

**„Translokon SEC jako mediator odpowiedzi komórki
na zaburzenie pozacytoplazmatycznej homeostazy u bakterii *Helicobacter pylori*”
mgr Patrycja Ambroziak**

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 własności 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-kończącą 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 translokonu 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 translokonu 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.