*, e2218473120, doi:10.1073/pnas.2218473120.
144. Zanotti, G.; Cendron, L. Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 715–723, doi:10.1002/iub.382.
145. Wen, Y.; Marcus, E.A.; Matrubutham, U.; Gleeson, M.A.; Scott, D.R.; Sachs, G. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **2003**, *71*, 5921–5939, doi:10.1128/iai.71.10.5921-5939.2003.
146. Ansari, S.; Yamaoka, Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter* **2017**, *22*, 10.1111/hel.12386, doi:10.1111/hel.12386.
147. Qu, W.; Zhou, Y.; Shao, C.; Sun, Y.; Zhang, Q.; Chen, C.; Jia, J. *Helicobacter pylori* proteins response to nitric oxide stress. *J Microbiol* **2009**, *47*, 486–493, doi:10.1007/s12275-008-0266-0.
148. Huang, C.-H.; Chiou, S.-H. Proteomic analysis of upregulated proteins in *Helicobacter pylori* under oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Kaohsiung J Med Sci* **2011**, *27*, 544–553, doi:10.1016/j.kjms.2011.06.019.
149. Olekhovich, I.N.; Vitko, S.; Valliere, M.; Hoffman, P.S. Response to metronidazole and oxidative stress is mediated through homeostatic regulator HsrA (HP1043) in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **2014**, *196*, 729–739, doi:10.1128/JB.01047-13.
150. Vannini, A.; Roncarati, D.; D'Agostino, F.; Antoniciello, F.; Scarlato, V. Insights into the orchestration of gene transcription regulators in *Helicobacter pylori*. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 13688, doi:10.3390/ijms232213688.
151. Roncarati, D.; Pinatel, E.; Fiore, E.; Peano, C.; Loibman, S.; Scarlato, V. *Helicobacter pylori* stress-response: definition of the HrcA regulon. *Microorganisms* **2019**, *7*, 436, doi:10.3390/microorganisms7100436.
152. Gaddy, J.A.; Haley, K.P. Metalloregulation of *Helicobacter pylori* physiology and pathogenesis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fmicb.2015.00911.
153. Mobley, H.L.T. Urease. In *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. ASM Press: Washington (DC), **2001** ISBN 978-1-55581-213-3.
154. Tomb, J.F.; White, O.; Kerlavage, A.R.; Clayton, R.A.; Sutton, G.G.; Fleischmann, R.D.; Ketchum, K.A.; Klenk, H.P.; Gill, S.; Dougherty, B.A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fitzgerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Hickey, E. K.; Berg, D. E.; Gocayne, J. D.; Utterback, T. R.; Peterson, J. D.; Kelley, J. M.; Cotton, M. D.; Weidman, J. M.; Fujii, C.; Bowman, C.; Watthey, L.; Wallin, E.; Hayes, W. S.; Borodovsky, M.; Karp, P. D.; Smith, H. O.; Fraser, C. M.; Venter, J. C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **1997**, *388*, 539–547, doi:10.1038/41483.
155. Flint, A.; Butcher, J.; Stintzi, A. Stress responses, adaptation, and virulence of bacterial pathogens during host gastrointestinal colonization. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*; John Wiley & Sons, Ltd, **2016**, 385–411 ISBN 978-1-68367-071-1.
156. Benov, L.T.; Fridovich, I. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 25310–25314.
157. Spiegelhalder, C.; Gerstenecker, B.; Kersten, A.; Schiltz, E.; Kist, M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun* **1993**, *61*, 5315–5325, doi:10.1128/iai.61.12.5315-5325.1993.
158. Pesci, E.C.; Pickett, C.L. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene* **1994**, *143*, 111–116, doi:10.1016/0378-1119(94)90614-9.

159. Windle, H.J.; Fox, A.; Ní Eidhin, D.; Kelleher, D. The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 5081–5089, doi:10.1074/jbc.275.7.5081.
160. McGee, D.J.; Kumar, S.; Viator, R.J.; Bolland, J.R.; Ruiz, J.; Spadafora, D.; Testerman, T.L.; Kelly, D.J.; Pannell, L.K.; Windle, H.J. *Helicobacter pylori* Thioredoxin is an arginase chaperone and guardian against oxidative and nitrosative stresses. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 3290–3296, doi:10.1074/jbc.M506139200.
161. Tomasek, D.; Kahne, D. The assembly of β -barrel outer membrane proteins. *Current Opinion in Microbiology* **2021**, *60*, 16–23, doi:10.1016/j.mib.2021.01.009.
162. Bocian-Ostrzycka, K.M.; Grzeszczuk, M.J.; Banaś, A.M.; Jagusztyn-Krynicka, E.K. Bacterial thiol oxidoreductases - from basic research to new antibacterial strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* **2017**, *101*, 3977–3989, doi:10.1007/s00253-017-8291-8.
163. Berkmen, M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **2012**, *82*, 240–251, doi:10.1016/j.pep.2011.10.009.
164. Ünal, C.M.; Steinert, M. Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2014**, *78*, 544–571, doi:10.1128/mmbr.00015-14.
165. Devlin, T.; Fleming, K.G. A Team of chaperones play to win in the bacterial periplasm. *Trends Biochem Sci* **2024**, *49*, 667–680, doi:10.1016/j.tibs.2024.03.015.
166. He, W.; Yu, G.; Li, T.; Bai, L.; Yang, Y.; Xue, Z.; Pang, Y.; Reichmann, D.; Hiller, S.; He, L.; Liu, M.; Quan, S. Chaperone Spy protects outer membrane proteins from folding stress via dynamic complex formation. *mBio* **2021**, *12*, 10.1128/mbio.02130-21, doi:10.1128/mbio.02130-21.
167. Ge, X.; Wang, R.; Ma, J.; Liu, Y.; Ezemaduka, A.N.; Chen, P.R.; Fu, X.; Chang, Z. DegP primarily functions as a protease for the biogenesis of β -barrel outer membrane proteins in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *The FEBS Journal* **2014**, *281*, 1226–1240, doi:10.1111/febs.12701.
168. Soltes, G.R.; Martin, N.R.; Park, E.; Sutterlin, H.A.; Silhavy, T.J. Distinctive roles for periplasmic proteases in the maintenance of essential outer membrane protein assembly. *Journal of Bacteriology* **2017**, *199*, 10.1128/jb.00418-17, doi:10.1128/jb.00418-17.
169. Sawa, J.; Malet, H.; Krojer, T.; Canellas, F.; Ehrmann, M.; Clausen, T. Molecular Adaptation of the DegQ Protease to exert protein quality control in the bacterial cell envelope. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 30680–30690, doi:10.1074/jbc.M111.243832.
170. Copley, S.D.; Novak, W.R.P.; Babbitt, P.C. Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13981–13995, doi:10.1021/bi048947r.
171. Kaakoush, N.O.; Kovach, Z.; Mendz, G.L. Potential role of thiol:disulfide oxidoreductases in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2007**, *50*, 177–183, doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00259.x.
172. Basak, C.; Pathak, S.K.; Bhattacharyya, A.; Pathak, S.; Basu, J.; Kundu, M. The secreted peptidyl prolyl cis,trans -isomerase HP0175 of *Helicobacter pylori* induces apoptosis of gastric epithelial cells in a TLR4- and apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent manner. *J Immunol* **2005**, *174*, 5672–5680, doi:10.4049/jimmunol.174.9.5672.
173. Kale, A.; Phansopa, C.; Suwannachart, C.; Craven, C.J.; Rafferty, J.B.; Kelly, D.J. The virulence factor PEB4 (Cj0596) and the periplasmic protein Cj1289 are two structurally related SurA-like chaperones in the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 21254–21265, doi:10.1074/jbc.M111.220442.
174. Zarzecka, U.; Harrer, A.; Zawilak-Pawlik, A.; Skorko-Glonek, J.; Backert, S. Chaperone activity of serine protease HtrA of *Helicobacter pylori* as a crucial survival factor under stress conditions. *Cell Commun. Signal* **2019**, *17*, 161, doi:10.1186/s12964-019-0481-9.
175. Olofsson, A.; Vallström, A.; Petzold, K.; Tegtmeyer, N.; Schleucher, J.; Carlsson, S.; Haas, R.; Backert, S.; Wai, S.N.; Gröbner, G.; Arnqvist, A. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Molecular Microbiology* **2010**, *77*, 1539–1555, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x.

176. Hoy, B.; Löwer, M.; Weydig, C.; Carra, G.; Tegtmeyer, N.; Geppert, T.; Schröder, P.; Sewald, N.; Backert, S.; Schneider, G.; Wessler, S. *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves e-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO reports* **2010**, *11*, 798–804, doi:10.1038/embor.2010.114.
177. Tegtmeyer, N.; Wessler, S.; Necchi, V.; Rohde, M.; Harrer, A.; Rau, T.T.; Asche, C.I.; Boehm, M.; Loessner, H.; Figueiredo, C.; Naumann, M.; Palmisano, R.; Solcia, E.; Ricci, V.; Backert, S. *Helicobacter pylori* employs a unique basolateral Type IV Secretion mechanism for CagA delivery. *Cell Host & Microbe* **2017**, *22*, 552–560.e5, doi:10.1016/j.chom.2017.09.005.
178. Bernegger, S.; Vidmar, R.; Fonovic, M.; Posselt, G.; Turk, B.; Wessler, S. Identification of desmoglein-2 as a novel target of *Helicobacter pylori* HtrA in epithelial cells. *Cell Commun Signal* **2021**, *19*, 108, doi:10.1186/s12964-021-00788-x.
179. Harrer, A.; Boehm, M.; Backert, S.; Tegtmeyer, N. Overexpression of serine protease HtrA enhances disruption of adherens junctions, paracellular transmigration and Type IV Secretion of CagA by *Helicobacter pylori*. *Gut Pathog* **2017**, *9*, doi:10.1186/s13099-017-0189-6.
180. Zawilak-Pawlik, A.; Zarzecka, U.; Żyła-Uklejewicz, D.; Lach, J.; Strapagiel, D.; Tegtmeyer, N.; Böhm, M.; Backert, S.; Skorko-Glonek, J. Establishment of serine protease *htrA* mutants in *Helicobacter pylori* is associated with *secA* mutations. *Scientific Reports* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-48030-6.
181. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580, doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8.
182. Ferrero, R.L.; Cussac, V.; Courcoux, P.; Labigne, A. Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol* **1992**, *174*, 4212–4217, doi:10.1128/jb.174.13.4212-4217.1992.
183. Donczew, R.; Makowski, Ł.; Jaworski, P.; Bezulska, M.; Nowaczyk, M.; Zakrzewska-Czerwińska, J.; Zawilak-Pawlik, A. The atypical response regulator HP1021 controls formation of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex. *Molecular Microbiology* **2015**, *95*, 297–312, doi:10.1111/mmi.12866.
184. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. T. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* **2009**, *55*, 611–622, doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
185. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, e45–e45, doi:10.1093/nar/29.9.e45.
186. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36, doi:10.1093/nar/30.9.e36.
187. Chen, X.; Nomani, A.; Patel, N.; Hatefi, A. Production of low-expressing recombinant cationic biopolymers with high purity. *Protein Expr Purif* **2017**, *134*, 11–17, doi:10.1016/j.pep.2017.03.012.
188. Greenfield, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 2876–2890, doi:10.1038/nprot.2006.202.
189. Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2005**, *1751*, 119–139, doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
190. Garbett, N.C.; Mekmaysy, C.S.; Chaires, J.B. Sedimentation velocity ultracentrifugation analysis for hydrodynamic characterization of g-quadruplex structures. *Methods Mol Biol* **2010**, *608*, 97–120, doi:10.1007/978-1-59745-363-9_7.
191. Floyd, J.H.; You, Z.; Hsieh, Y.-H.; Ma, Y.; Yang, H.; Tai, P.C. The dispensability and requirement of SecA N-terminal aminoacyl residues for complementation, membrane binding, lipid-specific domains and channel activities. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *453*, 138–142, doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.080.

192. Lill, R.; Dowhan, W.; Wickner, W. The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **1990**, *60*, 271–280, doi:10.1016/0092-8674(90)90742-w.
193. Gold, V.A.M.; Whitehouse, S.; Robson, A.; Collinson, I. The dynamic action of SecA during the initiation of protein translocation. *Biochem J* **2013**, *449*, 695–705, doi:10.1042/BJ20121314.
194. Yeasmin, T.; Carroll, S.C.; Hawtof, D.J.; Sutherland, M.C. *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* bacterial holocytochrome c synthase structure-function analysis reveals conservation of heme binding. *Commun Biol* **2024**, *7*, 984, doi:10.1038/s42003-024-06688-3.
195. Tegtmeyer, N.; Moodley, Y.; Yamaoka, Y.; Pernitzsch, S.R.; Schmidt, V.; Traverso, F.R.; Schmidt, T.P.; Rad, R.; Yeoh, K.G.; Bow, H.; Torres, J.; Gerhard, M.; Schneider, G.; Wessler, S.; Backert, S. Characterisation of worldwide *Helicobacter pylori* strains reveals genetic conservation and essentiality of serine protease HtrA. *Molecular Microbiology* **2016**, *99*, 925–944, doi:10.1111/mmi.13276.
196. Suzuki, H.; Kumagai, H. Autocatalytic processing of gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 43536–43543, doi:10.1074/jbc.M207680200.
197. Zarzecka, U.; Repetto, O.; Ambroziak, P.; Bielecka, M.; Czaplewska, P.; Mruk, I.; Musiał, N.; Figaj, D.; Roncarati, D.; Diechler, S.; De Re, V.; Wessler, S.; Godlewska, R.; Skorko-Glonek, J. The function of the HtrA protease in maintaining homeostasis of the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Microbial Pathogenesis* **2025**, *208*, 107979, doi:10.1016/j.micpath.2025.107979.
198. Chaudhary, A.S.; Chen, W.; Jin, J.; Tai, P.C.; Wang, B. SecA: a potential antimicrobial target. *Future Med Chem* **2015**, *7*, 989–1007, doi:10.4155/fmc.15.42.
199. Roussel, G.; Lindner, E.; White, S.H. Stabilization of SecA ATPase by the primary cytoplasmic salt of *Escherichia coli*. *Protein Sci* **2019**, *28*, 984–989, doi:10.1002/pro.3619.
200. Driessen, A.J. SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is functional as a dimer. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13190–13197, doi:10.1021/bi00211a030.
201. Cunningham, K.; Wickner, W. Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86*, 8630–8634, doi:10.1073/pnas.86.22.8630.
202. Miller, A.; Wang, L.; Kendall, D.A. Synthetic signal peptides specifically recognize SecA and stimulate ATPase activity in the absence of preprotein. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 11409–11412, doi:10.1074/jbc.273.19.11409.
203. Robson, A.; Gold, V.A.M.; Hodson, S.; Clarke, A.R.; Collinson, I. Energy transduction in protein transport and the ATP hydrolytic cycle of SecA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 5111–5116, doi:10.1073/pnas.0809592106.
204. Koch, S.; Exterkate, M.; López, C.A.; Patro, M.; Marrink, S.J.; Driessen, A.J.M. Two distinct anionic phospholipid-dependent events involved in SecA-mediated protein translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861*, 183035, doi:10.1016/j.bbamem.2019.183035.
205. Huber, M.; Faure, G.; Laass, S.; Kolbe, E.; Seitz, K.; Wehrheim, C.; Wolf, Y.I.; Koonin, E.V.; Soppa, J. Translational coupling via termination-reinitiation in archaea and bacteria. *Nat Commun* **2019**, *10*, 4006, doi:10.1038/s41467-019-11999-9.
206. Qureshi, N.N.; Gallaher, B.; Schiller, N.L. Evolution of amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori* in vitro: Characterization of resistance mechanisms. *Microbial Drug Resistance* **2014**, *20*, 509–516, doi:10.1089/mdr.2014.0019.
207. Trunk, T.; Khalil, H.S.; Leo, J.C. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol* **2018**, *4*, 140–164, doi:10.3934/microbiol.2018.1.140.
208. Nwoko, E.Q.A.; Okeke, I.N. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. *Biochem Soc Trans* **2021**, *49*, 1147–1157, doi:10.1042/BST20200718.

209. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **2003**, *67*, 593–656, doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
210. Rajagopal, S.; Eis, N.; Bhattacharya, M.; Nickerson, K.W. Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential for Sodium Dodecyl Sulfate resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **2003**, *223*, 25–31, doi:10.1016/S0378-1097(03)00323-9.
211. Brodersen, D.E.; Clemons, W.M.; Carter, A.P.; Morgan-Warren, R.J.; Wimberly, B.T.; Ramakrishnan, V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **2000**, *103*, 1143–1154, doi:10.1016/S0092-8674(00)00216-6.
212. Blake, K.S.; Xue, Y.-P.; Gillespie, V.J.; Fishbein, S.R.S.; Tolia, N.H.; Wenciewicz, T.A.; Dantas, G. The tetracycline resistome is shaped by selection for specific resistance mechanisms by each antibiotic generation. *Nat Commun* **2025**, *16*, 1452, doi:10.1038/s41467-025-56425-5.
213. Mortimer, P.G.S.; Piddok, L.J.V. The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **1993**, *32*, 195–213, doi:10.1093/jac/32.2.195.
214. Grossman, T.H. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2016**, *6*, a025387, doi:10.1101/cshperspect.a025387.
215. Saini, M.; Kashyap, A.; Bindal, S.; Saini, K.; Gupta, R. Bacterial gamma-glutamyl transpeptidase, an emerging biocatalyst: insights into structure–function relationship and its biotechnological applications. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 641251, doi:10.3389/fmicb.2021.641251.
216. Liu, Y.; Fu, X.; Shen, J.; Zhang, H.; Hong, W.; Chang, Z. Periplasmic proteins of *Escherichia coli* are highly resistant to aggregation: reappraisal for roles of molecular chaperones in periplasm. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *316*, 795–801, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.125.
217. Combs, A.N.; Silhavy, T.J. Periplasmic chaperones: outer membrane biogenesis and envelope stress. *Annual Review of Microbiology* **2024**, *78*, 191–211, doi:10.1146/annurev-micro-041522-102901.
218. Clausen, T.; Southan, C.; Ehrmann, M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 443–455.
219. Jarzab, M.; Skorko-Glonek, J. There are no insurmountable barriers: passage of the *Helicobacter pylori* VacA toxin from bacterial cytoplasm to eukaryotic cell organelle. *Membranes* **2024**, *14*, 11, doi:10.3390/membranes14010011.
220. Hatakeyama, M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **2017**, *93*, 196–219, doi:10.2183/pjab.93.013.
221. Loh, J.T.; Torres, V.J.; Cover, T.L. Regulation of *Helicobacter pylori* cagA expression in response to salt. *Cancer Res* **2007**, *67*, 4709–4715, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4746.
222. Karita, M.; Tummuru, M.K.; Wirth, H.P.; Blaser, M.J. Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* cagA expression. *Infect Immun* **1996**, *64*, 4501–4507, doi:10.1128/iai.64.11.4501-4507.1996.
223. Zhao, Y.; Zhou, Y.; Sun, Y.; Yu, A.; Yu, H.; Li, W.; Liu, Z.; Zeng, J.; Li, X.; Chen, C.; Jihui, J. Virulence factor Cytotoxin-Associated gene A in *Helicobacter pylori* is downregulated by interferon- γ *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2011**, *61*, 76–83, doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00750.x.
224. Grabowicz, M.; Silhavy, T.J. Envelope stress responses: an interconnected safety net. *Trends Biochem Sci* **2017**, *42*, 232–242, doi:10.1016/j.tibs.2016.10.002.
225. Cho, T.H.S.; Pick, K.; Raivio, T.L. Bacterial envelope stress responses: essential adaptors and attractive targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2023**, *1870*, 119387, doi:10.1016/j.bbamcr.2022.119387.
226. Spöring, I.; Felgner, S.; Preuße, M.; Eckweiler, D.; Rohde, M.; Häussler, S.; Weiss, S.; Erhardt, M. Regulation of flagellum biosynthesis in response to cell envelope stress in

- Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio* **2018**, 9, 10.1128/mbio.00736-17, doi:10.1128/mbio.00736-17.
227. Leiser, O.P.; Charlson, E.S.; Gerken, H.; Misra, R. Reversal of the $\Delta degP$ phenotypes by a novel *rpoE* allele of *Escherichia coli*. *PLOS ONE* **2012**, 7, e33979, doi:10.1371/journal.pone.0033979.
 228. Shabala, L.; Bowman, J.; Brown, J.; Ross, T.; McMeekin, T.; Shabala, S. Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotic. *Environ. Microbiol.* **2009**, 11, 137–148, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01748.x.
 229. De Oliveira, M.V.V.; Intorne, A.C.; Vespoli, L. de S.; Madureira, H.C.; Leandro, M.R.; Pereira, T.N.S.; Olivares, F.L.; Berbert-Molina, M.A.; De Souza Filho, G.A. Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Arch Microbiol* **2016**, 198, 287–294, doi:10.1007/s00203-015-1176-2.
 230. Guiral, M.; Neitzel, C.; Salvador Castell, M.; Martinez, N.; Giudici-Orticoni, M.T.; Peters, J. The effect of pH on the dynamics of natural membranes. *Eur. Phys. J. E* **2018**, 41, 22, doi:10.1140/epje/i2018-11630-y.
 231. Ades, S.E. Control of the alternative sigma factor σ^E in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology* **2004**, 7, 157–162, doi:10.1016/j.mib.2004.02.010.
 232. Cao, H.; Wei, D.; Yang, Y.; Shang, Y.; Li, G.; Zhou, Y.; Ma, Q.; Xu, Y. Systems-level understanding of ethanol-induced stresses and adaptation in *E. coli*. *Sci Rep* **2017**, 7, 44150, doi:10.1038/srep44150.
 233. Sachs, G.; Weeks, D.L.; Wen, Y.; Marcus, E.A.; Scott, D.R.; Melchers, K. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology* **2005**, 20, 429–438, doi:10.1152/physiol.00032.2005.
 234. Yang, C.-K.; Lu, C.-D.; Tai, P.C. Differential expression of secretion machinery during bacterial growth: SecY and SecF decrease while SecA increases during transition from exponential phase to stationary phase. *Curr Microbiol* **2013**, 67, 682–687, doi:10.1007/s00284-013-0421-7.
 235. Jaishankar, J.; Srivastava, P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Front Microbiol* **2017**, 8, 2000, doi:10.3389/fmicb.2017.02000.
 236. Berg, B. van den; Clemons, W.M.; Collinson, I.; Modis, Y.; Hartmann, E.; Harrison, S.C.; Rapoport, T.A. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **2004**, 427, 36–44, doi:10.1038/nature02218.
 237. du Plessis, D.J.F.; Nouwen, N.; Driessen, A.J.M. The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, 1808, 851–865, doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.016.
 238. Belin, D.; Plaia, G.; Boulfekhar, Y.; Silva, F. *Escherichia coli* SecG is required for residual export mediated by mutant signal sequences and for SecY-SecE complex stability. *Journal of Bacteriology* **2015**, 197, 542–552, doi:10.1128/jb.02136-14.
 239. Lin, B.-R.; Hsieh, Y.-H.; Jiang, C.; Tai, P.C. *Escherichia coli* membranes depleted of SecYEG elicit SecA-dependent ion-channel activity but lose signal peptide specificity. *J Membrane Biol* **2012**, 245, 747–757, doi:10.1007/s00232-012-9477-8.