



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Jakub Mikołaj Skibiński

Praca doktorska:

**Identyfikacja niskocząsteczkowych
związków hamujących aktywność
wybranych enzymów zaangażowanych
w metabolizm RNA u *Helicobacter pylori***

Doctoral thesis:

**Identification of low-molecular-weight
compounds inhibiting the activity of
selected enzymes involved in RNA
metabolism in *Helicobacter pylori***

□ Promotor/Supervisor

prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Podziękowania

„Ci, którzy tylko żyją, w rzeczywistości tylko umierają.”

~ Susanne Sundfør

Dziękuję,

*rodzinie, przyjaciołom i bliskim
za słowa, motywacje i wsparcie.*

*Pani Promotor prof. dr hab. Magdalenie Mikołajczyk-Chmieli
oraz dr hab. Przemysławowi Płocińskiemu, Prof. UŁ
za naukę i możliwość realizacji celów badawczych.*

*Pracownikom i doktorantom
Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydziału BIOŚ,
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN,
Pracowni Białek i Kwasów Nukleinowych Wydziału UG,
za wszelką pomoc przy realizacji tej pracy.*

Finansowanie

Praca Doktorska była realizowana w ramach grantu

Narodowego Centrum Nauki „SONATA BIS 9”

pt., „Badania strukturalne udziału degradosomu RNA w trans-translacji w świetle przeciwbakteryjnej aktywności pirazynamidu - perspektywy wynalezienia leków przeciw(myko)bakteryjnych”

Numer projektu 2019/34/E/NZ1/00338

Kierownik projektu - dr hab. Przemysław Płociński, Prof. UŁ



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

oraz w ramach

Konkursu Grantowego Uniwersytetu Łódzkiego

Doktoranckie Granty Badawcze IDUB edycja 2023

"Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza" - ogólnopolski program realizowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Ministerstwo Edukacji i Nauki, mający na celu wsparcie wybranych uczelni w dążeniu do międzynarodowej doskonałości naukowej.

pt. „Identyfikacja funkcji białka PapS u *Helicobacter pylori* w metabolizmie tRNA”

kierownik projektu - mgr Jakub Skibiński

Współpraca naukowa

Praca doktorska została zrealizowana w ramach współpracy naukowej z następującymi jednostkami badawczymi:

- Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium (Kierownik prof. dr. hab Jarosław Dziadek)



- Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej, Pracownia Biochemii Białek i Kwasów Nukleinowych (Kierownik prof. dr hab. Joanna Skórko-Głonek) w ramach stażu naukowego pod opieką dr Urszuli Zarzeckiej



- Grupa Biologii Strukturalnej, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (Kierownik dr hab. Maria Górna), pod opieką dr Katarzyny Bandyry, z wewnętrzną współpracą z Centrum Nowych Technologii UW, z dr Tomaszem Góralem.



Wykaz skrótów

¹³C (13C) - izotop węgla-13
AD - aktywność degradacyjna (w testach PNP)
ADP - adenozy-no-5'-difosforan (ang. *adenosine diphosphate*)
AmpR - oporność na ampicylinę (ang. *ampicillin resistance*)
ANOVA - analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
AP - aktywność polimeryzacyjna (w testach PNP)
APS - nadsiarczan amonu (ang. *ammonium persulfate*)
ATP - adenozy-no-5'-trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)
BB - Brucella Broth (bulion Brucella)
BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*
BSA - albumina surowicy bydłowej (ang. *bovine serum albumin*)
CagA - białko CagA (ang. *cytotoxin-associated gene A*)
cagA - gen *cagA* (kodujący CagA)
CCA - sekwencja CCA na końcu 3' tRNA
CFU - jednostki tworzące kolonie (ang. *colony forming units*)
CI - przedział ufności (ang. *confidence interval*)
CTP - cytydino-5'-trifosforan (ang. *cytidine triphosphate*)
CryoEM - mikroskopia krio-elektronowa (ang. *cryo-electron microscopy*)
DEAD - motyw Asp-Glu-Ala-Asp (helikazy DEAD-box)
DMSO - dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)
DTT - ditiotreitol (ang. *dithiothreitol*)
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy / kwas wersenowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
ELISA - test immunoenzymatyczny fazy stałej (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
FAM - barwnik fluorescencyjny FAM (6-carboxyfluorescein)
FBS - surowica płodów bydłych (ang. *fetal bovine serum*)
FDR - odsetek fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*)
FPLC - chromatografia białek FPLC (ang. *fast protein liquid chromatography*)
GC - agar GC (ang. *gonococcal agar*)
GTP - guanozy-no-5'-trifosforan (ang. *guanosine triphosphate*)
HindIII - endonukleaza restrykcyjna HindIII
HLO - organizmy *Helicobacter*-podobne (ang. *Helicobacter-like organisms*)
Hsp - białko szoku cieplnego (ang. *heat shock protein*)
HtrA - proteaza HtrA (ang. *high-temperature requirement A*)
IgG - immunoglobulina klasy G
IgM - immunoglobulina klasy M
IL-1 - interleukina 1
IL-8 - interleukina 8
IL-33 - interleukina 33
IMAC - chromatografia metalopowinowactwa (ang. *immobilized metal affinity chromatography*)
IEX - chromatografia jonowymienna (ang. *ion exchange chromatography*)
IPTG - izopropyl-β-D-1-tiogalakto(pirano)zyd (standardowo: izopropyl β-D-1-tiogalaktopiranozyd)
IPP - inhibitor pompy protonowej
KanR - oporność na kanamycynę (ang. *kanamycin resistance*)
Kd - stała dysocjacji (ang. *dissociation constant*)
kDa - kilodalton
LB - podłoże Luria-Bertani
LPS - lipopolisacharyd (ang. *lipopolysaccharide*)
MALT - tkanka limfatyczna związana z błoną śluzową (ang. *mucosa-associated lymphoid tissue*)
MBp - Megapar zasad (10⁶ par zasad DNA)
MIC - minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*)
MnCl₂ - chlorek manganu(II)
MgCl₂ - chlorek magnezu
MgSO₄ - siarczan magnezu

MOPS - kwas 3-(N-morfolino) propanosulfonowy
MRSA - metycylinooporny *Staphylococcus aureus* (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)
MST - termoforeza mikroskalarna (ang. *microscale thermophoresis*)
MWCO - graniczna masa odcięcia membrany (ang. *molecular weight cut-off*)
NaCl - chlorek sodu
NaOH / KOH - wodorotlenek sodu
KOH - wodorotlenek potasu
NCI - Narodowy Instytut Nowotworów USA (ang. *National Cancer Institute*)
NGS - sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*)
NK - komórki NK (naturalne komórki zabijające) (ang. *natural killer cells*)
NTP - trifosforany rybonukleozydów (mieszanina)
OD₆₀₀ (OD600) - gęstość optyczna przy 600 nm
OMP - białka błony zewnętrznej (ang. *outer membrane proteins*)
ORF - otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)
PAP - poli(A)polimeraza (ang. *poly(A) polymerase*)
PBS - buforowany fosforanami roztwór soli (ang. *phosphate-buffered saline*)
PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
PNP / PNPaza - fosforylaza polinukleotydowa (ang. *polynucleotide phosphorylase*)
qPCR - ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time PCR*)
RNA - kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)
RNA-seq - sekwencjonowanie RNA (ang. *RNA sequencing*)
ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)
RRM - motyw rozpoznawania RNA (ang. *RNA recognition motif*)
rRNA - rybosomalny RNA (ang. *ribosomal RNA*)
mRNA - informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*)
tRNA - transportujący RNA (ang. *transfer RNA*)
SabA - adhezyna wiążąca kwas sialowy (ang. *sialic acid-binding adhesin*)
SDS - dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE - elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym z SDS (ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gell electrophoresis*)
SEC - chromatografia wykluczeniowa (ang. *size exclusion chromatography*)
SLIC - klonowanie niezależne od ligacji (ang. *sequence and ligation independent cloning*)
SOC - podłoże SOC (ang. *Super Optimal broth with Catabolite repression*)
ssDNA - jednoniciowy DNA (ang. *single-stranded DNA*)
ssRNA - jednoniciowy RNA (ang. *single-stranded RNA*)
TAE - bufor Tris-octan-EDTA (ang. *Tris-acetate-EDTA*)
TBE - bufor Tris-boran-EDTA (ang. *Tris-borate-EDTA*)
TBS - bufor Tris z solą fizjologiczną (ang. *Tris-buffered saline*)
TBST - roztwór soli buforowany Tris z dodatkiem Tween-20 (ang. *Tris-buffered saline with Tween 20*)
TCEP - tris(2-karboksyetylo)fosfina (ang. *tris(2-carboxyethyl)phosphine*)
TEMED - tetrametyloetylenodiamina (ang. *tetramethylethylenediamine*)
TMB - 3,3',5,5'-tetrametylobenzydina (substrat HRP)
T4SS - system sekrecji typu IV (ang. *type IV secretion system*)
Tris - tris(hydroksymetylo)aminometan
UREA-PAGE - denaturująca elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z mocznikiem
UTP - urydyno-5'-trifosforan (ang. *uridine triphosphate*)
UV / UV-C - promieniowanie ultrafioletowe / promieniowanie UV-C
VacA - toksyna VacA (ang. *vacuolating cytotoxin A*)
vacA - gen *vacA* (kodujący toksynę VacA)
VBNC - stan żywych, lecz niehodowalnych komórek (ang. *viable but non-culturable*)
VRE - enterokoki oporne na wankomycynę (ang. *vancomycin-resistant enterococci*)
WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)
WT - typ dziki (ang. *wild type*)

Spis treści

1.	Wstęp.....	10
1.1	Charakterystyka <i>Helicobacter pylori</i>	10
1.2	Morfologia	11
1.3	Kolonizacja i najważniejsze czynniki wirulencji	13
1.4	Diagnostyka i leczenie	17
1.5	Problem narastającej lekooporności	18
1.6	Charakterystyka genomu <i>H. pylori</i>	19
2.	Kompleks degradosomu RNA	21
2.1	Degradosom <i>H. pylori</i>	25
2.1.1	Helikaza RhpA	25
2.1.2	RNaza J	27
2.1.3	Fosforylaza polinukleotydowa	27
2.1.4	RNaza Y	30
2.1.5	RNaza R	30
2.1.6	Pozostałe elementy degradosomu <i>H. pylori</i>	31
2.2	Nukleotydylotransferazy związane z metabolizmem tRNA	32
2.2.1	Oddziaływanie nukleotydylotransferaz tRNA z komponentami degradosomu.....	33
3.	Cel pracy.....	35
4.	Materiały.....	36
4.1	Szczepy bakteryjne.....	36
4.2	Spis oligonukleotydów syntetycznych wykorzystanych w amplifikacji DNA	37
4.3	Inne oligonukleotydy syntetyczne.....	38
4.4	Wektory plazmidowe	38
4.5	Enzymy oraz enzymy restrykcyjne	39
4.6	Bufory i roztwory	39
4.6.1	Bufory do elektroforezy	39
4.6.2	Bufory do trawień restrykcyjnych	40
4.6.3	Bufory do oczyszczania białek rekombinowanych	40
4.6.4	Bufory reakcyjne do oznaczania aktywności polimerazowej i degradacyjnej białka PNP	42
4.6.5	Bufory do metody Western-Blotting	42
4.6.6	Pozostałe bufory i roztwory.....	43
4.7	Żele do rozdziału elektroforetycznego	44
4.8	Mieszaniny reakcyjne.....	45
4.8.1	Trawienia restrykcyjne.....	45
4.8.2	Reakcje PCR	45
4.8.3	Reakcje poliadenylacji i degradacji UREA-PAGE	45
4.8.4	Reakcje polimeryzacji i degradacji <i>in vitro</i>	46
4.9	Standardy wielkości	46
4.10	Podłoża mikrobiologiczne.....	46
4.10.1	Suplementy do podłoży mikrobiologicznych	48
4.11	Komercyjne zestawy odczynnikowe o zdefiniowanym składzie	48
4.12	Odczynniki chemiczne	49

4.13	Przeciwciała	51
4.14	Pozostałe materiały	51
4.15	Aparatura badawcza.....	51
5.	Metody	53
5.1	Hodowle bakteryjne.....	53
5.1.1	Hodowla <i>E. coli</i>	53
5.1.2	Hodowla <i>H. pylori</i>	53
5.1.3	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i>	53
5.1.4	Transformacja naturalna <i>H. pylori</i> w celu uzyskania szczepów delecyjnych	54
5.2	Techniki laboratoryjne wykorzystywane do pracy z DNA	54
5.2.1	Izolacja genomowego DNA <i>H. pylori</i>	54
5.2.2	Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR	55
5.2.3	Izolacja plazmidowego DNA.....	56
5.2.4	Oczyszczanie fragmentów DNA powielonych w reakcji PCR	56
5.2.5	Trawienie restrykcyjne DNA plazmidowego.....	56
5.2.6	Elucja DNA z żelu agarazowego	56
5.2.7	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	57
5.2.8	Ligacja DNA.....	57
5.2.9	Sekwencjonowanie DNA.....	57
5.2.10	Precypitacja DNA metodą etanolową	57
5.2.11	Analiza ilościowa DNA i/lub RNA.....	58
5.2.12	Przygotowanie konstruktów genetycznych do otrzymania szczepów delecyjnych <i>H. pylori</i>	58
5.2.13	Przygotowanie konstruktów genetycznych do przywrócenia funkcjonalności genu <i>pnp</i> szczepu delecyjnego <i>H. pylori</i> G27 Δpnp	60
5.3	Techniki laboratoryjne stosowane w procedurach doświadczalnych w pracy z RNA	60
5.3.1	Izolacja całkowitego RNA <i>H. pylori</i>	60
5.3.2	Oczyszczanie wyizolowanego RNA	61
5.3.3	Usuwanie rybosomalnego RNA.....	61
5.3.4	Przygotowywanie bibliotek RNA/cDNA do sekwencjonowania RNA-seq.....	62
5.3.5	Sekwencjonowanie RNA (RNAseq).....	62
5.4	Techniki laboratoryjne zastosowane do produkcji, oczyszczania i badania właściwości wytworzonych białek rekombinowanych.....	63
5.4.1	Przygotowanie wektorów plazmidowych do wytwarzania białek rekombinowanych	63
5.4.2	Transformacja bakteryjna metodą szoku cieplnego	64
5.4.3	Próba indukcja białek rekombinowanych	64
5.4.4	Rozdział elektroforetyczny białek metodą SDS-PAGE.....	65
5.4.5	Hodowla szczepu <i>E. coli</i> One Shot™ BL21 Star™ (DE3) w celu nadprodukcji białek rekombinowanych	65
5.5	Oczyszczanie białek rekombinowanych	66
5.5.1	Otrzymanie lizatu bakteryjnego w celu oczyszczania białek rekombinowanych	67
5.5.2	Chromatografia metalopowinowactwa (IMAC)	67
5.5.3	Chromatografia jonowymienna (IEX)	68
5.5.4	Chromatografia żelowa (SEC)	68
5.5.5	Pomiar stężenia białek metodą Bradford	69
5.5.6	Preparatyka białka PNP w celu obrazowania metodą mikroskopii krioelektronowej Cryo-EM	69
5.5.7	Termoforeza mikroskalarna dla badania oddziaływań pomiędzy białkami PapS oraz RhpA.	70
5.5.8	Technika Western-Blottingu	70
5.5.9	Badanie aktywności polimerazowej i degradacyjnej otrzymanych białek rekombinowanych białek <i>in vitro</i>	71
	a) Ocena aktywności polimerazowej	71
	b) Ocena aktywności degradacyjnej	72

5.5.10	Synteza poliadenylowanego odcinka oligo-poli(A)* stanowiącego substrat dla reakcji degradacji z udziałem PNPazy	72
5.5.11	Testy przesiewowe <i>in vitro</i> inhibitorów białka PNP <i>H. pylori</i>	73
5.5.12	Normalizacja wyników	74
5.5.13	Badanie aktywności poliadenylacyjnej białka PapS <i>H. pylori</i>	75
5.5.14	Rozdział elektroforetyczny RNA w warunkach denaturujących z mocznikiem - UREA-Page	75
5.5.15	Ocena zdolności białka PapS <i>H. pylori</i> do naprawy końca CCA tRNA	76
5.6	Testy fenotypowe szczepu delecyjnego PNPazy <i>H. pylori</i>	77
5.6.1	Ocena żywotności rekombinowanych szczepów <i>H. pylori</i>	77
5.6.2	Oznaczenie lekowrażliwości szczepów <i>H. pylori</i>	77
5.6.3	Ocena zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy <i>H. pylori</i>	78
5.6.4	Ocena aktywności wewnątrzkomórkowej katalazy PNP <i>H. pylori</i>	79
5.6.5	Pomiar aktywności ureazy <i>H. pylori</i>	79
5.6.6	Testy przeżywalności szczepów <i>H. pylori</i> w różnych temperaturach	80
5.6.7	Ocena wrażliwości szczepów <i>H. pylori</i> na wybrane mutageny z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej	80
5.6.8	Ocena wrażliwości szczepów <i>H. pylori</i> na promieniowanie UV-C	81
5.6.9	Test ruchliwości szczepów <i>H. pylori</i>	81
6.	Wyniki	82
6.1	Wytwarzanie i oczyszczanie białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS <i>H. pylori</i>	82
6.1.1	Uzyskiwanie konstruktów genetycznych do produkcji białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS <i>H. pylori</i>	82
6.1.2	Optymalizacja ekspresji białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS	84
6.1.3	Pozyskiwanie biomasy bakteryjnej w warunkach kontrolowanej hodowli	85
6.1.4	Oczyszczanie białek rekombinowanych metodami chromatograficznymi	85
6.1.5	Analiza form oligomerycznych białek metodą chromatografii żelowej	87
6.2	Struktura przestrzenna PNPazy	90
6.3	Badania aktywności enzymatycznej otrzymanych białek <i>H. pylori</i>	91
6.3.1	Aktywność polimeryzacyjna białka PNP	91
6.3.2	Aktywność polimeryzacyjna białka PapS	93
6.3.3	Aktywność dodawania CCA do tRNA przez białko PapS <i>H. pylori</i>	95
6.3.4	Przesiewowe testy potencjalnych inhibitorów aktywności PNPazy <i>H. pylori</i>	96
6.4	Badanie oddziaływań międzybiałkowych	97
6.4.1	Charakterystyka sekwencji i domen białka PapS <i>H. pylori</i>	97
6.4.2	Termoforeza mikroskalarna	100
6.5	Konstrukcja szczepów delecyjnych <i>H. pylori</i> dla białek PNP, RhpA i PapS oraz przywracanie genu <i>pnp</i>	103
6.6	Testy fenotypowe szczepu <i>H. pylori</i> G27 WT, Δpnp oraz Δpnp^{++}	108
6.6.1	Ocena ruchliwości	108
6.6.2	Ocena zdolności tworzenia biofilmu	109
6.6.3	Ocena aktywności katalazy	111
6.6.4	Analiza kinetyczna aktywności ureazy szczepów <i>H. pylori</i>	113
6.6.5	Czas generacji szczepów <i>H. pylori</i> w 37°C	115
6.6.6	Przeżywalność szczepów <i>H. pylori</i> w 4°C	117
6.6.7	Wrażliwość badanych szczepów <i>H. pylori</i> na wybrane czynniki genotoksyczne i antybiotyki	119
6.6.8	Przeżywalność szczepów <i>H. pylori</i> po ekspozycji na promieniowanie UV C-254 nm	121
6.6.9	Oznaczenie wartości MIC ₅₀ i MIC ₉₀ dla wybranych antybiotyków	122
6.7	Analiza transkryptomyczna uzyskanych szczepów delecyjnych <i>H. pylori</i>	125
6.7.1	Analiza transkryptomyczna szczepu <i>H. pylori</i> G27 Δpnp	125
6.7.2	Analiza transkryptomyczna szczepu <i>H. pylori</i> G27 $\Delta rhpA$	128
6.7.3	Analiza transkryptomyczna szczepu <i>H. pylori</i> G27 $\Delta papS$	130

6.8	Ocena stopnia zahamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP przez wybrane inhibitory	133
6.9	Testy przesiewowe inhibitorów białka PNP - przesiewowy test na całych komórkach bakterii	136
6.10	Ocena stopnia zahamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP przez wybrane inhibitory metodą UREA-PAGE	138
6.10.1	Hamowanie aktywności polimeryzacyjnej	138
6.10.2	Hamowanie aktywności degradacyjnej	139
7.	Dyskusja.....	141
8.	Wnioski szczegółowe.....	154
9.	Wniosek końcowy	156
10.	Streszczenia	157
11.	Bibliografia	159

1. Wstęp

1.1 Charakterystyka *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych bakterii patogennych dla człowieka na świecie. Odkrycie Marshalla i Warrena, które znalazło odzwierciedlenie w publikacji w czasopiśmie *Lancet* z 1984 roku, dotyczące związku pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a chorobami układu pokarmowego pozwoliło uznać tę bakterię za istotny czynnik prowadzący do rozwoju zapalenia błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej żołądka i/lub dwunastnicy oraz zwiększający ryzyko rozwoju raka żołądka [1], [2], [3], [4], [5]. Do kolonizacji błony śluzowej żołądka może dochodzić już we wczesnym dzieciństwie. Szacuje się, że zakażenie obejmuje około 50% populacji ludzi na świecie [6]. Wśród osób zakażonych, ponad 90% stanowią nosiciele bezobjawowi. Pomimo braku objawów zakażenia z czasem może dojść do rozwoju procesów patologicznych.

U około 10% osób zakażonych *H. pylori* zwykle dochodzi do rozwoju wrzodów żołądka a u 1-10% wrzodów dwunastnicy. Istotny problem medyczny stanowi narastająca oporności szczepów *H. pylori* na antybiotyki stosowane w terapii, przez co maleje odsetek eradykacji. Światowa Organizacja Zdrowia - WHO (ang. World Health Organization) oraz Narodowy Instytut Nowotworów w Stanach Zjednoczonych - NCI (ang. National Cancer Institute) sklasyfikowały zakażenie *H. pylori* jako karcynogen, którego obecność w nabłonku żołądka zwiększa ryzyko rozwoju gruczolaka żołądka na poziomie 0,1-3% lub chłoniaka związanego z tkanką limfatyczną błony śluzowej - MALT (ang. mucosa-associated lymphoid tissue) na poziomie <0,01% [7], [2], [8], [9]. Aż 90% przypadków raka żołądka niezwiązanego z okolicą wpustu można powiązać z przewlekłą kolonizacją *H. pylori*, a częstość występowania tego podtypu raka żołądka zmniejsza się wraz ze spadkiem częstości zakażenia [10]. W konsekwencji przetrwałego zakażenia *H. pylori* diagnozuje się ponad 700 tys. przypadków nowotworów żołądka rocznie, co stanowi 6,2% wszystkich diagnozowanych nowotworów globalnie. Wykazano, że skuteczna eradykacja zakażenia przyczynia się do zmniejszenia ryzyka wystąpienia nowotworów w obrębie układu pokarmowego [11]. Dostępne są również doniesienia literaturowe wskazujące na związek pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a chorobami spoza układu pokarmowego, takimi jak cukrzyca, choroba niedokrwienna serca, czy anemia [12], [13], [14]. W badaniach eksperymentalnych na modelach komórkowych komórek

nabłonkowych żołądka oraz komórek śródbłónka naczyniowego wykazano, że pałeczki *H. pylori* i ich komponenty stymulują wytwarzanie reaktywnych rodników tlenowych - ROS (ang. reactive oxygen species), które doprowadzają do uszkodzenia komórek i zaburzenia ich integralności w monowarstwie, a w przypadku komórek naczyniowych proces ten jest wzmożony w środowisku oksydowanego cholesterolu i kwasu acetylosalicylowego, który jest stosowany rutynowo jako lek antykoagulacyjny u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca [15], [16]. Jakkolwiek na rozwój tej choroby w powiązaniu z zakażeniem *H. pylori* mogą mieć wpływ także czynniki genetyczne gospodarza, w tym polimorfizm w obszarze klastra kodującego interleukinę (IL)-1 [17]. Na modelu *in vivo* kawii domowej wykazano, że u zwierząt karmionych paszą wysokotłuszczową zakażonych *H. pylori* dochodzi do rozwoju proaterogennego środowiska zapalnego w naczyniach z towarzyszącymi objawami wątrobowego zespołu metabolicznego [18], [19]. Wykazano ponadto, że komponenty tych bakterii promują przekształcanie makrofagów w komórki piankowe charakterystyczne dla środowiska blaszki miażdżycowej i przyczyniają się do zwiększenia sztywności naczyń, co również jest charakterystyczne dla procesu miażdżycowego [18].

Zaburzenia struktury nabłonka żołądka i procesów naprawczych w zakażeniu *H. pylori* mają związek m.in. z hamowaniem wytwarzania proregeneracyjnej interleukiny (IL)-33, w środowisku lipopolisacharydu - LPS (ang. lipopolysaccharide) tych bakterii [20].

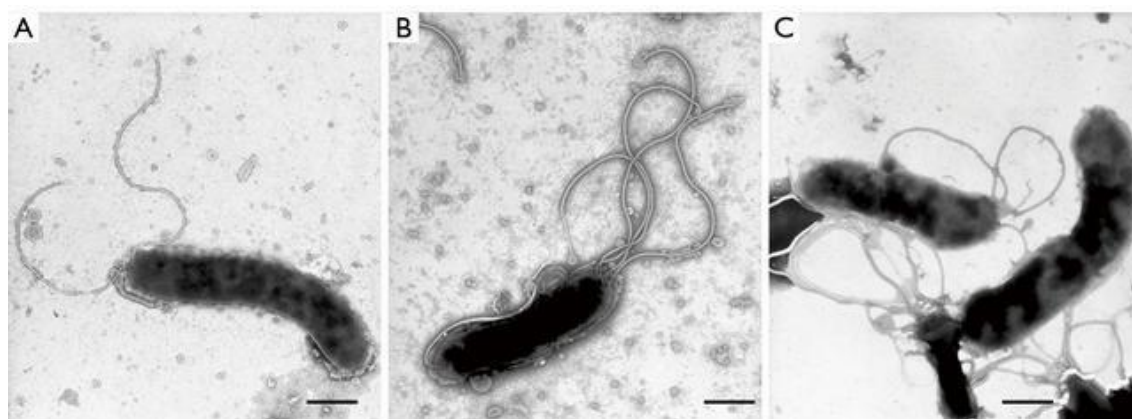
Ogólnoustrojowe chorobotwórcze działanie pałeczek *H. pylori* może być także rezultatem zjawiska mimikry antygenowej pomiędzy komponentami *H. pylori* a komponentami gospodarza (białko szoku cieplnego Hsp 60, determinanty antygenowe LeX, sekwencja aminokwasowa TVLLPVIFF w strukturze receptora czynnika martwicy guza TNFR, hormony pokarmowe), co może mieć związek z rozwojem procesów z autoimmunizacji zależnych od wytwarzania przeciwciał autorektywnych i ich udziałem w rozwoju choroby niedokrwiennej serca czy zaburzeń wzrostu u dzieci [21], [22].

1.2 Morfologia

Helicobacter pylori to mikroaerofilna, Gram-ujemna pałeczka zdolna do kolonizacji nabłonka żołądka lub dwunastnicy. Występuje w trzech formach morfologicznych: spiralnej (helikalnej) (Ryc. 1) lub S-kształtnej posiadającej od 1 do 3 skręceń osi oraz w tzw. formie kokoidalnej przypominającej ziarniaki, powstającej na skutek warunków stresowych, takich jak ekspozycja na antybiotyki czy brak składników odżywczych,

niewłaściwa temperatura, niska wilgotność czy brak warunków mikroaerofilnych. Transformacja morfologiczna w formy kokoidalne jest związana ze zmniejszeniem wielkości komórek oraz drastycznym spadkiem ich aktywności metabolicznej, co prowadzi do zmiany fenotypu wegetatywnego w fenotyp degeneracyjny, wykazujący wciąż funkcje życiowe, lecz niezdolny do wzrostu na podłożach hodowlanych - VBNC (ang. viable but non-culturable) [23], [24]. Średnia wielkość komórki *H. pylori* wynosi około 5 μm długości i 0,5 μm szerokości. Charakterystyczną cechą tych bakterii jest zdolność ruchu, możliwa dzięki 5-7 biegunowo umiejscowionym, osłoniętym rzęskom, które umożliwiają aktywne poruszanie się bakterii w warstwie śluzu żołądkowego, co stanowi kluczowy mechanizm adaptacyjny, ułatwiający kolonizację nabłonka żołądka [25], [26].

Helicobacter pylori wyróżnia się unikatową strukturą LPS. W porównaniu do LPS typowych bakterii Gram-ujemnych jelitowych, LPS *H. pylori* cechuje się obniżoną fosforylacją i acylacją lipidu A, obecnością długołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz determinantów antygenowych Lewis (Le) [27]. Ponadto LPS *H. pylori* wykazuje niską aktywność prozapalną i pirogeną. LPS *H. pylori* wykazuje istotnie obniżoną aktywność prozapalną i endotoksyczną w porównaniu z typowymi LPS innych bakterii Gram-ujemnych, co wiąże się z modyfikacjami lipidu A oraz obecności unikalnych reszt cukrowych [28].



Ryc. 1 Obraz formy helikalnej *Helicobacter pylori* z transmisyjnego mikroskopu elektronowego [29].

1.3 Kolonizacja i najważniejsze czynniki wirulencji

Proces kolonizacji nabłonka żołądka przez *H. pylori* obejmuje cztery główne etapy: adaptację do kwaśnego środowiska żołądka; przenikanie przez barierę śluzu; wiązanie specyficznych receptorów gospodarza w warstwie śluzowej zawierającej mucynę 5 - MUC5AC, oddziaływanie z receptorami powierzchniowymi komórek nabłonkowych, co umożliwia utrzymanie się bakterii zasiedlających niszę w tkance żołądka. Kolonizacja umożliwia wzrost bakterii, wydzielanie komponentów o działaniu toksycznym, uszkodzenie i rozszczelnienie bariery nabłonkowej i rozwój patologicznej reakcji zapalnej. Komponenty *H. pylori* są uwalniane w środowisku żołądka w sposób bierny podczas lizy bakterii lub w sposób aktywny. Ich źródłem mogą być też pęcherzyki błonowe występujące u tych bakterii [30].

Kluczowym czynnikiem *H. pylori* poprzedzającym proces adhezji jest wytwarzanie ureazy, która rozkłada mocznik do CO₂ i amoniaku, lokalnie podwyższającego pH kwasu żołądkowego [24]. . Inne enzymy takie jak oksydaza czy katalaza umożliwiają unikanie przez *H. pylori* mechanizmów bakteriobójczych zależnych od tlenu w komórkach fagocytarnych. Ponadto spiralny kształt bakterii oraz zdolność ruchu umożliwiają przedostawanie się *H. pylori* poprzez warstwę śluzu, chroniąc dodatkowo bakterie przed działaniem kwasu żołądkowego [11].

Proces kolonizacji i powstawanie przewlekłego zakażenia są warunkowane oddziaływaniem adhezyn *H. pylori* z receptorami występującymi w mucynie i na komórkach nabłonkowych żołądka gospodarza. W początkowym etapie zakażenia dochodzi do adhezji *H. pylori* poprzez wiązanie bakteryjnych białek błony zewnętrznej OMP (ang. Outer Membrane Proteins) do glikoprotein - mucyn, pełniących funkcję ochronną błony śluzowej żołądka [16], [31], [30]. Do najważniejszych OMP należą m.in.: adhezyna wiążąca antygen grupowy krwi - BabA (ang. blood group antigen-binding adhesin); adhezyna wiążąca kwas sjałowy - SabA (ang. sialic acid-binding adhesin); prozapalne białka błony zewnętrznej - OipA (ang. outer inflammatory protein A) i HopQ (ang. *Helicobacter pylori* outer membrane protein Q) oraz lipoproteiny A i B [32].

Adhezyna BabA rozpoznaje antygeny Lewis B-(LeB) występujące w błonie śluzowej żołądka[33]. Ta interakcja pozwala na czasowe zakotwiczenie bakterii. Po związaniu BabA z LeB aktywowany zostaje system sekrecji typu IV (T4SS, ang. type IV secretion system), który umożliwia wprowadzenie do komórek gospodarza czynników wirulencji inicjujących szlaki sygnałowe i transkrypcję genów odpowiedzialnych za rozwój stanu

zapalnego, powstawanie metaplazji jelitowej oraz zmian nowotworowych [34]. Rola adhezyny SabA polega na utrwaleniu adhezji poprzez wiązanie się z sialowanymi antygenami Lewis X (sLeX) i Lewis A (sLeA), których depozycja wzrasta w błonie śluzowej żołądka w trakcie rozwoju stanu zapalnego [35], [36]. Na modelu *in vitro* komórek nabłonkowych żołądka, a także *in vivo* kawii domowej z eksperymentalnym zakażeniem *H. pylori* wykazano, że podczas ekspozycji na pałeczki *H. pylori* i ich komponenty dochodzi do nasilenia wytwarzania MUC5AC, w której zdeponowane są receptory dla adhezyn *H. pylori*. Jest to prawdopodobnie reakcja komórek gospodarza na uszkodzenie związane z zakażeniem, która jednak przyczynia się do bardziej efektywnej kolonizacji nabłonka przez te bakterie. Wzrost ilości MUC5AC był najbardziej intensywny we wczesnej fazie zakażenia, w której bakterie muszą stworzyć stabilną do przetrwania i rozwoju specyficzną niszę [37].

Większość szczepów *H. pylori* wydziela cytotoksynę wakualizującą - VacA (ang. vacuolating cytotoxin A) raz białko A związane z cytotoksyną - CagA (ang. cytotoxin-associated gene A), które jest wprowadzane do komórek gospodarza przez T4SS [38], [39]. Białka te wraz z komponentami powierzchniowymi m.in. LPS uszkadzają komórki nabłonkowe gospodarza [40], [41]. Również inne białka *H. pylori* przyczyniają się do niszczenia komórek nabłonkowych, w tym proteaza serynowa HtrA (ang. high-temperature requirement A), która degradowe białko E-kadherinę na powierzchni komórek nabłonka żołądka [3]. Odbudowa nabłonka może być utrudniona ze względu na hamowanie w środowisku komponentów *H. pylori* wydzielania IL-33 o działaniu proregenerujących [20], [43], [44]. Infekcja *H. pylori* prowadzi do lokalnej indukcji produkcji chemokin, co prowokuje masową rekrutację i aktywację neutrofili m.in. za pośrednictwem białka NapA (ang. neutrophil-activating protein A), które nasilają rozwój zapalenia poprzez wydzielanie do środowiska reaktywnych form tlenu, przyczyniając się do powstawania objawów klinicznych [44], [45].

O przewlekłym charakterze zakażenia decyduje zdolność pałeczek *H. pylori* do unikania mechanizmów odpornościowych gospodarza. Do kluczowych komponentów tych bakterii oprócz białka Nap o działaniu immunomodulującym wobec neutrofili należy białko CagA, które wykazuje działanie prozapalne, zaburza strukturę i funkcje komórek nabłonkowych, ale także hamuje aktywność proliferacyjną limfocytów [42], [43], [46]. Jest zaliczane do białek onkogennych [48]. Funkcje limfocytów efektorowych hamuje także arginaza [48] a LPS, α -glukozylotransferaza cholesterolowa, powierzchniowe

hemaglutyniny i białka wiążące heparynę/siarczan heparanu hamują proces fagocytozy[49], [50]. Toksyna wakuolizująca sprzyja przeżyciu tych bakterii w tzw. megasomach [51]. LPS zaburza również inne kluczowe ogniwo odporności wrodzonej jakim jest aktywność cytotoksyczna naturalnych komórek zabijających - NK (ang. natural killer cells)[52] Ponadto zjawisko mimikry antygenowej pomiędzy komponentami *H. pylori* i gospodarza sprawia, że bakterie te są prawdopodobnie słabiej rozpoznawane przez komórki immunokompetentne [53], [54], [22].

Ograniczona skuteczność układu odpornościowego gospodarza jest też powiązana z wysoką zmiennością pałeczek *H. pylori* m.in. w zakresie przełączania wytwarzania adhezyny BabA i SabA, zmienności determinantów antygenowych Le X i Le Y, zróżnicowania toksyny VacA i białka CagA [7], [55], [56], [57], [58], [40], [41].

Utrzymujący się stan zapalny i będące jego następstwem zaburzenie integralności bariery nabłonkowej żołądka wymaga uruchomienia procesów naprawczych, które zależą m.in. od nasilenia aktywności proliferacyjnej komórek. Taką wzmożoną aktywność wykazano w badaniach z wykorzystaniem znaczników proliferacyjnych, wykonanych na bioptatach tkankowych od osób zakażonych *H. pylori* oraz w tkance kawii domowych zakażonych *H. pylori*[46] Taka nadmierna aktywność proliferacyjna zwiększająca ryzyko powstawania mutacji neoplasycznych wraz z działaniem onkogennym CagA są wskazywane jako czynniki sprzyjające powstawaniu zmian nowotworowych [47]. Najważniejsze czynniki wirulencji *H. pylori* zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Najważniejsze czynniki wirulencji *Helicobacter pylori* (zmodyfikowano w oparciu o Chang, W.L i in., 2018; Ansari, S., Yamaoka, Y., 2019) [4] [5].

Wybrane czynniki wirulencji <i>H. pylori</i>	Właściwości biologiczne
Ureaza	Rozkład mocznika do NH_3 i CO_2 - neutralizacja kwaśnego środowiska żołądkowego (NH_3 - uszkodzanie nabłonka żołądka) [11]
Rzęski	Ruch bakterii w kierunku nabłonka i penetracja warstwy śluzowej; ucieczka przed kwaśnym środowiskiem żołądka [25]
BabA	Adhezja do komórek nabłonka żołądka poprzez łączenie z receptorami Lewis b gospodarza [33]
SabA	Adhezja do komórek nabłonka żołądka poprzez sjałowany antygen Lewis X gospodarza [36]
OipA	Indukcja wytwarzania IL-8 i stymulacja migracji monocytów, neutrofilów oraz limfocytów T wraz z CagA powodowanie rozszczelnienia połączeń komórkowych [32]
HopQ	Hamowanie funkcji efektorowych limfocytów T i komórek NK gospodarza [52]
Powierzchniowe hemaglutyniny, białka wiążące heparynę	Hamowanie fagocytozy [49]
LPS	Słaba fosforylacja i acylacja lipidu A - słabe działanie endotoksyczne Słaba immunogenność Mimikra molekularna w zakresie determinantów Lewis X, Lewis Y, Lewis XY [53] Uszkodzenie żołądka i bariery nabłonkowej [42] Właściwości immunomodulujące [52] Zdolność do indukowania odpowiedzi zapalnej
CagA	Hamowanie fagocytozy Blokowanie odpowiedzi efektorowych limfocytów T [42] Indukcja cytokin prozapalnych [11]
VacA	Wakuolizacja komórek nabłonka żołądka Indukcja szlaków apoptotycznych w nabłonku żołądka Indukcja IL-8, nasilenie reakcji zapalnej Dezintegracja bariery nabłonkowej żołądka
Arginaza	Hamowanie reaktywnych form tlenu oraz NO_2 Blokowanie funkcji efektorowych limfocytów T [15]
α -glukozylotransferaza cholesterolowa	Hamowanie fagocytozy [3]
katalaza, peroksydaza ponadtlenkowa	Hamowanie reaktywnych form tlenu oraz NO_2 [11]
Hsp B	Mimikra molekularna [54]

1.4 Diagnostyka i leczenie

Na przestrzeni ostatnich 20 lat istotnie udoskonalono metody diagnostyki i leczenia zakażeń *H. pylori*, wprowadzając zmodyfikowane schematy i wytyczne terapeutyczne na podstawie międzynarodowego konsensusu specjalistów [59], [60], [61].

Diagnostyka *H. pylori* składa się z metod inwazyjnych i nieinwazyjnych. Do metod inwazyjnych zalicza się endoskopowe badanie żołądka i dwunastnicy wraz z pobraniem wymaganej liczby wycinków błony śluzowej z charakterystycznymi zmianami. Na złoty standard diagnostyki inwazyjnej składają się szybki test ureazowy do potwierdzenia aktywności ureazy bakterii występujących w bioptacie, badanie histopatologiczne tkanki obejmujące identyfikację organizmów *Helicobacter*-podobnych - HLO (ang. *Helicobacter-like organisms*), charakterystykę reakcji zapalnej wg kryteriów tzw. Systemu Sidney oraz badanie mikrobiologiczne [4], [60].

Do metod nieinwazyjnych należą: wykonanie oddechowego testu mocznikowego z mocznikiem znakowanym izotopem węgla ^{13}C umożliwiający wykrycie ureazy wytwarzanej przez bakterie *H. pylori* kolonizujące nabłonek żołądka lub dwunastnicy; wykrywanie przeciwciał klasy IgM/IgG przeciwko antygenom *H. pylori* w surowicy testem immunoenzymatycznym fazy stałej - ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) lub wykrywanie antygenów tych bakterii w kale metodą ELISA lub przy pomocy testów immunochromatograficznych [62][63]. Surowicze testy immunoenzymatyczne ELISA są rekomendowane jako testy przesiewowe ze względu na możliwość występowania reakcji fałszywie dodatnich za pośrednictwem przeciwciał krzyżowo reagujących, stąd zalecenia do potwierdzania wyników tych testów w testach immunoblotingu, które pozwalają takie reakcje wykluczyć [62], [64].

Leczenie zakażenia *H. pylori* zazwyczaj obejmuje stosowanie tzw. potrójnych lub poczwórnych terapii z wykorzystaniem przynajmniej dwóch antybiotyków jednocześnie i leków wspomagających [5], [62]. Terapia potrójna obejmuje stosowanie inhibitora pompy protonowej - IPP (ang. proton pump inhibitor) podwyższającego pH soku żołądkowego oraz dwa antybiotyki: klarytromycynę i amoksycylinę lub metronidazol. Terapia poczwórna, według zaleceń z Przewodnika Antybiotykoterapii 2025[65] uznawana jest obecnie w Polsce za terapię tzw. pierwszego rzutu i składa się z: 1) IPP, 2) preparatu zawierającego sól bizmutu, 3) metronidazolu i 4) tetracykliny. W przypadku niepowodzenia tej terapii stosuje się terapię zastępczą złożoną z lewofloksacyny, amoksycyliny oraz IPP lub z samej amoksycyliny i IPP [65]. Według

Przewodnika Terapii Przeciwdrobnoustrojowej Sanforda 2025 [66] jest alternatywna terapia potrójna zawierająca IPP, amoksycylinę oraz ryfabutyne, należącą do grupy antybiotyków ansamycynowych. W nawrotach infekcji zalecany jest indywidualny dobór antybiotyków na podstawie oceny lekowrażliwości izolatu [67].

Narastająca oporność *H. pylori* na powszechnie stosowane antybiotyki oraz brak skutecznej szczepionki sprawiają, że stosowane strategie leczenia wciąż wymagają doskonalenia, a także poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych [9], [61].

1.5 Problem narastającej lekooporności

Oporność *H. pylori* na antybiotyki stanowi istotne wyzwanie terapeutyczne i prowadzi do obniżenia skuteczności eradykacji tych bakterii. Obecnie dostępne schematy leczenia osiągają wskaźniki wyleczalności na poziomie około 80% lub niższym, co wynika między innymi ze stosowania nieodpowiednich schematów terapeutycznych, przyjmowania antybiotyków niezgodnie z zaleceniami lekarskimi czy nagłego przerywania terapii, co przyczynia się do powstawania narastającej oporności bakterii na antybiotyki [67].

WHO umieściła szczepy *H. pylori* odporne na klarytromycynę na liście „patogenów priorytetowych”, w tej samej kategorii co metycylinooporne izolaty *Staphylococcus aureus* - MRSA (ang. Meticylin Resistant *S. aureus*) oraz enterokoki (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium* i *E. avium*) odporne na wankomycynę - VRE (ang. Vancomycin-Resistant *Enterococcus*) [68]. Oporność na klarytromycynę jest szczególnie problematyczna, ponieważ antybiotyk ten stanowi podstawę terapii pierwszego rzutu w wielu krajach. Ponadto występowanie zjawiska lekooporności jest zróżnicowane geograficznie - od wyższych wskaźników w krajach azjatyckich po niższe w Europie i Ameryce Północnej [69]. Przykładowo, w Japonii sumaryczny wskaźnik eradykacji szczepów opornych na klarytromycynę w latach 2005-20218 wynosił zaledwie 47,4%, podczas gdy szczepy wrażliwe eliminowano w 89,6% przypadków [70]. Podobny problem odnotowano dla metronidazolu - globalne wskaźniki oporności na ten antybiotyk osiągają poziom 40-70%. W konsekwencji skuteczność standardowej terapii potrójnej z użyciem tego chemioterapeutyku w wielu regionach spadła poniżej 80%, co podkreśla konieczność opracowania nowych strategii terapeutycznych [71]. W Europie wykazano, że poziom oporności na antybiotyki koreluje z ich konsumpcją, a wcześniejsze stosowanie makrolidów znacząco zwiększa ryzyko niepowodzenia leczenia [73], [74].

Obecnie szczególny niepokój budzi rosnąca i współwystępująca oporność szczepów *H. pylori* na fluorochinolony i metronidazol, która przekracza już 15% w wielu regionach świat[74]. Taki trend wskazuje na konieczność monitorowania lekooporności oraz wdrażania skuteczniejszych, dostosowanych do profilu antybiotykowrażliwości schematów leczenia.

Narastająca oporność *H. pylori* na klarytromycynę, metronidazol i fluorochinolony, znacząco obniża skuteczność obecnych terapii, co podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych strategii leczenia. Poszukiwanie alternatywnych terapii opartych na nowych związkach przeciwbakteryjnych, modulacji mikrobiomu gospodarza lub personalizowanych schematach leczenia, jest kluczowe dla skutecznej eradykacji zakażeń *H. pylori* i ograniczenia dalszego rozwoju lekooporności. Ma to kluczowe znaczenie biorąc pod uwagę częstość zakażeń i ich poważne konsekwencje zdrowotne. Rozważa się opracowywanie nowych formułacji terapeutycznych opartych na naturalnych preparatach roślinnych [75] szczepach probiotycznych [76] a także preparatach bakteryjnych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, proregeneracyjnym i immunomodulującym. Do tych ostatnich należy piomelanina wytwarzana przez *Pseudomonas aeruginosa* [77] oraz prątki szczepionkowe *Mycobacterium bovis* BCG [78]. Nowe koncepcje wiążą się również z poszukiwaniem komponentów i szlaków metabolicznych pałeczek *H. pylori*, które mogą stać się celem dla nowych leków lub obecnie stosowanych po celowanej modyfikacji.

1.6 Charakterystyka genomu *H. pylori*

Uzyskanie pełnej sekwencji genomu patogennych bakterii stanowi kamień milowy do zrozumienia ich fizjologii i metabolizmu na poziomie molekularnym. Pierwsza kompletna sekwencja genomu *H. pylori* szczepu 26695 została opublikowana w 1997 roku. Szczep ten wyizolowano od pacjenta ze stwierdzonym zapaleniem błony śluzowej żołądka w Wielkiej Brytanii [79]. Kolejna pełna analiza genomowa przeprowadzona w 1999 roku, dotyczyła szczepu J99 wyizolowanego od pacjenta z chorobą wrzodową dwunastnicy pochodzącego ze Stanów Zjednoczonych [80] [81]. Na podstawie powyższych badań dowiedziono, że genom *H. pylori* ma postać kolistej cząsteczki, a jego wielkość waha się od 1,5 do 1,7 milionów par zasad (Mb) przy zawartości par GC (guanina-cytosyna) mieszczącej się w zakresie 38,5-39,9%. Dla porównania, wśród innych patogenów człowieka np. *Mycobacterium tuberculosis*, *B. subtilis* czy *Escherichia*

coli zawartość par GC jest wyższa i wynosi odpowiednio 65,6%, 43,5% i 50,8%. Z kolei blisko spokrewniona z *H. pylori* pałeczka *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) cechuje się niższą zawartością GC, wynoszącą około 30,6%. Różnice te odzwierciedlają adaptacje ewolucyjne poszczególnych gatunków do różnych nisz ekologicznych, wpływając jednocześnie na mechanizmy regulacji genetycznej i stabilność genomu. Genomy *E. coli*, *B. subtilis* i *M. tuberculosis* są znacząco większe i liczą odpowiednio 4,6, 4,2 oraz 4,4 Mb. [81], [83], [84].

Genom *H. pylori* cechuje się wysoką zmiennością i dynamiką mutacji. Badania sekwencyjne izolatów *H. pylori* wykazały, że podczas ostrej fazy infekcji tempo mutacji wynosi $6,1-8,4 \times 10^{-4}$ zmian na miejsce na rok, jest ok 40-50 razy szybsze niż podczas przewlekłej infekcji ($1,55 \times 10^{-5}$) i wielokrotnie szybsze niż tempo mutacji u innych bakterii [84], [55]. Najwyższą zmienność genetyczną u *H. pylori* obserwuje się wśród genów kodujących białka błony zewnętrznej (m.in. geny *hopZ*, *babA*, *sabA*) oraz geny związane z modulacją odpowiedzi immunologicznej (geny *opa*, *vacA*). Częste rekombinacje i mutacje genetyczne w obrębie wymienionych genów umożliwiają *H. pylori* dynamiczne dostosowywanie się do zmieniających się warunków w organizmie gospodarza, a tym samym unikanie eliminacji przez układ odpornościowy i rozwój infekcji przewlekłej [56].

Struktura genomu *H. pylori* zawiera charakterystyczne regiony zwane "regionami plastyczności" - PZ (ang. plasticity zones), w których znajduje się około 50% genów specyficznych dla każdego szczepu. Strefy PZ cechują się budową mozaikową i zawierają geny kodujące transpozazy i endonukleazy, co sugeruje, że miejsca te są podatne na częste reorganizacje materiału genetycznego [85], [86]. Wysoka częstość rekombinacji w genomie *H. pylori* skutkuje niemal losowym rozmieszczeniem wariantów sekwencji DNA, co przypomina sytuację tzw. „swobodnej rekombinacji”. Efekt ten można mierzyć za pomocą statystyk nierównowagi sprzężeń LD (ang. Linkage Disequilibrium), które opisują częstość współwystępowania określonych wariantów genetycznych w danej populacji. W przypadku *H. pylori* poziom LD pomiędzy miejscami w genomie oddalonymi o zaledwie 10 par zasad jest niższy niż poziom LD obserwowany u innych bakterii nawet przy dziesięciokrotnie większych odległościach. Oznacza to, że rekombinacja i wymiana materiału genetycznego między szczepami zachodzą u *H. pylori* z wyjątkową intensywnością - znacznie większą niż u jakiegokolwiek innego dotąd badanego organizmu [87], [88].

Ważnym aspektem budowy genomu *H. pylori* jest obecność licznych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych DNA, które chronią te bakterie przed bakteriofagami i pozwalają im na unikanie mechanizmów obronnych gospodarza. Ponadto, pałeczki *H. pylori* wykazują zdolność do naturalnej transformacji, potrafią pobierać i integrować do swojego genomu obc DNA, co znacząco przyspiesza procesy związane z ich ewolucją i adaptacją[80] Z drugiej strony, ich genom jest przykładem genomu minimalnego, z bardzo wysoką gęstością informacji genetycznej i ograniczoną liczbą sekwencji niekodujących. Wynikiem tej miniaturyzacji jest uproszczenie licznych szlaków metabolicznych, w tym szlaków metabolizmu RNA. Ze względu na ograniczenia metaboliczne *H. pylori* są z kolei silnie uzależnione od środowiska bytowania i czynników dostarczanych przez gospodarza.

2. Kompleks degradosomu RNA

Przemiany i degradacja kwasów rybonukleinowych - RNA (ang. ribonucleic acid) są niezbędne dla procesów regulacji ekspresji genów oraz utrzymania homeostazy wewnątrzkomórkowej. W komórkach bakteryjnych za te procesy odpowiada degradosom RNA - wieloskładnikowy kompleks białkowy o aktywności rybonukleazowej, który precyzyjnie kontroluje ilość i jakość syntezowanego RNA, pełniąc tym samym kluczową rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, jak wykazano badając degradosom *E. coli*. Aktywność endonukleolityczna degradosomu polega na dokonywaniu cięć bezpośrednio wewnątrz cząsteczki RNA, co umożliwia rozbicie długich transkryptów na mniejsze fragmenty i stanowi punkt startowy dla dalszej degradacji. Z kolei aktywność egzonukleolityczna odpowiada za stopniowe usuwanie pojedynczych nukleotydów końców nici RNA, dzięki czemu proces degradacji przebiega aż do całkowitego rozłożenia cząsteczki. Połączenie obu tych mechanizmów pozwala na szybkie i precyzyjne usuwanie zarówno prostych, jak i silnie ustrukturyzowanych form RNA [89]. Utrzymanie homeostazy komórkowej wymaga precyzyjnej kontroli aktywności degradosomu, m.in. poprzez działanie białek regulatorowych oraz interakcji międzybiałkowych, ponieważ zaburzenia w procesach degradacji i dojrzewania RNA mogą prowadzić do zakłóceń w funkcjonowaniu całej komórki [89], [90].

Rybonukleazy (RNazy) bakteryjne są kluczowymi enzymami regulacji potranskrypcyjnej, biorącymi udział w procesach dojrzewania i degradacji RNA. Wśród RNaz wyróżnia się wspomniane wcześniej endorybonukleazy, które powodują

fragmentację odcinków RNA np. RNaza E, RNaza G czy RNaza P. Innym typem RNaz są egzorybonukleazy degradujące RNA poprzez usuwanie pojedynczych nukleotydów od końca 5' lub 3' nici RNA np. fosforylaza polinukletydowa – PNPaza (ang. polynucleotide phosphorylase), RNaza II, RNaza J czy RNaza R [91]. Najważniejsze rybonukleazy zaangażowane w procesy dojrzewania i degradacji RNA u wybranych gatunków bakterii zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. RNazy obecne w modelowych bakteriach: Gram-ujemnej (*E. coli*) i Gram-dodatniej (*B. subtilis*) (Zmodyfikowano w oparciu o Deutscher M., 2021)

Endorybonukleazy ^a			Egzorybonukleazy ^a		
<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
RNaza III	RNaza I	RNaza M5		RNaza II	nanoRNaza A nanoRNaza B RNaza J1/J2 ^c YhaM
RNaza P	RNaza E	RNaza Mini-III	PNPaza	RNaza D	
RNaza BN/Z ^b	RNaza G	RNaza HIII	RNaza PH	RNaza T	
RNaza HII	RNaza HI	RNaza Y	RNaza R	Orn	
YbeY/YqfG	RNaza LS	Rae 1		RNaza AM	

a) Toksyny i zewnątrzkomórkowe RNazy nie zostały uwzględnione; b) RNaza BN/Z wykazuje również aktywność egzorybonukleazową; c) RNazy J1/J2 wykazują również aktywność endorybonukleazową

Podczas gdy kompleksy białkowe zaangażowane w metabolizm RNA występujące u *Prokaryota* nazywane są degradosomami RNA, analogiczne struktury u *Eukaryota* i *Archaea* zwyczajowo nazywane są egzosomami [92], [93]. Ponieważ termin „egzosom” jest wyrażeniem homonimicznym, który w kontekście komórkowym może oznaczać również zewnątrzkomórkowe pęcherzyki, w piśmiennictwie anglojęzycznym doprecyzowuje się ten termin poprzez zapis „kompleks egzosomu RNA (z ang. RNA exosome complex) w odniesieniu do egzosomów wydzielniczych (z ang. exosomes, extracellular vesicles).

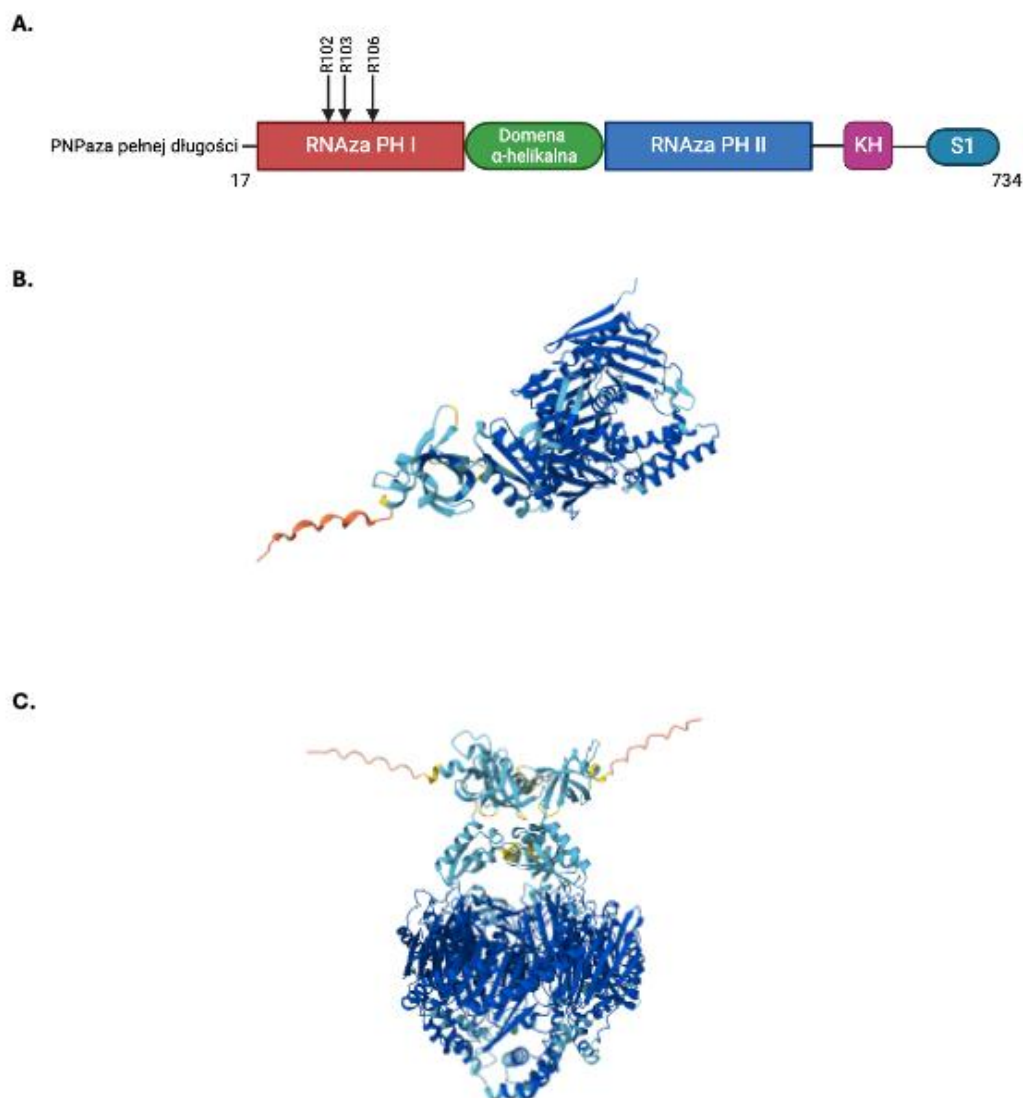
Pod względem biochemicznym, RNazy należą do hydrolaz i są zdolne do rozrywania wiązań fosfodiesterowych w cząsteczkach RNA. Rybonukleazy odgrywają kluczową rolę m.in. w procesach dojrzewania i kontroli jakości RNA, degradacji mRNA, eliminacji starterów RNA podczas replikacji DNA czy regulacji ekspresji genów przy udziale małych niekodujących sRNA (ang. small RNA). Odrywają też ważną rolę w obronie przeciwfagowej [96]. Pomimo występowania różnic w budowie degradosomów RNA

między różnymi grupami bakterii, ich obecność świadczy o kluczowej roli tych kompleksów w metabolizmie komórkowym. Najnowsze badania wykazały, że bakteryjne degradosomy RNA podlegają złożonym mechanizmom regulacyjnym, obejmującym autoregulację, modyfikacje potranslacyjne oraz kompartmentalizację białek. Ponadto ich organizacja subkomórkowa wykazuje podobieństwa do eukariotycznych ziarnistości - mRNP (z ang. messenger ribonucleoprotein granules) - bezbłonowych przedziałów komórkowych zaangażowanych w przechowywanie mRNA i białek oraz degradację matrycowego RNA - mRNA (z ang. messenger RNA). Odkrycia te wskazują na ewolucyjnie konserwatywną organizację procesów dojrzewania i degradacji RNA w komórkach [96], [97].

Badania nad degradacją i przetwarzaniem RNA u bakterii koncentrowały się głównie na bakteryjnych organizmach modelowych, takich jak Gram-ujemne pałeczki *E. coli* czy Gram-dodatnie pałeczki *B. subtilis*. Po raz pierwszy budowę degradosomu RNA bakterii opisano u *E. coli* jako kompleksu związanego z białkiem RNazą E czyli endorybonukleazą inicjującą degradację mRNA [96]. W kolejnych badaniach wykazywano, że degradosomy RNA występują powszechnie także u innych gatunków bakterii, w tym u patogenów stanowiących zagrożenie dla zdrowia ludzi np. u *S. aureus* [99], *P. aeruginosa* [100], *M. tuberculosis* [99], oraz *H. pylori* [100].

Do głównych składników białkowego kompleksu degradosomu *E. coli* należą: RNaza E; PNPaza; helikaza RhlB z rodziny DEAD-box oraz enolaza [101]. RNaza E inicjuje degradację przez endonukleolityczne cięcie RNA a PNPaza katalizuje fosforolityczną degradację z końca 3', uwalniając nukleotydy difosforanowe. Helikaza RhlB, korzystając z energii hydrolizy ATP, rozplata strukturę drugorzędową RNA, co ułatwia dostęp RNazie E i PNPazie do substratu RNA. Z kolei enolaza, choć to zasadniczo enzym glikolityczny, pełni w degradosomie funkcję białka regulatorowego i strukturalnego, stabilizując interakcje między pozostałymi składnikami kompleksu [101].

Wnikliwa charakterystyka mechanizmów degradacji RNA stanowi fundament zrozumienia regulacji metabolizmu RNA w komórkach prokariotycznych, co bezpośrednio determinuje ich homeostazę metaboliczną, a pośrednio wpływa na kluczowe procesy, takie jak wrażliwość na działanie antybiotyków. Strukturalne podstawy funkcjonowania jednego z kluczowych składników degradosomu, fosforylasy polinukleotydowej (PNPazy) *E. coli*, przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Struktura PNPazy z *E. coli* (UniProt: P05055).

(A) Schemat domenowy pełnej długości PNPazy (reszty 17-734), przedstawiający kolejno: domenę RNaza PH I (czerwona), domenę α -helikalną (zieloną), RNazę PH II (niebieską), domenę KH (różową) oraz S1 (ciemnoniebieską). Pozycje reszt mutowanych w badaniu oznaczono strzałkami. Schemat opracowano na podstawie adnotacji UniProt.

(B) Przewidywana trójwymiarowa struktura pojedynczego monomeru PNPazy z *E. coli*, wygenerowana przy użyciu modelu AlphaFold. Kolorystyka wskazuje przebieg łańcucha polipeptydowego od końca N (pomarańczowy) do końca C (ciemnoniebieski).

(C) Modelowany kompleks PNPazy, tworzący przypuszczalny pierścień funkcjonalny. Każda z sześciu podjednostek została oznaczona innym odcieniem. Model wygenerowano na podstawie danych homologicznych z białek zdeponowanych w PDB, z wykorzystaniem AlphaFold. Kolory na modelach AlphaFold odzwierciedlają pewność predykcji struktury: niebieski (pLDDT > 90) oznacza bardzo wysoką wiarygodność, błękitny (70-90) umiarkowaną, żółty (50-70) niską, a pomarańczowy (<50) bardzo niską - często odpowiadającą elastycznym lub nieustrukturyzowanym regionom białka.

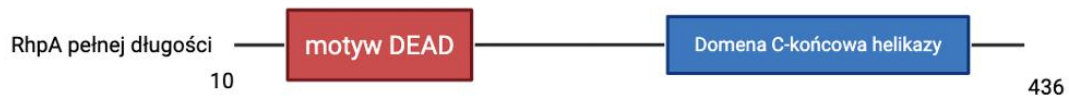
2.1 Degradosom *H. pylori*

W przeciwieństwie do złożonych kompleksów degradosomów bakterii tj. *E. coli* czy *M. tuberculosis*, u *H. pylori* występuje tzw. degradosom minimalny. Jest on zbudowany z dwóch głównych białek: rybonukleazy J - RNazy J oraz helikazy RNA - RhpA. Działanie degradosomu *H. pylori*, podobnie jak u innych bakterii, odgrywa zasadniczą rolę w przetwarzaniu i degradacji RNA co ma bezpośrednie przełożenie na ekspresję genów oraz adaptację patogenu do m.in. warunków środowiskowych czy zdolności do kolonizacji niszy żołądka [102], [105], [106].

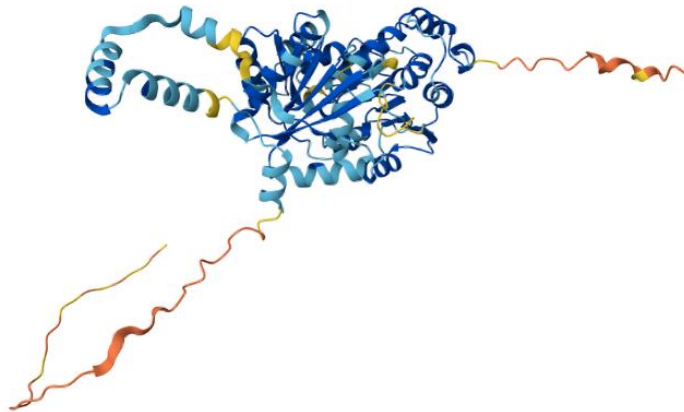
2.1.1 Helikaza RhpA

Białko RhpA, o masie cząsteczkowej około 56 kDa, należy do rodziny białek DEAD-box, nazwanej od konserwowanego motywu Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) i odpowiedzialnej za rozwijanie struktur drugorzędowych RNA (jego budowę strukturalną przedstawiono na rycinie 3). W najnowszych badaniach wykazano, że RhpA w roztworze występuje jako dimer[105]. W odróżnieniu od pałeczek *E. coli*, posiadających 5 helikaz tego typu oraz *B. subtilis* z czterema, u *H. pylori* wykryto tylko jedną helikazę RNA z rodziny DEAD-box. RhpA pełni kluczowe funkcje w metabolizmie RNA, biogenezie rybosomów, inicjacji translacji oraz adaptacji patogenu do temperatur poniżej optymalnej (37 °C), a także wpływa na jego wirulencję i zdolność kolonizacji. Delecja genu *rhpA* nie pozbawia *H. pylori* zdolności przeżycia, co sugeruje, że funkcję helikazy mogą częściowo przejmować inne enzymy, takie jak RNaza R, wykazująca aktywność helikazy *in vitro*. Co więcej, aktywność ATP-azowa RhpA jest silnie stymulowana w obecności RNazy J, co dowodzi synergistycznej interakcji tych białek. Dodatkowo wykazano, że szczep pozbawiony RhpA - $\Delta rhpA$ nie był w stanie zasiedlić żołądka myszy doświadczalnych [79], [106], [107], [104], [109].

A.



B.



Ryc. 3. Struktura monomerycznej helikazy RhpA *Helicobacter pylori* (hp_0247).

(A) Schemat przedstawia lokalizację dwóch konserwowanych regionów funkcjonalnych: motywu DEAD (reszty 10-110) (kolor czerwony), odpowiedzialnego za wiązanie i hydrolizę ATP, stanowiącego podstawę aktywności helikazowej białka, oraz domeny C-końcowej helikazy (reszty 210-370) (kolor niebieski), biorącej udział w wiązaniu RNA oraz stabilizacji kompleksu białkowo-RNA.

(B) Przewidywana trójwymiarowa struktura monomeru RhpA, pokolorowana gradientowo wzdłuż długości łańcucha polipeptydowego, wygenerowana za pomocą modelu AlphaFold. Kolory na modelach AlphaFold odzwierciedlają pewność predykcji struktury: niebieski (pLDDT > 90) oznacza bardzo wysoką wiarygodność, błękitny (70-90) umiarkowaną, żółty (50-70) niską, pomarańczowy (<50) bardzo niską - często odpowiadającą elastycznym lub nieustrukturyzowanym regionom białka.

2.1.2 RNaza J

RNaza J pełni funkcję głównej rybonukleazy u *H. pylori* i odpowiada za degradację mRNA oraz regulację ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Wraz z jedyną helikazą DEAD-box, RhpA, tworzy minimalny kompleks degradosomu RNA, który jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu procesów degradacji i dojrzewania RNA[109]. Wyniki sekwencjonowania RNA (*RNA-seq*) szczepów *H. pylori* wykazały, że RNaza J reguluje ekspresję większości cząsteczek mRNA i antysensownych RNA (asRNA), co podkreśla jej kluczową rolę w metabolizmie RNA. Badania *in vitro* potwierdziły oddziaływanie RNazy J z białkiem RhpA, prowadzące do wzajemnej stymulacji ich aktywności, co dodatkowo świadczy o występowaniu funkcjonalnego kompleksu degradosomu budowanego przez oba białka. Kompleks tych dwóch białek został zlokalizowany przy wewnętrznej błonie komórkowej *H. pylori*, a nie w cytozolu komórki bakteryjnej, podobnie jak w przypadku białek pełniących analogiczne funkcje u innych bakterii [105][106]. Co ciekawe, badania Redko i wsp. wykazały, że minimalny kompleks degradosomu RNaza J-RhpA u *H. pylori* pozostaje również związany z rybosomami 70S i polisomami, co sugeruje jego bezpośrednie zaangażowanie w kontrolę stabilności mRNA podczas procesów translacji [100].

2.1.3 Fosforylaza polinukleotydowa

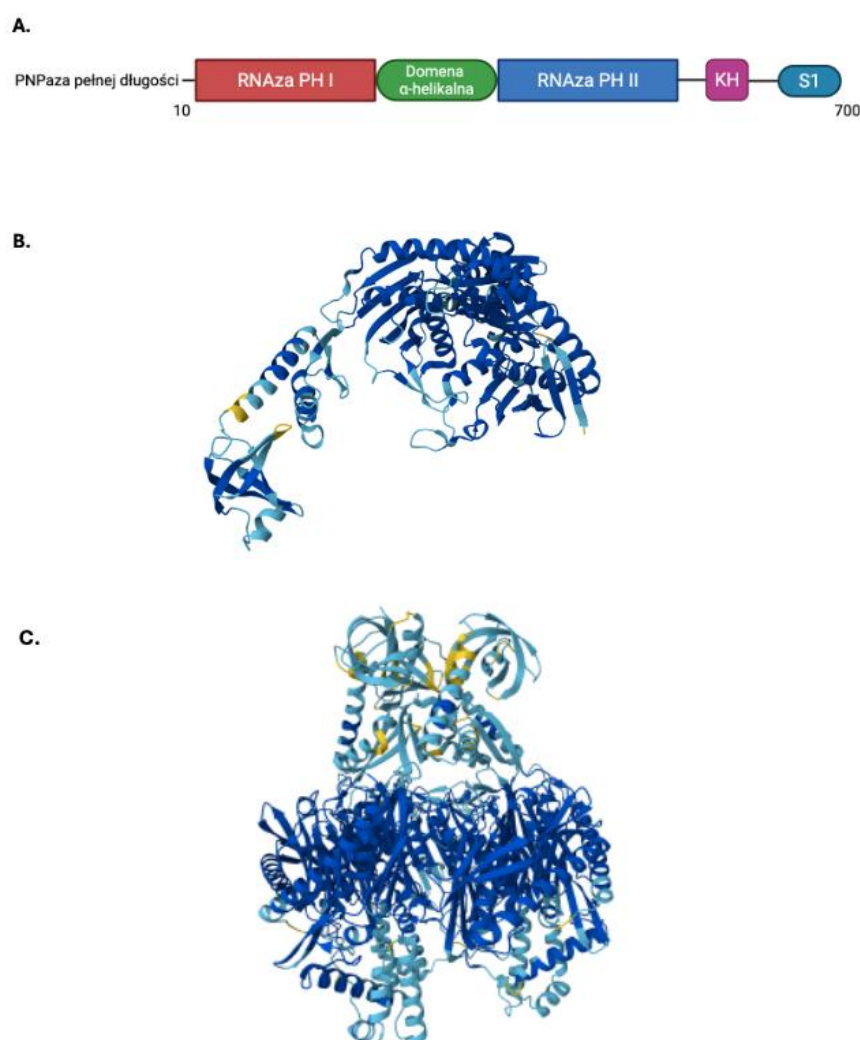
Białko fosforylaza polinukleotydowa (z *ang.* **polynucleotide phosphorylase**, PNPaza) jest enzymem wykazującym dwie główne aktywności. Pierwsza, 3'→5' egzonukleolityczna, polega na fosforolitycznej degradacji RNA od końca 3', podczas której do nieorganicznego fosforanu dołączane są kolejne nukleotydy, uwalniając nukleozydo-5'-difosforany (NDP), np. adenozyno-5'-difosforan (ADP). Druga to niezależna od matrycy aktywność polimerazy RNA, pozwalająca na przyłączanie NDP do wolnego 3'- końca jednoniciowego RNA i w ten sposób wydłużanie łańcucha [110].

Fosforylaza polinukleotydowa (PNPaza, kodowana przez gen *pnp*) w modelowej bakterii *E. coli* jest homotrimerem, co odzwierciedla konserwowaną strukturę bakteryjnych PNPaz (obserwowaną również u *H. pylori*). Każda podjednostka o masie około 80 kDa zawiera dwie N-końcowe domeny PH połączone α -helikalnym regionem łącznikowym. W obrębie końca C-terminalnego występują domeny KH i S1, wiążące RNA, stabilizujące trimer i regulujące średnicę centralnego kanału degradacyjnego. W natywnym kompleksie ten pierścieniowy kanał ma średnicę ok. 14 Å,

co uniemożliwia przepływ dwuniciowego RNA. Usunięcie domen KH/S1 (szczep delecyjny Δ KH/S1) prowadzi do poszerzenia światła o około 6 Å, potwierdzając allosteryczną rolę tych modułów w kontroli rozmiaru otworu. [111][112].

Sekwencja aminokwasowa PNPazy *H. pylori* wskazuje na zachowanie typowej dla bakteryjnych PNPaz architektury domenowej. Homolog kodowany przez gen *pnp* jest białkiem o długości ok. 688 aa i masie ok. 76,8 kDa, zawierającym domeny katalityczne PH oraz C-terminalne domeny wiążące RNA. Konserwacja ewolucyjna tych elementów sugeruje, że również PNPaza *H. pylori* może tworzyć pierścieniowaty homotrimer z centralnym kanałem degradacyjnym, którego parametry są modulowane przez regiony wiążące RNA analogicznie do modelu *E. coli*. Przewidywaną organizację strukturalną PNPazy *H. pylori* przedstawiono na rycinie 4.

U *E. coli* PNPaza odgrywa istotną rolę w ochronie przed stresem oksydacyjnym. Badania wykazały, że PNPaza specyficznie wiąże syntetyczny RNA zawierające oksydacyjne uszkodzenie 8-hydroksyguaninę (8-oxoG) oraz RNA o naturalnej sekwencji, uszkodzone oksydacyjnie na skutek oddziaływania nadtlenu wodoru - H₂O₂. Szczepy delecyjne *E. coli* pozbawione PNPazy były bardziej wrażliwe na działanie czynników indukujących stres oksydacyjny w porównaniu do szczepu dzikiego. Sugeruje to, że rolą PNPazy może być również usuwanie uszkodzonych oksydacyjnie łańcuchów RNA, co ma wpływ na procesy życiowe całej komórki [113]. U blisko spokrewnionej z *H. pylori* pałeczki *C. jejuni*, inaktywacja genu kodującego białko PNPazę, spowodowała m.in. zahamowanie zdolności *C. jejuni* do kolonizacji komórek Ht-29; znacząco zmniejszyła zdolność ruchu bakterii *in vitro*; zwiększyła podatność komórek bakteryjnych na stres oksydacyjny oraz obniżyła zdolność infekowania i kolonizacji komórek nabłonka jelitowego kurcząt (*Gallus gallus*) *in vivo* [114].



Ryc. 4. Struktura PNPazy z *Helicobacter pylori* (hp_1213).

(A) Schemat domenowy pełnej długości PNPazy (reszty 10-700), przedstawiający kolejno: domenę RNaza PH I (czerwona), domenę α -helikalną (zielona), RNazę PH II (niebieska), domenę KH (różowa) oraz S1 (ciemnoniebieska), opracowany na podstawie adnotacji UniProt.

(B) Przewidywana trójwymiarowa struktura pojedynczego monomeru PNPazy, pokolorowana gradientowo według długości łańcucha polipeptydowego, wygenerowana za pomocą modelu AlphaFold.

(C) Modelowany trimeryczny kompleks PNPazy tworzący przypuszczalny pierścień funkcjonalny; każda podjednostka została oznaczona innym odcieniem. Struktura została wygenerowana metodami modelowania bioinformatycznego na podstawie homologii z danymi z Protein Data Bank przy użyciu oprogramowania AlphaFold. Kolory na modelach AlphaFold odzwierciedlają pewność przewidywań struktury: niebieski (pLDDT > 90) oznacza bardzo wysoką wiarygodność, błękitny (70-90) umiarkowaną, żółty (50-70) niską, a pomarańczowy (<50) bardzo niską - często odpowiadającą elastycznym lub nieustrukturyzowanym regionom białka.

2.1.4 RNaza Y

W najnowszych badaniach z 2025 roku potwierdzono eksperymentalnie również obecność RNazy Y jako składnika degradosomu *H. pylori*. Wykazano, że RNaza Y jest białkiem błonowym zakotwiczonym w wewnętrznej błonie komórkowej. Funkcjonalnie RNaza Y jest charakterystyczną dla bakterii Gram-dodatnich endorybonukleazą przecinającą jednoniciowe cząsteczki RNA, pełniącą funkcję analogiczną do RNazy E u bakterii Gram-ujemnych. Choć szczegółowy mechanizm katalityczny tego enzymu nie został jeszcze precyzyjnie zdefiniowany dla *H. pylori*, pośrednio, o aktywności tego enzymu świadczą jednak efekty *in vivo* po delecji RNazy Y, w postaci akumulacji wydłużonych fragmentów sRNA CncR1. Ten mały, niekodujący RNA pełni w komórkach pałeczek *H. pylori* funkcje regulatorowe, wpływając na poziom ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji, warunkujących ruchliwość i zdolność adhezji bakterii do komórek gospodarza. Wynik ten pośrednio wskazuje na specyficzne cięcie CncR1 przez RNazę Y. Do tej pory nie udokumentowano możliwych oddziaływań pomiędzy RNazą Y a wcześniej opisanymi składnikami degradosomu *H. pylori* [115].

2.1.5 RNaza R

W odróżnieniu od RNazy R z *E. coli*, enzym z *H. pylori* utracił domeny odpowiadające za aktywność helikazy, co uniemożliwia mu degradację dwuniciowego RNA. Zjawisko to, powszechne wśród bakterii z typu Campylobacterota, wynika z ewolucyjnej adaptacji i następowało stopniowo w toku ich rozwoju. U *C. jejuni* wykazano, że RNaza R bezpośrednio wpływa na tempo wzrostu bakterii oraz zdolność adhezji i inwazji komórek nabłonka żołądka. Natomiast mutant *H. pylori* pozbawiony genu *rnr* zachowuje żywotność, lecz wykazuje zwiększoną ruchliwość na podłożu półpłynnym [108].

Badania *in vivo* dowiodły, że RNaza R tworzy w komórce funkcjonalny kompleks z helikazą RhpA, przy czym RhpA, dzięki aktywności ATP-azowej, ułatwia dostęp RNazie R do fragmentów dwuniciowego RNA, umożliwiając jego efektywną degradację. Samo białko RNaza R uczestniczy jedynie w ograniczonym zakresie w dojrzewaniu 5S rRNA i posiada niewielki zestaw naturalnych substratów u *H. pylori*. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że w toku ewolucji RNaza R skompensowała utratę własnej aktywności helikazy, przejmując część funkcji katalitycznych RhpA w obróbce strukturalnie złożonych cząsteczek RNA [102], [116].

2.1.6 Pozostałe elementy degradosomu *H. pylori*

Analiza sekwencji genomu *H. pylori* ujawniła obecność genów kodujących m.in. RNazę III, RNazę P, RNazę R, PNPazę, RNazę HI oraz RNazę HII, przez co nie można wykluczyć, że inne nukleazy uczestniczą w regulacji degradacji mRNA. Niemniej jednak dotychczasowe badania nad degradosomem *H. pylori* nie potwierdziły interakcji RNazy Y, PNPazy ani żadnych innych rybonukleaz z kompleksem RNaza J-RhpA, z wyjątkiem jednoznacznie potwierdzonego oddziaływania RNazy R z RhpA. Pomimo stosunkowo skromnego zestawu genów kodujących enzymy degradacji RNA w porównaniu z innymi bakteriami, nie ma obecnie dowodów na to, by te dodatkowe nukleazy wchodziły w skład degradosomu opartego na RNazie J jako jego rdzeniu [117]. Zestawienie potencjalnych składników degradosomu RNA *H. pylori* na tle wybranych bakterii przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie degradosomów bakteryjnych (stworzona w oparciu o źródła literaturowe [119], [120], [121], [122], [123], [124], [125], [126], oraz bazy danych UniProt, NCBI Gene Database, Mycobrowser)

Komponent	<i>H. pylori</i> 26695	<i>E. coli</i> K-12	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>C. jejuni</i> 11168	<i>B. subtilis</i> 168	Funkcja i uwagi
RNaza E	Brak	Obecna (rne)	Obecna (Rv1087)	Brak	Brak	Endorybonukleaza inicjująca degradację mRNA; pełni funkcję rusztowania degradosomu w <i>E. coli</i> . W <i>H. pylori</i> i <i>B. subtilis</i> funkcję tę przejmują odpowiednio RNaza J i RNaza Y
RNaza J	Obecna (rnj)	Brak	Obecna (Rv2752c)	Obecna (rnj)	Obecna (rnjA/B)	Endo- i egzorybonukleaza 5'→3'; kluczowa w degradacji mRNA w bakteriach Gram-dodatnich oraz w <i>H. pylori</i> .
RNaza Y	Obecna (rny)	Brak	Brak	Obecna (rny)	Obecna (rny)	Endorybonukleaza związana z błoną; organizuje degradosom w bakteriach Gram-dodatnich.
PNPaza	Obecna (pnp)	Obecna (pnp)	Obecna (Rv2783c)	Obecna (pnp)	Obecna (pnp)	Egzorybonukleaza 3'→5'; uczestniczy w degradacji mRNA i procesach dojrzewania RNA.
RNaza R	Obecna (rnr)	Obecna (rnr)	Obecna (Rv3798)	Obecna (rnr)	Obecna (rnr)	Egzorybonukleaza 3'→5'; degradowe RNA o strukturze dwuniciowej. W <i>H. pylori</i> tworzy kompleks z RhpA.
RNaza II	Brak	Obecna (rnb)	Obecna (Rv2491c)	Brak	Obecna (rph)	Egzorybonukleaza 3'→5'; degradowe jednoniciowy RNA. W <i>H. pylori</i> i <i>C. jejuni</i> nieobecna; funkcję tę mogą pełnić PNPaza i RNaza R.
Helikaza RNA (DEAD-box)	Obecna (rhpA)	Obecna (rhlB)	Obecna (rhlE)	Brak	Obecna (cshA)	Rozplątuje struktury RNA; wspomaga aktywność rybonukleaz. W <i>H. pylori</i> jedyna helikaza DEAD-box (RhpA) tworzy kompleks z RNazą J.
Enolaza	Obecna (eno)	Obecna (eno)	Obecna (Rv1022)	Obecna (eno)	Obecna (eno)	Enzym glikolityczny; może pełnić funkcję regulatorową w degradosomie. W <i>E. coli</i> wiąże się z RNazą E; w <i>B. subtilis</i> z RNazą Y.

2.2 Nukleotydylotransferazy związane z metabolizmem tRNA

Po omówieniu głównych składników degradosomu RNA warto zwrócić uwagę na procesy modyfikacji końców 3' RNA, które mogą wpływać na stabilność transkryptów w komórce. Kluczową grupą enzymów zdolnych do dołączania nukleotydów do końców 3' RNA są nukleotydylotransferazy klasy II. Rodzina ta obejmuje bardzo blisko spokrewnione enzymy, w tym właściwe poli(A) polimerazy oraz enzymy dołączające sekwencję cytozyna-cytozyna-adenina (CCA) do 3'-końca tRNA (CCA-NT, nukleotydylotransferaza CCA). Enzym ten bez obecności matrycy dobudowuje kolejno dwa nukleotydy cytozyny i jeden adeniny na końcu cząsteczki tRNA. Umożliwia to powstanie sekwencji 3'-CCA, która jest niezbędną w procesie aminoacylacji przy udziale odpowiedniej syntetazy aminoacylo-tRNA dla prawidłowego funkcjonowania tRNA w procesie translacji [126]. Odcinek 3'-CCA może być bezpośrednio zakodowany w sekwencjach genów tRNA i uwalniany podczas przetwarzania pre-tRNA lub, jeśli nie występuje w instrukcji genetycznej, syntetyzowany *de novo* przez enzymy CCA-NT. Obecność sekwencji CCA w genach tRNA jest zróżnicowana wśród bakterii i zależy od specyficznych cech danego gatunku. U *E. coli* czy *H. pylori* sekwencja CCA jest już zakodowana dla wszystkich genów kodujących cząsteczki tRNA. Z tego powodu, rola CCA-NT ogranicza się głównie do naprawy i odtwarzania końców tRNA po niepełnej degradacji katalizowanej przez niektóre nukleazy lub w procesie recyklingu tRNA. U bakterii z rodzaju *Mycobacterium* czy *Bacillus*, część genów kodujących tRNA zawiera informację o końcu CCA na poziomie genomu, a część wymaga jego syntezy *de novo*. Z kolei u organizmów, które nie posiadają sekwencji kodującej CCA w tRNA (*Eukariota* oraz niektóre *Archea*) dodanie CCA jest niezbędnym etapem biosyntezy tRNA. Ze względu na fundamentalną rolę translacji, w przypadku gdy choć jedna niezbędna cząsteczka tRNA w komórce wymaga syntezy sekwencji 3'-CCA przy udziale nukleotydylotransferazy CCA (CCA-NT), warunkuje to bezpośrednio możliwość przeżycia danego organizmu, co czyni aktywność CCA-NT krytyczną dla żywotności i wzrostu organizmu a w wielu przypadkach inaktywacja prowadzi do fenotypu letalnego lub skrajnie upośledza wzrost[127]. U *E. coli* opisano występowanie dwóch głównych enzymów z rodziny nukleotydylotransferaz klasy II: nukleotydylotransferazy CCA kodowanej przez gen *cca* oraz polimerazy poli(A) kodowanej przez gen *pcnB*. Ponieważ geny tRNA *E. coli* posiadają już zakodowaną sekwencję CCA, rola

nukleotydylotransferazy CCA ogranicza się głównie do naprawy i odtwarzania końców tRNA uszkodzonych w wyniku działania nukleaz lub procesów degradacyjnych. Wykazano, że w szczepie *E. coli* pozbawionym aktywności CCA-NT dochodzi do akumulacji nieaktywnych tRNA pozbawionych końcowej sekwencji 3'-CCA, co prowadzi do spowolnienia wzrostu bakterii. Z kolei *B. subtilis* posiada enzym CCA-NT, który dołącza sekwencję CCA do końca 3' cząsteczek tRNA, nie wykazując przy tym aktywności poliadenylacyjnej. W jego genomie, podobnie jak u *E. coli*, część genów tRNA zawiera zakodowaną sekwencję CCA, natomiast pozostałe jej nie posiadają i wymagają dosyntetyzowania właśnie przez ten enzym. Należy przy tym zaznaczyć, że sekwencja CCA jest wymagana osobno dla każdej cząsteczki tRNA, która jej nie zawiera w zapisie genowym [128]. Interesującym przypadkiem są prątki *M. tuberculosis*, których genom zawiera tylko jeden gen nukleotydylotransferazy tRNA (*Rv3907c*). W przeciwieństwie do *E. coli*, u *M. tuberculosis* ponad połowa genów tRNA nie zawiera sekwencji CCA, co oznacza, że enzym CCA-NT musi dobudowywać CCA w obróbce potranskrypcyjnej. Wykazano, że obniżenie poziomu tego enzymu w komórkach *M. tuberculosis* skutkuje zaburzeniem wzrostu i akumulacją nieaktywnych, niedojrzałych form tRNA, bez CCA. O ile u *E. coli* enzym CCA-NT pełni głównie rolę naprawczą, o tyle u *B. subtilis* czy *M. tuberculosis* pełni on kluczową rolę w procesach dojrzewania tRNA, podobnie jak ma to miejsce w komórkach eukariotycznych. W związku z tym prątkowa CCA-nukleotydylotransferaza została zidentyfikowana jako potencjalny cel dla leków przeciwgruźliczych. Inhibitor tego enzymu zablokowałby syntezę białek bakterii, podczas gdy komórki człowieka, wyposażone we względnie odmienny strukturalnie i funkcjonalnie, jądrowo-mitochondrialny enzym CCA-NT (TRNT1), pozostałyby niewrażliwe [129].

2.2.1 Oddziaływanie nukleotydylotransferaz tRNA z komponentami degradosomu

Jak wspomniano powyżej, bakteryjne polimerazy poli(A) (PAP), oraz enzymy dobudowujące CCA to bardzo blisko spokrewnione nukleotydylotransferazy klasy II, posiadające wysoce konserwatywną, N - końcową domenę katalityczną. Pomimo podobieństwa strukturalnego ich funkcje znacznie się różnią: PAP dołącza homopolimerowe ogony adenylowe do RNA, natomiast enzymy CCA-NT dokładają sekwencję CCA na końcu 3' tRNA. PAP I z *E. coli* jest w stanie poliadenylować różne

klasy RNA (mRNA, rRNA, tRNA, sRNA) pod warunkiem dostępności końca 3' cząsteczki RNA i ATP jako substratów reakcji. Ogony poli(A) wpływają na stabilność RNA, warunkując jego podatność na degradację, a w warunkach *in vivo* jest równowaga pomiędzy aktywnością poliadenylacyjną białka PAP a aktywnością egzonukleaz, skracających nadmiernie syntetyzowane ogony poli(A) [130]. Dodatkowo, u *E. coli* i wielu innych drobnoustrojów, zarówno PNPaza, wykorzystując odwracalną aktywność polimerazy RNA, jak i bakteryjna polimeraza poli(A) potrafią poliadenylować transkrypty *in vivo*, co podkreśla funkcjonalne powiązanie obu nukleotydylotransferaz w modulacji stabilności RNA. Białko PAP I i helikaza RhlB u *E. coli* mogą współpracować ze sobą podczas procesu poliadenylacji. Helikaza może rozwijać struktury drugorzędowe RNA przy końcu 3' podatnym na działanie PAP. W strukturze PAP I zidentyfikowano regiony odpowiedzialne za wiązanie RNA oraz za oddziaływanie z białkami biorącymi udział w degradacji mRNA, co może wskazywać na potencjał do tworzenia interakcji białko-białko. Obok helikaz RNA z rodziny DEAD-box, które mogą współpracować z PAP I w syntezie poli(A), potencjalnymi kofaktorami współdziałającymi z PAP I jest również RNaza E, która bierze udział w degradacji RNA [130], [131].

Pomimo postępu w badaniach nad degradosomem *H. pylori* i dostępności danych literaturowych dotyczących RNazy J oraz helikazy RhpA wiele aspektów funkcjonowania tej struktury pozostaje niewyjaśnionych. Do tej pory nie scharakteryzowano w sposób kompleksowy: a) wybranych białek *H. pylori* potencjalnie zaangażowanych w procesy metabolizmu RNA w tym białka PNP i b) białka PapS oraz c) ich oddziaływań z helikazą RhpA, co będzie stanowiło podstawę realizacji badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej. Należy zaznaczyć, że chociaż funkcje RNazy J i helikazy RhpA zostały już szczegółowo scharakteryzowane, to wzajemne zależności i sieć interakcji pomiędzy PNPazą, RhpA oraz nukleotydylotransferazą PapS pozostają wciąż nieopisane. Celem niniejszej pracy będzie zatem kompleksowe zmapowanie oddziaływań między tymi trzema białkami oraz określenie ich hierarchii funkcjonalnej, co pozwoli na pełniejsze zobrazowanie organizacji i mechanizmów działania degradosomu RNA-u *H. pylori*.

3. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej jest scharakteryzowanie funkcji wybranych komponentów degradosomu *Helicobacter pylori*, ze szczególnym uwzględnieniem białka PNP i jego znaczenia jako potencjalnego celu terapeutycznego. Ponadto, weryfikacja oddziaływania białek PapS i RhpA oraz określenie funkcji PapS.

Cel pracy osiągnięto poprzez realizację następujących zadań badawczych:

- Wytworzenie i oczyszczenie białek rekombinowanych PNP, RhpA oraz PapS *H. pylori*
- Charakterystyka struktury nukleotydylotransferazy PNP *H. pylori*, kluczowych domen funkcyjnych oraz reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za aktywność enzymatyczną i oddziaływań z innymi elementami degradosomu
- Ocena funkcji białka PapS w regulacji degradacji RNA u *H. pylori*
- Badanie interakcji między białkami RhpA i PapS
- Wyznaczenie specyficzności substratowej białek PNP i PapS wobec RNA
- Przeprowadzenie testów przesiewowych w celu wyłonienia inhibitorów PNPazy
- Uzyskanie szczepów delecyjnych *H. pylori* pozbawionych genów kodujących białka PNP, RhpA i PapS.
- Analiza fenotypowa i funkcjonalna szczepu delecyjnego pozbawionego genu kodującego białko PNP.
- Ocena roli wybranych komponentów degradosomu RNA *H. pylori* w odpowiedzi na czynniki stresowe
- Ocena możliwości wykorzystania PNPazy jako celu terapeutycznego

4. Materiały

4.1 Szczepy bakteryjne

Gatunek	Nazwa szczepu	Charakterystyka	Źródło
<i>H. pylori</i>	26695 Wild-type (szczep dziki)	ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Wirginia, USA 26695	Pracownia Biochemii Białek i Kwasów Nukleinowych (PBBiKN) Uniwersytet Gdański (UG)
<i>H. pylori</i>	G27 Wild-type (szczep dziki)	ATCC G27	PBBiKN, UG
<i>H. pylori</i>	G27 Δpnp	Szczep z delecją w obrębie genu <i>pnp</i> , <i>hp_1213</i>	Powstały w toku prac eksperymentalnych
<i>H. pylori</i>	G27 $\Delta rhpA$	Szczep z delecją w obrębie genu <i>rhpA</i> , <i>hp_0247</i>	Powstały w toku prac eksperymentalnych
<i>H. pylori</i>	26695 $\Delta papS$	Szczep z delecją w obrębie genu <i>paps</i> , <i>hp_0640</i>	Powstały w toku prac eksperymentalnych
<i>E. coli</i>	One Shot™ TOP10 chemically competent (komórki kompetentne)	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ -rpsL(StrR) endA1 nupG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts USA
<i>E. coli</i>	One Shot™ BL21™ (DE3) chemically competent (komórki kompetentne)	F-ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm me131 (DE3)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

4.2 Spis oligonukleotydów syntetycznych wykorzystanych w amplifikacji DNA

Gen	Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'	Zastosowanie
<i>hp_0247</i> (<i>rhpa</i>)	0247_delta_F	GAAACGATAGCCCCTTGAGC	Przygotowanie szczepu delecyjnego <i>H. pylori</i> $\Delta rhpA$
<i>hp_0247</i> (<i>rhpa</i>)	0247_delta_R	GCGCTTAATGGGTAAATCTTCAG	
<i>hp_0247</i> (<i>rhpa</i>)	kan_cass_0247_F	CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAGGGA ATAGAAATTGACGCGATTCAAACC	
<i>hp_0247</i> (<i>rhpa</i>)	delta_0247_kanR_R	CTCATTTTAGCCATTATTCTCCTAGTTAGT CACGGAATGGCCTTCTTGAATGG	
<i>hp_1213</i> (<i>pnp</i>)	1213_kan_R	CTCATTTTAGCCATTATTCTCCTAGTTAGT CACGGAATGGCCTTCTTGAATGG	Przygotowanie szczepu delecyjnego <i>H. pylori</i> Δpnp
<i>hp_1213</i> (<i>pnp</i>)	kan_cass_1213_F	CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAGGGA ATAGAAATTGACGCGATTCAAACC	
<i>hp_1213</i> (<i>pnp</i>)	1213_select_F	CTTACCCCTGGATTTCGTCAAAG	
<i>hp_1213</i> (<i>pnp</i>)	1213_selection_R	CTAAACTGAATTCTGAGTGGGC	
<i>hp_0640</i> (<i>paps</i>)	0640_select_F	GATTGATCCTTTTAAAGGGCAGAATG	Przygotowanie szczepu delecyjnego <i>H. pylori</i> $\Delta paps$
<i>hp_0640</i> (<i>paps</i>)	HP0640_del_R	GCATACCTTCCCCATTCAACC	
<i>hp_0640</i> (<i>paps</i>)	kan_cass_0640_F	CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAGGGA ATAGAAATTGACGCGATTCAAACC	
<i>kanr</i>	197F_STOPkod_kas_kan_F	TACTAACTAGGAGGAATAAATGG	Kaseta kanamycynowa
<i>kanr</i>	190R_kas_kan_R	TATTCCTCCAGGTACTAAAAC	
<i>hp_1213</i>	For PNPHpy_XhoI	CCGGCTCGAGCATGGATTTTATCACCATCAA TTCTAG	Namnożenie genu w celu nadprodukcji białka rekombinowanego PNP <i>H. pylori</i>
<i>hp_1213</i>	Rev_PNPHpy_BamHI	GCGCGGATCCTTAAGCCAAATCTAAAGCGA TTTTACC	
<i>hp_0247</i>	HP0247REV_BAMHI	GCGCGGATCCTTAACGGCGTTTGGGTTTTTT AG	Namnożenie genu w celu nadprodukcji białka rekombinowanego RhpA <i>H. pylori</i>
<i>hp_0247</i>	HP0247FOR_XHOI	CCGGCTCGAGCATGGAATTGAATCAACCAC CACTC	
<i>hp_0640</i>	PAPSBH1FORF1	AGGATCCTAAATTTAAGGCATGCTC	Namnożenie genu w celu nadprodukcji białka rekombinowanego PapS <i>H. pylori</i>
<i>hp_0640</i>	PAPSH3REVF2	AAAGCTTCCCAATCCTTTTGGGAAATACGA	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	VECTORSlicFOR	TCTGCGTGGTCACATCCTCAATTTTG	Przywrócenie ekspresji genu <i>pnp</i> w szczepie komplementacyjnym <i>H.pylori</i> G27 Δpnp^{++}
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	VECTORSlicREV	ATCAAGGTTGGATGTAATTGTAGCA	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	VECTORBammHIFLAG FOR	GGAAGGATCCAGATCCTGACTAACTAGGAG GAATAAGTG	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	VECTORNdeIFLAGREV	AAGGCATATGATTCTCCTATTCGATATCAAG GTTGGATGTAATTGTAGCA	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	SLICStrepForPNP	TGCTACAATTACATCCAACCTTGATATCGAA TAGGAGAATCATATGGATTTTATCACCATCA ATTG	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	SLICStrepRevPNP	CAAAATTGAGGATGTGACCACGCAGAAGCCA AATCTAAAGCGATTTTACC	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	RevBamHIFLAGPNP	CTGGATCCTCAAGCCAAATCTAAAGCGATT TTAC	
<i>Hp_121</i> <i>3_compl</i>	FLAGNdeIPNP	ATCATATGGACTACAAAGACCATGACGGTG ATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGG ATG	

Powyższe startery oligonukleotydowe zostały zaprojektowane *in silico* a ich synteza zlecona firmie Merck, St. Louis, Missouri, USA

4.3 Inne oligonukleotydy syntetyczne

Nazwa	Sekwencja 5'→3'	Zastosowanie
ExoSubstrateLongHEX	[HEX]ACAGUAUUUGGUAC UGCGCUCU	Fluorescencyjnie znakowany oligonukleotyd syntetyczny (HEX- 6-Carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein) stosowany jako substrat w analizie poliadenylacji i degradacji przez białko PNP <i>H. pylori</i>
ExoSubstrate [ssDNA(ExoSubstrate)]	ACAGTATTTGGTACTGCGC TCT	Oligonukleotyd syntetyczny wykorzystywany w reakcjach poliadenylacji oraz degradacji po uprzednim namnożeniu
Substraty rybo-oligonukleotydowe znakowane Cy5	[Cy5]C0-; [Cy5]CC-; [Cy5]C-	Substraty rybo-oligonukleotydowe znakowane na końcu 5' fluoroforem Cy5: [Cy5]C0-, [Cy5]CC- oraz [Cy5]C- [129] oligonukleotydy te stanowiły substraty do analizy aktywności dodawania końcowej sekwencji CCA do tRNA przez białko PapS z <i>H. pylori</i>

Powyższe substraty zostały zakupione w firmie Merck

4.4 Wektory plazmidowe

Nazwa	Charakterystyka	Źródło
pJET1.2/blunt Cloning Vector	Wektor wysokokopijny przeznaczony do wydajnego klonowania fragmentów DNA o tępych końcach. Zawiera promotor T7 oraz kasetę oporności na ampicylinę (AmpR)	Thermo Fisher Scientific
pET-29b (+) DNA	Wektor ekspresyjny z promotorem T7, przeznaczony do wysokowydajnej ekspresji białek w komórkach bakteryjnych. Zawiera kasetę oporności na kanamycynę (KanR)	Novagen, Billerica, Massachusetts, USA
Zmodyfikowany plazmid pUC19	wektor plazmidowy na bazie wektora pUC19 w celu komplementacji genu PNP u <i>H. pylori</i> , zmodyfikowany przez dr U. Zarzecką, Uniwersytet Gdański	PBBiKN, UG

4.5 Enzymy oraz enzymy restrykcyjne

Nazwa	Zastosowanie	Źródło
HindIII	Trawienia restrykcyjne wykorzystywane w klonowaniu molekularnym w celu produkcji białek rekombinowanych. Endonukleaza typu II z <i>Haemophilus influenzae</i> rozpoznaje 5'-AAGCTT-3', tnie pomiędzy A-A; tworzy lepkie końce.	Thermo Fisher Scientific
BamHI	Trawienia restrykcyjne wykorzystywane w klonowaniu molekularnym w celu produkcji białek rekombinowanych. endonukleaza typu II z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; rozpoznaje 5'-GGATCC-3', tnie między G-G; tworzy lepkie końce.	Thermo Fisher Scientific
XhoI	Trawienia restrykcyjne wykorzystywane w klonowaniu molekularnym w celu produkcji białek rekombinowanych. endonukleaza typu II z <i>Xanthomonas holcicola</i> ; rozpoznaje 5'-CTCGAG-3', tnie między C-T; tworzy lepkie końce.	Thermo Fisher Scientific
Lizozym	Liza bakterii, trawienie peptydoglikanu ściany komórkowej podczas oczyszczania białek rekombinowanych	Merck
Endonukleaza Benzonase®	Enzym nukleolityczny; stosowany do zmniejszenia lepkości zawiesiny bakteryjnej przy oczyszczaniu białek rekombinowanych	Merck
Ligaza T4 DNA	Ligacja fragmentów DNA	Thermo Fisher Scientific
Proteaza Ulp1 (proteaza SUMO)	Proteaza z <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , rozcina wiązanie izopeptydowe między białkiem SUMO (ang. Small Ubiquitin-like Modifier) a jego białkiem docelowym. Precyzyjnie odcina domenę SUMO wraz z His-tagiem z białek fuzyjnych, umożliwiając uzyskanie natywnego białka bez dodatkowych reszt aminokwasowych.	Thermo Fisher Scientific

4.6 Bufory i roztwory

4.6.1 Bufory do elektroforezy

O ile nie zaznaczono inaczej, podane wartości dla np. substratów, enzymów i inhibitorów oznaczają stężenia końcowe w mieszaninie reakcyjnej (jednostki molowe, tj. μM , nM, pM), wynikające z definicji jako ilość substancji w przeliczeniu na 1 L. Dla uproszczenia pominięto zapis „/L”.

- Bufor 10 x stężony TAE (z ang. Tris-Acetate-EDTA) do elektroforezy DNA w żelu agarozowym (Thermo Fisher Scientific)

- Bufor 10 x stężony TBE (z ang. Tris-Borate-EDTA) do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z mocznikiem (z ang. UREA-PAGE) (Thermo Fisher Scientific)
- Bufor 10 x stężony TGE (z ang. Tris-Glycine-EDTA) do elektroforezy SDS-PAGE (z ang. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Biorad, Hercules, California, USA)
- Bufor obciążający 6x stężony do elektroforezy DNA (Thermo Fisher Scientific)
- Bufor denaturujący 5x stężony do elektroforezy białek metodą SDS-PAGE, Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- Bufor obciążający 2x stężony do elektroforezy UREA-PAGE:

Formamid 95% (Thermo Fisher Scientific)	91,2% v/v
EDTA (kwas wersenowy) (Thermo Fisher Scientific)	20 mM
Oranż G (Thermo Fisher Scientific)	0,4% w/v

4.6.2 Bufory do trawień restrykcyjnych

- Bufor 10x do trawień restrykcyjnych, FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Bufor 10x do trawień restrykcyjnych z buforem obciążającym, FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.6.3 Bufory do oczyszczania białek rekombinowanych

- **Bufor wiążąco-płuczący A** do oczyszczania białek na złożu kobaltowym ze znacznikiem histydynowym (metką His-Tag)

Tris-HCL pH 7.5(Merck) lub Tris-Cytrynian	50mM
pH 9.0 (Merck)	
NaCl (Chempur, Polska)	500mM
Imidazol (Thermo Fisher Scientific)	10mM
Glicerol (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)	10%
β-merkaptotanol (Thermo Fisher Scientific)	2mM
Tabletki z inhibitorami proteaz, wolne od EDTA (Thermo Fisher Scientific)	1 tabletka/50ml buforu

- **Bufor elucyjny B** do oczyszczania białek na złożu kobaltowym z metką His-Tag

Tris-HCL pH 7.5 (Merck) lub Tris-Cytrynian pH 9.0	50mM
(Merck)	
NaCl (Warchem, Polska)	500mM
Imidazol (Thermo Fisher Scientific)	300mM
Glicerol (Warchem)	10%

- **Bufor do lizy komórek *E. coli*** w celu oczyszczania białek rekombinowanych

Bufor A	30 ml
Triton X-100(Polaura, Polska)	0,2%
Lizozym (Merck)	0,2 mg/ml
Endonukleaza Benzonase® (Merck)	1μl/100 ml buforu

- **Bufor A do zawieszania** produktu po oczyszczeniu na kolumnie metalopowinowactwa

Tris-HCL pH 7.5 (Merck) lub Tris-Cytrynian pH 9.0	50mM
(Merck)	
Glicerol (Warchem)	10%

- **Bufor QA** do oczyszczania białek na kolumnie chromatograficznej do wymiany jonowej

Tris-HCL pH 7.5 (Merck) lub Tris-Cytrynian pH 9.0	50mM
(Merck)	
NaCl (Warchem)	50mM
Glicerol (Warchem)	10%
β-merkaptioetanol (Thermo Fisher Scientific)	2mM

- **Bufor QB** do oczyszczania białek na kolumnie chromatograficznej do wymiany jonowej

Tris-HCL pH 7.5 (Merck) lub Tris-Cytrynian pH 9.0	50mM
(Merck)	
NaCl (Warchem)	1000mM
Glicerol (Warchem)	10%
β-merkaptioetanol (Thermo Fisher Scientific, USA)	2mM

- **Bufor SEC** do oczyszczania białek na kolumnie chromatograficznej do filtracji żelowej

Tris-HCL pH 7.5/ Tris-Cytrynian pH 9.0 lub	
Tris-Cytrynian pH 9.0	50mM
NaCl (Warchem)	150mM
Glicerol (Warchem)	10%
β-merkaptotetanol (Thermo Fisher Scientific)	1mM

4.6.4 Bufory reakcyjne do oznaczania aktywności polimerazowej i degradacyjnej białka PNP

- **Bufor 2x stężony AP** do oznaczania aktywności polimerazowej białka PNP

Tris-HCL pH 8.0	40mM
MnCl ₂ (Chempur)	20mM
Cytrynian żelaza (III) (Chempur)	10mM

- **Bufor 2x stężony AD** do oznaczania aktywności degradacyjnej białka PNP

PBS (Merck)	1x
MgCl ₂ (Chempur)	40mM
Cytrynian żelaza(III) (Chempur)	10mM

4.6.5 Bufory do metody Western-Blotting

- 10 x stężony bufor TG (ang. Tris-Glycine) (Biorad)
- 1 x stężony bufor do transferu

10 x bufor TG	1x
Metanol (Chempur)	20%

- 10 x stężony bufor TBS (z ang Tris buffered saline) (Merck)
- 1 x stężony bufor TBST (z ang. Tris-buffered saline with Tween 20)

10 x bufor TBS	1x
Tween-20 (Merck)	0,05%

- Bufor do rozcieńczania przeciwciał

Bufor TBST	1x
Albumina bydlęca BSA (z ang. Bovine serum albumin) (Thermo Fisher Scientific)	2,5%

- Bufor blokujący do membran nitrocelulozowych:

Bufor TBST	1x
Albumina bydlęca BSA (Thermo Fisher Scientific)	5%

4.6.6 Pozostałe bufory i roztwory

- 10 x stężony PBS (z ang. phosphate buffered saline) (Merck)
- Tris-Cytrynian 1M pH 9.0

Tris (Merck)	29,1g
Bezwodny kwas cytrynowy (Polaura)	5,2 g
Woda	do 1 L

- Tris-HCL 1M pH 7.5

Tris (Merck)	12,1g
Kwas HCL 1M (Polaura)	8 ml
Woda	do 1 L

- Bufor TE (z ang. Tris-EDTA)

Tris (Merck)	20 mM
EDTA (Invitrogen)	1 mM

- Bufor do lizy *H. pylori*

Na ₂ PO ₄ (Chempur)	50 mM
Triton X-100 (Merck)	0,1%
Lizozym (Merck)	0,5 mg/ml
Inhibitory proteaz (Thermo Fisher scientific)	1 tabl./50 ml

- Bufor do preparatyki białek do techniki CryoEM (mikroskopii krioelektronowej)
5 x stężony

Tris-HCL pH 7,5	100 mM
MgCl ₂ (Chempur)	12,5 mM
KCl (Chempur)	
TCEP (ang. Tris(2-carboxyethyl)phosphine) (Thermo Fisher Scientific)	750 mM
	5 mM

- **Bufor C** do oznaczania aktywności dodającej CCA do końca tRNA przez białko PapS *H. pylori*

Tris-HCL pH 9,0	20 mM
MgCl ₂ (Chempur)	12,5 mM
NaCl (Chempur)	50 mM
EDTA (Invitrogen)	0,1 mM
DTT (Chempur)	2mM
Glicerol (Chempur)	17%

4.7 Żele do rozdzielania elektroforetycznego

- 1% Żel agarozowy do rozdzielania DNA o wielkości ≥ 500 pz.

Tabletki Agarozowe TopVision (Thermo Fisher Scientific)	2 tabletki
1 x bufor TAE	Do 100 ml

- 2% Żel agarozowy do rozdzielania DNA o wielkości ≤ 500 pz.

Tabletki Agarozowe TopVision (Thermo Fisher Scientific)	4 tabletki
1 x bufor TAE	Do 100 ml

- Żel poliakrylamidowy do rozdzielania białek zatężający

Akrylamid/bis-akrylamid (Thermo Fisher Scientific)	5 %
Tris-HCL pH 6.8	0,1 M
SDS (Invitrogen)	0,1 %
APS (ang. Ammonium persulfate) (Invitrogen)	0,1 %
Tetrametyloetylenodiamina - TEMED (Invitrogen)	0,1%

- 10% żel poliakrylamidowy do rozdzielania białek

Akrylamid/bis-akrylamid (Thermo Fisher Scientific, USA)	10 %
Tris-HCL pH 8.8	0,375 M
SDS (Invitrogen)	0,1 %
APS (Invitrogen)	0,1 %
TEMED (Invitrogen)	0,05%

- Żel poliakrylamidowy do metody UREA-PAGE

Akrylamid/bis-akrylamid (Thermo Fisher Scientific)	10 %
Bufor TBE	1 x stężony
SDS	0,1 %
Mocznik	8 M
APS (Invitrogen)	0,1 %
TEMED (Invitrogen)	0,05%

4.8 Mieszanki reakcyjne

4.8.1 Trawienia restrykcyjne

Bufor reakcyjny 10x FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA)	1x
DNA	1-5 µg
Enzym restrykcyjny FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA)	0,5 µl
Woda	Do 20 µl

4.8.2 Reakcje PCR

- Polimeraza Phusion™ Master-mix

2x stężona Polimeraza Phusion™ Master-mix (Thermo Fisher Scientific)	25 µl
Matrycowy DNA	25 ng
Starter sensowny (ang. forward)	0,5 µM
Starter antysensowny (ang. reverse)	0,5 µM
Woda	Do 50 µl

- Polimeraza Red-Taq Master-mix

2x stężona Polimeraza Red-Taq Master-mix (VWR)	25 µl
Matrycowy DNA	25 ng
Starter Forward	0,5 µM
Starter Revers	0,5 µM
Woda	Do 50 µl

- Polimeraza Q5® Master-mix

2x stężona Polimeraza Q5® Master-mix (New England Biolabs)	25 µl
Matrycowy DNA	25 ng
Starter komplementarny do nici matrycowej w kierunku 5' → 3'	0,5 µM
Starter komplementarny do nici matrycowej w kierunku 3' → 5'	0,5 µM
Woda	Do 50 µl

4.8.3 Reakcje poliadenylacji i degradacji UREA-PAGE

- Reakcja polimeryzacji

2x stężony bufor AP	25 µl
Znakowany substrat RNA ExoPoli(A)[Hex]	0,25 µM
ADP	0,5 µM
Białko PNP <i>H. pylori</i>	5 µM
Inhibitor/DMSO (ang. Dimethyl sulfoxide)	1 µM/4%
Woda	Do 50 µL

- Reakcja degradacji

2x stężony bufor AD	25 µl
Wydłużony, znakowany substrat RNA	
ExoPoli(A)[Hex] - Oligo-poli(A)*	0,25 µM
Białko PNP <i>H. pylori</i>	5 µM
Inhibitor/DMSO	1 µM/4%
Woda	Do 50 µL

4.8.4 Reakcje polimeryzacji i degradacji *in vitro*

- Reakcja polimeryzacji

2x stężony bufor AP	25 µl
ssDNA - jednoniciowy DNA (z ang. single-stranded DNA)	0,25 µM
ADP	2 mM
Tioflawina T	1%
Białko PNP <i>H. pylori</i>	5 µM
Inhibitor/DMSO	1 µM/4%
Woda	Do 50 µL

- Reakcja degradacji

2x stężony bufor AD	25 µl
Wydłużone ssDNA (PoliA)	0,25 µM
Tioflawina T	1%
Białko PNP <i>H. pylori</i>	5 µM
Inhibitor/DMSO	1 µM/4%
Woda	Do 50 µL

4.9 Standardy wielkości

- **Standard wielkości DNA** - GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) - fragmenty DNA o wielkościach: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz.
- **Standard wielkości białek rekombinowanych** - PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) - białka rekombinowane o wielkościach: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 180 kDa.

4.10 Podłoża mikrobiologiczne

- Podłoże płynne Luria-Bertani (LB) (Merck)
- Podłoże SOC (z ang. Super Optimal broth with Catabolite repression) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

- Podłoże płynne BB (z ang. Brucella-Broth) (BB) (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Podłoże agarowe stałe LB (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Podłoże agarowe stałe GC (z ang. Gonococcal agar) (BD)
- Podłoże płynne Stuart'a

Składnik	Ilość na 1L podłoża
Na ₂ HPO ₄ (Chempur)	9,5 g
KH ₂ PO ₄ (Chempur)	9,1 g
Czerwień fenolowa (Merck)	0,1 g
Mocznik (Chempur)	20 g
Ekstrakt drożdżowy (Merck)	0,1 g

- Podłoże półpłynne Brucella

Składnik	Ilość na 1L podłoża
Podłoże płynne BB	Wg instrukcji producenta
Agar (Merck)	0,35%

- Zmodyfikowane podłoże płynne MTB (z ang. Modified Terrific Broth) do namnażania *E. coli* w celu otrzymania biomasy bakteryjnej do oczyszczania białek rekombinowanych:

Składnik	Ilość na 1L podłoża
K ₂ HPO ₄ (Chempur)	8 g
KH ₂ PO ₄ (Chempur)	2 g
NH ₄ Cl (Chempur)	3 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Chempur)	3 g
K ₂ SO ₄ (Chempur)	0.9 g
FeNH ₄ (Chempur)	0.15 g
Ekstrakt drożdżowy (Merck)	24 g
Trypton (Merck)	20 g
Glicerol (PolAura)	4 ml
1M MgSO ₄ (Chempur)	2 ml
1M CaCl ₂ (Chempur)	100 µl
Pierwiastki śladowe (ang.Trace Elements) (Thermo Fisher Scientific)	100 µl
Głukoza 30% (Merck)	6.66 ml

4.10.1 Suplementy do podłoży mikrobiologicznych

- Antybiotyki selekcyjne

Nazwa	<i>E. coli</i>	<i>H. pylori</i>
Ampicylina (PolAura, Polska)	100 µg/ml	-
Kanamycyna (PolAura, Polska)	50 µg/ml	15 µg/ml
Apramycyna (Thermo Fisher Scientific)	100 µg/ml	40 µg/ml
Suplement antybiotyczny Skirrow (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania)	-	1 fiołka/500ml podłoża

- Inne suplementy do podłożycr mikrobiologicznych

Nazwa podłoża	Suplement	Ilość
Podłoże płynne Brucella-Broth (BB) (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)	10% inaktywowana surowica z płodów bydlęcych FBS (z ang. fetal bovine serum) (Thermo Fisher Scientific)	10% v/v
Podłoże agarowe stałe GC Agar (BD)	10% inaktywowana surowica z płodów bydlęcych FBS (Thermo Fisher Scientific)	10% v/v
Podłoże płynne LB lub MTB	Izopropyl β-D-1-tiogalaktozyd - IPTG (Thermo Fisher Scientific)	0,1 mM

4.11 Komercyjne zestawy odczynnikowe o zdefiniowanym składzie

Nazwa	Opis	Producent
Plasmid Mini	Zestaw do izolacji plazmidowego DNA	A&A Biotechnology, Gdynia, Polska
Gel-Out	Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego	A&A Biotechnology, Gdynia, Polska
Clean-up	Zestaw do oczyszczania DNA po reakcji PCR i innych reakcjach enzymatycznych	A&A Biotechnology, Gdynia, Polska
His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation	Zestaw do znakowania białek zawierających metkę histydynową w celu analizy interakcji białko-białko	NanoTemper Technologies, Monachium, Niemcy
riboPOOL™ Kit	Zestaw do rybodeplekcji po izolacji RNA	siTOOLS Biotech, Planegg, Niemcy
MagListo 5M DNA/RNA Extraction Kit	Zestaw do izolacji całkowitego DNA/RNA	Bioneer, Alameda, Kalifornia, USA
CloneJET PCR Cloning Kit	Zestaw do klonowania fragmentów DNA zawierający polimerazę T4 DNA oraz wektor Pjet1.2	Thermo Fisher Scientific
KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR)	Zestaw do przygotowywania bibliotek do sekwencjonowania RNA-seq	Roche, Bazylea, Szwajcaria
Złoże magnetyczne VAHTS DNA Clean Beads	Złoże magnetyczne do izolacji kwasów nukleinowych	Vazyme, Nankin, Chiny
Biblioteka związków chemicznych MedChem Express. (nr kat. HY-L001P).	Biblioteka związków chemicznych stosowana w testach poszukiwania inhibitorów białka PNP <i>H. pylori</i>	MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, USA

4.12 Odczynniki chemiczne

Nazwa	Producent
Odczynnik Bradford (do oznaczania białka metodą kolorymetryczną)	Chempur
Złoże kobaltowe HisPur™ Cobalt Resin	Thermo Fisher Scientific
Akrylamid/bis-akrylamid 29:1	Biorad, USA
Akrylamid/bis-akrylamid 19:1	Thermo Fisher Scientific
Formamid 95%	Thermo Fisher Scientific
Woda wolna od DNaz i RNaz (Ultra-Pure DNase/RNase free)	Thermo Fisher Scientific
Etanol 99%	Chempur
Mocznik	PolAura
Etanol 96%	PolAura
Chloroform	PolAura
Izopropanol	PolAura
TRIzol™	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, USA
NaCl	Chempur
Glicerol	Chempur
HCL	Chempur
NaOH	Chempur
KOH	Chempur
APS (nadsiarczan amonu)	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Thermo Fisher Scientific
CaCl ₂	Chempur
CH ₃ COOK	Thermo Fisher Scientific
DMSO	Chempur
DTT	Thermo Fisher Scientific
EDTA	PolAura
β-merkaptotetanol	Thermo Fisher Scientific
IPTG	Thermo Fisher Scientific
Glukoza	Chempur
Imidazol	Thermo Fisher Scientific
MgCl ₂ (chlorek magnezu)	Chempur
MgSO ₄ (siarczan magnezu)	Chempur
MnCl ₂ (chlorek manganu)	Chempur
Cytrynian żelaza(III)	Chempur
SDS	Thermo Fisher Scientific
TRIS	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100	Merck
Tween-20	Merck

Trypton	Merck
Wyciąg drożdżowy	Merck
Kanamycyna	PolAura
Ampicylina	PolAura
Apramycyna	Thermo Fisher Scientific
Tioflawina T	Thermo Fisher Scientific
Oranż G (z ang. Orange G)	Thermo Fisher Scientific
FeNH ₄ (siarczan amonowo żelazowy)	Chempur
K ₂ HPO ₄ (fosforan dipotasu)	Chempur
KH ₂ PO ₄ (diwodorofosforan potasu)	Chempur
NH ₄ Cl (chlorek amonu)	Chempur
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (cytrynian sodu)	Chempur
K ₂ SO ₄ (siarczan potasu)	Chempur
ADP	Thermo Fisher Scientific
ATP	Thermo Fisher Scientific
Polimeraza Q5	New England Biolabs, Wielka Brytania
Polimeraza Red-taq	VWR International, Radnor, Pensylwania, USA
Polimeraza DNA Phusion o wysokiej wierności	Thermo Fisher Scientific
SYBR™ Safe (fluorofor do barwienia kwasów nukleinowych)	Thermo Fisher Scientific
GlycoBlue™ (niebieski barwnik kowalencyjnie związany z glikogenem)	Thermo Fisher Scientific
Mag-Bind® TotalPure NGS	Omega Bio-Tek, Norcross, Georgia, USA
SimplyBlue™ SafeStain	Thermo Fisher Scientific
RbCl (Chlorek rubidu)	Thermo Fisher Scientific
MOPS (kwas 4-morfolinopropanosulfonowy)	Thermo Fisher Scientific
30% nadtlenek wodoru	Chempur
kwas octowy	Chempur
Na ₂ PO ₄	Chempur
DTT	Thermo Fisher Scientific
Czerwień fenolowa	Merck
TCEP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
3M Octan sodu	Invitrogen
Woda wolna od nukleaz	Invitrogen
1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution (roztwór do chemicznej detekcji peroksydazy chrzanowej)	Thermo Fisher Scientific
AlamarBlue (resazuryna)	Thermo Fisher Scientific
Roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami - PBS	Merck

4.13 Przeciwciała

Nazwa	Producent
Pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko-Strep-tag (Anti-Strep-tag II antibody)	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
Drugorzędowe kozie przeciwciała przeciwko-mysim immunoglobulinom klasy IgG z peroksydazą chrzanową (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP)	Invitrogen

4.14 Pozostałe materiały

Nazwa	Producent
Koncentraty Vivaspin® 20, 30 kDa MWCO	Cytiva, Massachusetts, USA
Stawy do separacji magnetycznej MagnaRack™	Invitrogen
Kuwety ze szkła kwarcowego	Chemland
Filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 µm	Genoplast, Rokietnica, Polska
System do filtracji o średnicy porów 0,22 µm	NEST, Rahway, New Jersey, USA
Bibuła Wattmana	Merck
Membrana nitrocelulozowa	Merck
Butelki hodowlane z filtrem 25, 75 cm ²	Nunc, Roskilde, Dania
Jednorazowe, laboratoryjne materiały plastikowe (próbówki wirówkowe typu Falcon, Eppendorf, pipety serologiczne, pipety Pasteura, szalki Petriego, kuwety spektrofotometryczne, płytki 96-dółkowe, próbówki do reakcji PCR, wymazówki, ezy, głaszczki)	Genoplast VWR International Thermo Fisher Scientific
Saszetki do generowania atmosfery mikroaerofilnej Campygen	Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania

4.15 Aparatura badawcza

Nazwa	Producent
System chromatografii cieczowej FPLC ÄKTA GO - (ang. Fast Protein Liquid Chromatography)	Cytiva
Termocykler EDVOTEK 540	Edvotek, Waszyngton D.C., USA
Kołyśka laboratoryjna Rocker 25	Labnet, Edison, New Jersey, USA
Inkubator Galaxy 45 S	Thermo Fisher Scientific
Inkubator Infors HT Multitrone z wytrząsaniem	Infors HT, Bottmingen, Szwajcaria
Cieplarka HERATharm	Thermo Fisher Scientific
Spektrofotometr SpectraMax i3	Molecular Devices, USA
Urządzenie do obrazowania żeli Azure 500	Syngen Biotech, Polska
Analizator Monolith NT.115 system do termoforezy mikroskalowej MST (ang. Microscale Thermophoresis)	NanoTemper Technologies, Monachium, Niemcy
Wirówka laboratoryjna Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Niemcy

Wirówka laboratoryjna MPW-260R	MPW, Warszawa, Polska
Homogenizator wysokociśnieniowy Constant Cell Disruption System T5/40/AE/GA	Constant Systems, Wielka Brytania
Homogenizator Mini Bead Mill Homogenizer-100	VWR
Aparat do oceny integralności RNA Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA
Aparat do rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym CleaverScientific LTR MiniRunView-B	Cleaver Scientific, Rugby, Wielka Brytania
Aparat do rozdzielania elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) Mini-PROTEAN	Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone
Aparat do rozdzielania elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym z mocznikiem w warunkach denaturujących (UREA-PAGE) ASG-250 Adjustable Vertical Slab Gel System	C.S.B, Cupertino, Kalifornia USA
Zasilacz do rozdzielania elektroforetycznego Consort EV2650	Consort, Turnhout, Belgia
Kolumna chromatograficzna jonowymienna HiTrap Q FF	Cytiva
Kolumna chromatograficzna jonowymienna HiTrap SP	Cytiva
Kolumna chromatograficzna do filtracji żelowej Superdex™ 75 10/300 GL	Cytiva
Komora z laminarnym przepływem powietrza	Alpina, Żory, Polska
Waga laboratoryjna Radwag WPS 60/c	Radwag, Radom, Polska
Cieplarka laboratoryjna HeraTerm IGS100	Thermo Fisher Scientific
Inkubator laboratoryjny New Brunswick Galaxy 48 R	Eppendorf
Mieszadło magnetyczne MSL25 Digital	VELP Scientifica, Usmate Velete, Włochy
pH-Metr cyfrowy FiveEasy	Mettler Toledo, Greifensee, Szwajcaria
Autoklaw Classic 2100	Prestige Medical, Blackburn, Wielka Brytania
Mieszadło typu vortex ZX3	VELP Scientifica, Usmate Velete, Włochy
Densytometr DEN 1B	Biosan, Ryga, Łotwa
Spektrofotometr do pomiaru stężenia DNA/RNA BioDrop Duo	BioDrop, Wielka Brytania
Termomieszadło - ThermoMixer C	Eppendorf
Crosslinker Hoefer UVC 500 (naświetlarka UV)	Hoefer, Niemcy
Sekwenator Oxford Nanopore Technologies MinION™	Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oksford, Wielka Brytania

5. Metody

5.1 Hodowle bakteryjne

5.1.1 Hodowla *E. coli*

Szczepy *E. coli* (One Shot™ TOP10, One Shot™ BL21 Star™ (DE3)) hodowano w płynnym podłożu LB lub na podłożu LB zestalonym 1,5% agarem, z dodatkiem lub bez dodatku antybiotyków selekcyjnych (kanamycyna, ampicylina, apramycyna). Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny lub w temperaturze 25°C przez 24 godziny po indukcji IPTG szczepu BL21 Star™ w celu nadprodukcji białka rekombinowanego. Hodowle płynne wytrząsano przy 140 obr./min.

5.1.2 Hodowla *H. pylori*

Szczepy *H. pylori* (G27 i 26695) hodowano w podłożu płynnym Brucella Broth (BB) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (FBS) lub na podłożu stałym GC, z dodatkiem 10% FBS. Szczepy na podłożu płynnym poddawano wytrząsaniu 140 obr./min. Oba typy hodowli inkubowano w 37°C do 72 godziny w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂) używając generatora atmosfery Campygen (Oxoid) lub bezpośrednio w atmosferze inkubatora o podwyższonej zawartości CO₂ (10%). Szczepy delecyjne *H. pylori* (Δpnp , $\Delta rhpA$, $\Delta papS$) hodowano w tych samych warunkach, z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego - kanamycyny w stężeniu 15 µg/ml.

Pierwsze pasaży po rozmrożeniu szczepów przechowywanych w -80°C, prowadzono w obecności selekcyjnej mieszanki antybiotykowej Skirrow (Oxoid) w ilości zgodnej z instrukcją producenta (1 fiolka na 500ml podłoża płynnego). Dwa ostatnie pasaży przed rozpoczęciem analiz fenotypowych oraz sekwencjonowania RNA prowadzono bez dodatku antybiotyków, aby wykluczyć wpływ ich obecności na fizjologię komórek oraz uniknąć zakłóceń w interpretacji wyników eksperymentalnych wynikających z działania czynników selekcyjnych.

5.1.3 Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*

Komórki kompetentne *E. coli* One Shot™ TOP oraz *E. coli* 10 One Shot™ BL21 Star™ przygotowano z wykorzystaniem chlorku rubidu w oparciu o protokół autorstwa Sharma N. i wsp. [132]. W skrócie, chlorek rubidu używano w celu zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej dla plazmidowego DNA, wspomagając proces

transformacji chemicznej. Po zakończeniu procedury, komórki schładzano na lodzie, porcjowano i przechowywano w -80°C do kolejnych eksperymentów.

5.1.4 Transformacja naturalna *H. pylori* w celu uzyskania szczepów delecyjnych

Bakterie *H. pylori* wykazują zdolność do naturalnej transformacji, między innymi z wykorzystaniem egzogenego materiału genetycznego. W celu transformacji, szczepy *H. pylori* hodowano przez 48 godzin na podłożu GC agar z dodatkiem 10% surowicy płodów bydlęcych (FBS), dla uzyskania jednorodnej powierzchniowej hodowli bakteryjnej. Następnie gęstwę bakterii pobierano jałową wymazówką i наносzono na świeże płytki z tym samym podłożem, tworząc zagęszczone pola inokulacyjne. Płytki inkubowano przez 3 godziny w temperaturze 37°C, w warunkach mikroaerofilnych. Na każde pole inokulacyjne наносzono po 10 µg oczyszczonego produktu reakcji PCR (opisanego w podrozdziale 5.2.12) i kontynuowano inkubację do 3 dni. Następnie pola inokulacyjne zbierano jałową wymazówką i rozprowadzano w formie posiewu powierzchniowego na nowe płytki GC agar z dodatkiem 10% FBS oraz antybiotyku selekcyjnego — kanamycyny (10 µg/ml) oraz/lub apramycyny (15 µg/ml). Inkubację prowadzono do 5 dni w temperaturze 37°C w warunkach mikroaerofilnych, do momentu pojawienia się pojedynczych kolonii. Uzyskane transformanty przenoszono na świeże podłoże selekcyjne z kanamycyną oraz/lub apramycyną w celu ich namnażania, a następnie przygotowywano zawiesiny glicerolowe (na podłożu Brucella broth uzupełnionym 10% FBS oraz 20% glicerolu) dla długoterminowego przechowywania szczepów.

5.2 Techniki laboratoryjne wykorzystywane do pracy z DNA

5.2.1 Izolacja genomowego DNA *H. pylori*

Izolację genomowego DNA *H. pylori* szczepów 26695 oraz G27 przeprowadzano przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji materiału genetycznego MagListo 5M DNA/RNA Extraction Kit (BiONEER) wg. instrukcji producenta. W skrócie, do izolacji materiału genetycznego wykorzystano 48 godzinną hodowlę płynną *H. pylori* w ilości 2ml o gęstości optycznej $OD_{600nm} = 1.0$. Komórki odwirowywano i poddawano lizie w obecności buforu lizującego z dodatkiem proteazy. Oczyszczony DNA wiążano do złoża magnetycznego, przemywano buforami wypłukującymi zanieczyszczenia

białkowe i organiczne, a następnie przeprowadzano elucje w buforze elucyjnym. Otrzymane próbki przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

5.2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

Reakcję łańcuchową polimerazy - PCR (ang. polymerase chain reaction) przeprowadzano przy użyciu polimeraz: 1) wysokiej wierności do klonowań molekularnych - Phusion™ Master-mix (ThermoFisher Scientific); polimerazy Q5® Master-mix (New England Biolabs) lub 2) Polimerazy o niskiej wierności, do weryfikowania klonowań molekularnych - Red-Taq Master-mix (VWR). Do przeprowadzania reakcji PCR zaprojektowano oligonukleotydowe sekwencje starterowe wymienione w podrozdziale 3.2. Wszystkie reakcje przeprowadzano w objętości końcowej 50 µL, z użyciem buforu dostarczonego przez producenta. Poniżej przedstawiono przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej i schemat reakcji PCR z użyciem wymienionych powyżej polimeraz:

Składnik	Ilość końcowa
2x stężona mieszanina reakcyjna (z ang. Master-mix) zawierająca polimerazę DNA	25 µl
Matrycowe DNA	25 ng
Starter sensowny (ang. forward)	0,5 µM
Starter antysensowny (ang. revers)	0,5 µM
Woda	Do 50 µl

Warunki amplifikacji DNA były zależne od wielkości matrycowego DNA, temperatury topnienia starterów a także użytej polimerazy. Przykładowa reakcja przebiegała w 33 powtarzających się cyklach, poprzedzonych etapem wstępnej denaturacji (95°C/1min.) Poniżej w tabeli 4 przedstawiono przykładowy czas trwania jednego cyklu reakcji PCR.

Tabela 4. Przykładowy czas trwania poszczególnych etapów jednego cyklu reakcji PCR

	Etap	Temperatura	Czas trwania
1.	Denaturacja	95°C	30s/cykl
2.	Przylączanie sekwencji oligonukleotydowych	Temperatura zależna od użytych sekwencji nukleotydowych	15s/1kb
3.	Wydłużanie fragmentów DNA	Temperatura zależna od użytej polimerazy (60-72°C)	60s/1kb
4.	Końcowe wydłużanie	72°C	10 min
5.	Chłodzenie	4°C	∞

5.2.3 Izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology). Wyizolowany DNA plazmidowe zawieszano w wodzie wolnej od DNaz i RNaz. Izolacja polegała na lizie alkalicznej komórek bakteryjnych i selektywnym wiązaniu DNA plazmidowego do złoża kolumny. Po etapie oczyszczania, plazmidowy DNA eluowano przy użyciu wody wolnej od DNaz i RNaz. Otrzymany DNA przechowywano w -20°C do czasu dalszego użycia.

5.2.4 Oczyszczanie fragmentów DNA powielonych w reakcji PCR

Oczyszczanie powielonych fragmentów DNA po reakcji PCR przeprowadzano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Clean-up (A&A Biotechnology) postępując zgodnie z instrukcją producenta. Procedura opierała się na wiązaniu fragmentów DNA do złoża kolumny w obecności roztworu wiążącego GI, zawierającego octan sodu (3 M, pH 5,5). Po etapie wiązania, kolumny przemywano buforem A1 w celu usunięcia zanieczyszczeń, a następnie DNA eluowano przy użyciu wody wolnej od nukleaz. Oczyszczony DNA przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

5.2.5 Trawienie restrykcyjne DNA plazmidowego

Wyizolowany plazmidowy DNA poddawano trawieniu restrykcyjnemu z wykorzystaniem odpowiednich enzymów typu FastDigest (Thermo Fisher Scientific). Reakcje trawienia prowadzono w objętości 20 µl. Do probówek typu Eppendorf dodawano: 10 µl plazmidowego DNA, po 1 µl odpowiedniego/ych enzymu/ów restrykcyjnego/ych, 2 µl buforu reakcyjnego FastDigest oraz wodę do końcowej objętości 20 µl. Mieszaniny inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C.

5.2.6 Elucja DNA z żelu agarazowego

Elucję DNA z żelu agarazowego przeprowadzano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Gel-out (A&A Biotechnology) postępując zgodnie z instrukcją producenta. Wycięte fragmenty żelu zawierające DNA rozpuszczano w buforze RG w temperaturze 60°C. Następnie DNA był wiązany do złoża kolumny, przemywany buforem A1 w celu usunięcia zanieczyszczeń i eluowane wodą wolną od nukleaz. Oczyszczony DNA przechowywano w -20°C.

5.2.7 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Rozdział fragmentów DNA przeprowadzano z wykorzystaniem aparatu CleaverScientific LTR MiniRunView-B (Cleaver Scientific), w 1% żelu agarozowym zawierającym 1x stężony roztwór SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) do barwienia DNA. Do oszacowania wielkości prążków stosowano komercyjnie dostępne markery masy cząsteczkowej DNA. Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x stężonym TAE w temperaturze pokojowej, przy napięciu 5 V/cm odległości między elektrodami. Po zakończonym rozdziale żele analizowano przy użyciu tego samego aparatu w świetle o długości fali 470nm, posiadającym filtr optyczny przepuszczającym światło o długości fali 530 nm.

5.2.8 Ligacja DNA

Fragmenty DNA ligowano przy użyciu zestawu CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher scientific). Ligacja produktów PCR do liniowego wektora pJET1.2/blunt zachodziła z wykorzystaniem T4 DNA ligazy w obecności dołączonego do zestawu buforu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 5 minut lub w 16°C przez noc, w zależności od długości i stężenia fragmentów DNA. Otrzymane mieszaniny ligacyjne wykorzystywano bezpośrednio do transformacji kompetentnych komórek *E. coli*.

5.2.9 Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie fragmentów DNA tj. DNA plazmidowe w celu weryfikacji poprawności klonowań molekularnych było przeprowadzane w ramach współpracy z Instytutem Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Procedura była oparta na sekwencjonowaniu metodą Sanger z wykorzystaniem urządzenia Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Metoda Sanger polega na enzymatycznej syntezie DNA w obecności znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów (ddNTP), które powodują zakończenie wydłużania łańcucha DNA. Wygenerowane w ten sposób fragmenty o różnej długości rozdzielane są elektroforetycznie, co umożliwia odczytanie sekwencji badanego fragmentu [133].

5.2.10 Precypitacja DNA metodą etanolową

W celu precypitacji DNA, do próbki eluowanego DNA dodawano 0,1 x objętość próbki 3M octanu sodu (Invitrogen), 2,5 x objętości próbki zimnego 99% Etanolu (Chempur)

a następnie wortexowano przez 30 sekund. Następnie, próbki mrożono w temperaturze -20°C przez noc pozwalając na wytrącanie kwasów nukleinowych. Po inkubacji próbki odwirowywano (1400 x g. w temperaturze 4 °C przez 30 minut.) Supernatant usuwano, a osad dwukrotnie przepłukiwano 500 µl ml zimnego etanolu 70% i usuwano etanol poprzez odparowywanie w temperaturze pokojowej przez 30 min. Osad rozpuszczano w pożądanej objętości wody wolnej od nukleaz (Invitrogen).

5.2.11 Analiza ilościowa DNA i/lub RNA

Pomiar stężeń kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) przeprowadzono z użyciem urządzenia BioDrop Duo, wykorzystując mikroobjętościowy tryb pomiaru (2 µL), zgodnie z instrukcją producenta. Pomiar opierał się na spektrofotometrycznym oznaczeniu absorbancji przy długości fali 260 nm, z automatyczną kompensacją tła (pomiar przy 320 nm). Oceniano również czystość próbki na podstawie stosunku absorbancji A260/A280 i A260/A230.

5.2.12 Przygotowanie konstruktów genetycznych do otrzymania szczepów delecyjnych *H. pylori*

W celu uzyskania szczepów delecyjnych *H. pylori* pozbawionych genów *hp_1213* (*pnp*), *hp_0247* (*rhpa*) lub *hp_0640* (*papS*), zastosowano procedurę trzyetapowej reakcji PCR z nakładającymi się sekwencjami (overlap PCR) dla wygenerowania rekombinowanego fragmentu DNA umożliwiającego zastąpienie natywnego genu allelem skróconym, zawierającym sekwencję kasety oporności na kanamycynę (*aphA-3*). Amplifikację fragmentów DNA przeprowadzano z wykorzystaniem polimerazy wysokiej wierności Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) w następujących warunkach: denaturacja początkowa: 98°C przez 1 min.; 30 cykli denaturacja: 98°C przez 10 s.; przyłączanie starterów: 55°C przez 15 s.; wydłużanie produktu reakcji: 58°C przez 1 min/kb; wydłużanie końcowe: 58°C przez 5 min.

Poniżej przedstawiono wykaz starterów reakcji PCR, wraz z ich sekwencjami, wykorzystanych dla uzyskania odpowiednich konstruktów DNA, służących wymianie allelicznej:

Kaseta oporności na kanamycynę (830 bp):

197F_STOPkod_kas_kan_F: 5'-TACTAACTAGGAGGAATAAATGG-3'

190R_kas_kan_R: 5'-TATTCCCTCCAGGTACTAAAAC-3'

hp_0247 (RhpA) - (2,5 kb)

Region flankujący 5' 0247_delta_F: 5'-GAAACGATAGCCCCTTGAGC-3'

Region flankujący 3' 0247_delta_R: 5'-GCGCTTAATGGGTAAATCTTCAG-3'

Nakładanie z kasetą oporności - kan_cass_0247_F: 5'

CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAGGGAATAGAAATTGACGCGATTCAA
AACC-3'

delta_0247_kanR_R: 5'

CTCATTTTAGCCATTTATTCCTCCTAGTTAGTCACGGAATGGCCTTTCTTGAA
TGG-3'

hp_1213 (PNP) - (2,3 kb)

Region flankujący 5' - 1213_kan_R: 5'-

CTCATTTTAGCCATTTATTCCTCCTAGTTAGTCACGGAATGGCCTTTCTTGAA
TGG-3'

Region flankujący 3' - kan_cass_1213_F: 5'-

CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAGGGAATAGAAATTGACGCGATTCAA
AACC-3'

Startery selekcyjne do potwierdzenia insercji kasety

1213_select_F: 5'-CTTACCCCTGGATTCGTCAAAG-3'

1213_selection_R: 5'-CTAAACTGAATTCTGAGTGGGC-3'

hp_0640 (PapS) -(2,3 kb)

Region flankujący 5'

PAPSBH1FORF1: 5'-GATTGATCCTTTTAAAGGGCAGAATG-3'

Region flankujący 3'

HP0640_del_R: 5'-GCATACCTTCCCCCATTC AACC-3'

Nakładanie z kasetą oporności

kan_cass_0640_F: 5'-

CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTGGAGGGAATAGAAATTGACGCGATTCAA
AACC-3'

Starter selekcyjny - 0640_select_F: 5' GATTGATCCTTTTAAAGGGCAGAATG-3'

Produkty reakcji PCR oczyszczano poprzez elucję DNA z żelu agarozowego i zastosowano bezpośrednio do transformacji naturalnej *H. pylori*. W celu zwiększenia skuteczności integracji, każdy konstrukt testowano wobec dwóch szczepów dzikich: *H. pylori* G27 oraz *H. pylori* 26695.

5.2.13 Przygotowanie konstruktów genetycznych do przywrócenia funkcjonalności genu *pnp* szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp

W celu przywrócenia ekspresji genu *pnp* (*hp_1213*) w szczepie delecyjnym *H. pylori* G27 Δpnp , skonstruowano plazmid komplementacyjny oparty na wektorze pUC19, udostępnionym przez dr Urszulę Zarzecką (Uniwersytet Gdański).

Do wektora wklonowano pełną sekwencję kodującą genu *pnp*, poprzedzoną sekwencją kodującą znacznik Strep-tag II na końcu N. Amplifikację genu przeprowadzono metodą PCR z użyciem starterów SLICStrepForPNP i SLICStrepRevPNP, zaprojektowanych w taki sposób, aby zawierały regiony homologiczne względem końców liniowego wektora. Dodatkowo, do produktu PCR dodano sekwencje homologiczne odpowiadające regionowi plastyczności (z ang. „plasticity zone”) genomu *H. pylori*, które umożliwiały integrację konstruktów do chromosomu. Sekwencje homologiczne zostały dodane na końcach 5' i 3' ampikonu w wyniku użycia przedłużonych starterów.

Tak przygotowana wstawka została wklonowana do zliniaryzowanego wektora pUC19 metodą klonowania niezależną od sekwencji i ligacji - SLIC (ang. *Sequence and Ligation Independent Cloning*), z zastosowaniem starterów VECTORSlicFOR i VECTORSlicREV, które pozwalały na uzyskanie komplementarnych - homologicznych fragmentów pomiędzy wstawką a zliniaryzowanym plazmidem. Otrzymany konstrukt nie zawierał aktywnej w *H. pylori* sekwencji dla miejsca inicjacji replikacji i został zaprojektowany do integracji do chromosomu bakteryjnego poprzez rekombinację homologiczną w obrębie miejsca plastyczności. Konstrukt został następnie wykorzystany w procedurze transformacji naturalnej, opisanej w podrozdziale 5.1.4.

5.3 Techniki laboratoryjne stosowane w procedurach doświadczalnych w pracy z RNA

5.3.1 Izolacja całkowitego RNA *H. pylori*

Całkowity RNA *H. pylori* izolowano ze 100ml płynnej hodowli *H. pylori* ($OD_{600} = 0.6$) przy użyciu komercyjnie dostępnego odczynnika TRIzol™ LS (Invitrogen).

Po odwirowaniu (5000 obr./10 min), komórki zawieszano w 300 μ l wody wolnej od RNaz i DNaz, a następnie dodawano 900 μ l TRIzol™ LS. Zawiesinę przenoszono do probówek zawierających kulki cyrkoniove i homogenizowano w homogenizatorze Mini Bead Mill Homogenizer-100MP (2 $\times$ 45 s, 6 m/s), chłodząc próbki na lodzie pomiędzy powtórzeniami. Następnie lizat bakteryjny wirowano (12 000 $\times g$, 10 min, 4 °C), i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Dodawano po 250 μ l chloroformu, intensywnie mieszano i inkubowano na lodzie przez 10 min. Po rozdzieleniu faz (wirowanie: 12 000 $\times g$, 15 min, 4 °C), zbierano górną (wodną) fazę. Do precypitacji RNA, na każde 200 μ L fazy wodnej, dodawano 600 μ l izopropanolu, 60 μ l 3 M octanu sodu (pH 5.2) oraz 1 μ l barwnika wspomagającego precypitację GlycoBlue™ (ThermoFisher Scientific). Następnie próbki mrożono w -80°C przez noc. RNA wirowano przy 20 000 $\times g$, (30 min, 4 °C), a osad przemywano 70% etanolem i ponownie wirowano (20 000 $\times g$, 30 min, 4 °C). Po dekantacji etanolu, osad RNA suszono na lodzie, zawieszano w 50 μ l wody wolnej od RNaz i DNaz. Ilość i czystość RNA oceniano spektrofotometrycznie przy na podstawie absorbancji przy 260 nm oraz stosunków A260/A280 i A260/A230.

5.3.2 Oczyszczanie wyizolowanego RNA

Do oczyszczania wyizolowanego RNA zastosowano separację magnetyczną z użyciem kulek Mag-Bind® TotalPure NGS posiadającymi na powierzchni grupy karboksylowe (Omega Bio-Tek) oraz statywu MagnaRack™ (Invitrogen). Do każdej próbki (50 μ l) dodawano 60 μ l zawiesiny kulek (2,1 $\times$ objętości RNA), mieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Próbkę umieszczano na statywie magnetycznym, inkubowano 1 minutę, po czym usuwano supernatant. Kulki przemywano dwukrotnie 200 μ l 70% etanolu, suszono przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie eluowano RNA, dodając 50 μ l wody wolnej od RNaz i DNaz. Po 1-minutowej inkubacji na statywie magnetycznym supernatant zawierający oczyszczony RNA zbierano do nowych probówek. Ilość i czystość RNA oceniano spektrofotometrycznie przy na podstawie absorbancji przy 260 nm oraz stosunków A260/A280 i A260/A230.

5.3.3 Usuwanie rybosomalnego RNA

Usuwanie rybosomalnego RNA (rybodeplecja) przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu riboPOOL™ Kit (SiTOOLs Biotech), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Metoda opierała się na hybrydyzacji sond

oligonukleotydowych specyficznych dla rRNA z docelowymi cząsteczkami, a następnie ich usunięciu za pomocą kulek magnetycznych powleczonej streptawidyną. Oczyszczony RNA, pozbawiony frakcji rybosomalnej mrożono w -80°C i wykorzystywano w dalszych analizach.

5.3.4 Przygotowywanie bibliotek RNA/cDNA do sekwencjonowania RNA-seq

Biblioteki RNA/cDNA do sekwencjonowania, przygotowano zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu zestawu KAPA RNA HyperPrep Kit (Roche), używając 2 µg oczyszczonego RNA na każdą reakcję. Jakość i ilość przygotowanych bibliotek oceniano z wykorzystaniem elektroforezy mikrokapilarnej przy użyciu urządzenia Bioanalyzer (Agilent) i zestawu odczytników DNA 1000, zgodnie z instrukcją producenta. Po potwierdzeniu prawidłowości przygotowanych bibliotek RNA/cDNA wykorzystywano je do dalszych analiz.

5.3.5 Sekwencjonowanie RNA (RNAseq)

Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono z wykorzystaniem platformy sekwencjonowania nowej generacji NGS (ang. Next generation sequencing) Illumina NextSeq 550 (paired-end, 2 × 75 bp), na której wykonano krótkoodczytowe sekwencjonowanie RNA w Centrum Biologii Cyfrowej i Nauk Biomedycznych, Biobank Łódź, Uniwersytet Łódzki (we współpracy z dr. Marcinem Słomką), zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskane dane zostały poddane analizie bioinformatycznej, przeprowadzonej we współpracy z dr. hab. Przemysławem Płocińskim, prof. UŁ. Do analizy danych z sekwencjonowania RNA wykorzystano szereg programów oraz skryptów bioinformatycznych. W skrócie, surowe dane z wysokoprzepustowego sekwencjonowania poddano wstępnemu przetwarzaniu, gdzie w pierwszym kroku usunięto adaptory sekwencjonujące za pomocą programu Cutadapt w wersji 1.3 (ref). Następnie przeprowadzono adaptacyjną obróbkę jakościową w oknie odczytu z wykorzystaniem skryptu Sickie, dopuszczając minimalną jakość 30% oraz długość odczytanej sekwencji nie krótszą niż 20 par zasad. Przefiltrowane odczyty mapowano do odpowiednich genomów referencyjnych przy użyciu programu Bowtie2 do dopasowywania krótkich odczytów (<https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). Sekwencje referencyjne złożonych genomów pobrano z bazy danych National Center for Biotechnology Information - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, dostęp w dniu 03.07.2025 r.) i obejmowały: *H. pylori* 26695 (NC_000915.1) oraz *H. pylori* G27 (NC_011333.1).

Do obsługi danych, normalizacji oraz generowania odpowiednich plików typu bedgraph wykorzystano pakiety programów SAMtools (<https://www.htslib.org/>) i BEDTools (<https://bedtools.readthedocs.io>). Zliczanie odczytów przypisanych do odpowiednich regionów genomu przeprowadzono za pomocą pakietu HTSeq w wersji 0.6.1 (<https://cyverse.atlassian.net/wiki/spaces/DEapps/pages/241882074/HTSeq-count0.6.1>). Wyniki sekwencjonowania wizualizowano w kontekście genomowym z wykorzystaniem programu Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://igv.org>). Różnicową ekspresję genów oszacowano przy użyciu internetowej platformy Degust do analizy RNA-Seq, z zastosowaniem parametrów domyślnych (<http://degust.erc.monash.edu>, oryginalnie opracowanej przez D.R. Powella, dostęp w dniu 03.07.2025 r. Analizę statystyczną różnicowej ekspresji genów (DGE) przeprowadzono za pomocą Degust i przedstawiono w postaci wartości skorygowanego współczynnika błędów fałszywie dodatnich - FDR (ang. false discovery rate, skorygowany współczynnik błędów fałszywie dodatnich). Za statystycznie istotne uznawano zmiany ekspresji tych genów, dla których skorygowany poziom istotności (FDR) nie przekraczał 0,05, a jednocześnie bezwzględna wartość logarytmu o podstawie 2 z ilorazu poziomów ekspresji (tj. $\log_2(FC)$), gdzie FC (fold change) była większa niż $\pm 1,585$.

5.4 Techniki laboratoryjne zastosowane do produkcji, oczyszczania i badania właściwości wytworzonych białek rekombinowanych

5.4.1 Przygotowanie wektorów plazmidowych do wytwarzania białek rekombinowanych

Fragmenty DNA kodujące białka PNP, RhpA oraz PAPs amplifikowano przy użyciu metody PCR, wykorzystując jako matrycę genomowy DNA *H. pylori* szczepu 26695 (dla genów *pnp* i *rhpA*, *pap*). Produkty PCR poddawano klonowaniu molekularnemu przy użyciu zestawu CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), zawierającego wektor pJET1.2/blunt. Reakcję ligacji przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta, a uzyskane konstrukty wykorzystano do transformacji chemokompetentnych komórek *E. coli* One Shot™ TOP10 metodą szoku cieplnego. Po selekcji transformantów, w celu potwierdzenia obecności i orientacji wstawki, izolowano plazmidowy DNA i trawiono enzymami restrykcyjnymi (XhoI/BamHI) rozpoznającymi w DNA sekwencje palindromiczne, odpowiednio sekwencję 5'-CTCGAG-3' lub 5'-GGATCC-3'. Otrzymane fragmenty rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym, a następnie

wycinano i eluowano fragmenty DNA przy użyciu zestawu Gel-out (A&A Biotechnology) do ekstrakcji DNA z żelu. Fragmenty kodujące białka ligowano z wektorem ekspresyjnym pET-29(+) (Novagen), uprzednio poddanym działaniu tych samych enzymów restrykcyjnych. Otrzymane konstrukty wykorzystano do transformacji szczepu ekspresyjnego *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) przy użyciu metody szoku cieplnego.

5.4.2 Transformacja bakteryjna metodą szoku cieplnego

Oczyszczony DNA plazmidowy niosący geny kodujące białka PNP, RhpA lub PapS w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym (10×His) oraz znacznikiem SUMO (ang. Small Ubiquitin-like Modifier), pełniącym rolę rozpuszczalnego tagu ekspresyjnego i ułatwiającego prawidłowe fałdowanie białka, użyto do transformacji chemokompetentnych komórek:

a) *E. coli* One Shot™ TOP10 w celu namnożenia wektora wysokokopijnego pJET1.2/blunt lub namnożenia wektora ekspresyjnego pET-29(+);

b) *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) w celu nadprodukcji białek rekombinowanych. Po dodaniu DNA do komórek kompetentnych, próbki inkubowano na lodzie przez 30 minut, po czym poddawano szokowi cieplnemu w 42°C przez 2 minuty, a następnie ponownie inkubowano na lodzie przez 2 minuty. Po zakończeniu cyklu transformacji dodawano po 500 µl podłoża SOC ogrzanego do 37°C. Zawiesinę komórek inkubowano przez 1,5 godziny w temperaturze 37°C z ciągłym wytrząsaniem (180 obr./min). Po inkubacji 100 µl zawiesiny bakteryjnej wysiewano na podłoże LB zestalone agarem z czynnikiem selekcyjnym: ampicyliną (100 µg/ml) dla wektora pJET1.2/blunt lub kanamycyną (50 µg/ml) dla wektora pET-29(+) (Novagen). Pozostałą objętość mieszaniny transformacyjnej poddawano wirowaniu (200 x g. przez 5 minut), a osad bakterii zawieszano w 100 µl podłoża SOC i wysiewano analogicznie do próbek niezatężonej. Hodowle bakteryjne inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C do uzyskania kolonii transformantów.

5.4.3 Próbną indukcja białek rekombinowanych

Po zakończeniu procesu transformacji wybierano po pięć pojedynczych kolonii z każdego układu, które następnie zaszczepiano do 5 ml płynnego podłoża LB zawierającego kanamycynę (50 µg/ml) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny, do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} \approx 0,6$. Następnie w celu

przeprowadzenia testowej indukcji wytwarzania białka do hodowli dodawano izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG) w końcowym stężeniu 1 mM w celu indukcji ekspresji białka rekombinowanego. Inkubację kontynuowano przez 16 godzin w temperaturze 28°C. Po zakończonej inkubacji, osady bakteryjne wirowano (200 x g. przez 10 min.), zawieszano w 100 μ l 1 x stężonego buforu denaturującego, inkubowano w 95°C przez 5 min., a następnie poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w polu elektrycznym w żelu poliakrylamidowym metodą SDS-PAGE.

5.4.4 Rozdział elektroforetyczny białek metodą SDS-PAGE

Elektroforetyczny rozdział białek przeprowadzono w warunkach denaturujących metodą SDS-PAGE, z zastosowaniem dwuwarstwowego żelu poliakrylamidowego, składającego się z 4% żelu zagęszczającego oraz 10% żelu rozdzielającego.

Próbki białkowe przygotowywano dwiema metodami w zależności od źródła materiału:

- Dla osadu bakteryjnego: osad komórkowy zawieszano bezpośrednio w 100 μ l buforu denaturującego (1 $\times$). Liza prowadzona była przez 10 minut w temperaturze 95°C.
- Dla oczyszczonego preparatu białkowego: do preparatu białkowego dodawano bufor denaturujący w stężeniu 5 $\times$ bezpośrednio do próbki białkowej w stosunku 1:5, tak aby uzyskać końcowe stężenie buforu 1 $\times$. Próbki inkubowano przez 5 minut w temperaturze 95 °C.

Po inkubacji, próbki nanoszono do studzienek żelu poliakrylamidowego i prowadzono elektroforezę w buforze 1 x stężonym TGS przy napięciu 90 V przez 30 min., a następnie 160V przez 1 godzinę. Po rozdzielaniu, żel barwiono z wykorzystaniem odczynnika SimplyBlue™ SafeStain (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta (trzykrotne płukanie w gorącej wodzie destylowanej, a następnie 30 sekundowe gotowanie w odczynniku SimplyBlue™ SafeStain). Wyniki rozdzielania dokumentowano jako cyfrowe obrazy fotograficzne.

5.4.5 Hodowla szczepu *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) w celu nadprodukcji białek rekombinowanych

Komórki *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3), zawierające plazmidy niosące informację genetyczną niezbędną do wytwarzania rekombinowanych białek: PNP, RhpA lub PapS, hodowano każdorazowo w płynnym podłożu LB z dodatkiem kanamycyny (50 μ g/ml) przez 16 godzin w temperaturze 37°C, z ciągłym wytrząsaniem. Następnie,

kultury rozcieńczano 100-krotnie do objętości 10 litrów w podłożu MMTB (ang. modified mineral terryfic broth) zawierającym kanamycynę (50 µg/ml), a następnie inkubowano w bioreaktorze przez 8 godzin, do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} \approx 20.0$. Hodowla prowadzona była w bioreaktorze skonstruowanym na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej, umożliwiającym ciągłe monitorowanie i kontrolę parametrów fizykochemicznych. Stałe stężenie glukozy w podłożu, pH 7, temperatura 37°C oraz odpowiednie natlenowanie pożywki zapewniało warunki sprzyjające utrzymaniu komórek w fazie wzrostu logarytmicznego. Hodowlę suplementowano roztworami glukozy i mikroelementów niezbędnych dla wzrostu bakterii oraz wodorotlenku potasu w celu stabilizacji pH. Indukcję ekspresji białek rekombinowanych przeprowadzano poprzez dodanie IPTG do hodowli o gęstości optycznej $OD_{600} \approx 20$, do końcowego stężenia 1 mM, po czym hodowlę kontynuowano przez 16 godzin w temperaturze 28°C. Po zakończonej inkubacji, hodowlę wirowano (2200 x g przez 10min) i zamrażano w - 80°C do dalszych prac eksperymentalnych.

5.5 Oczyszczanie białek rekombinowanych

Białka rekombinowane PNP, RhpA i PapS, oczyszczano trzyetapowo. Pierwszy etap obejmował lizę osadów bakteryjnych oraz chromatografię metalopowinowactwa IMAC (ang. immobilized metal affinity chromatography). Drugi etap obejmował chromatografię jonowymienną - IEX (ang. ion-exchange chromatography), a trzeci etap obejmował chromatografię żelową wykluczania - SEC (ang. size exclusion chromatography) umożliwiającą rozdział białek na podstawie wielkości cząsteczek i uzyskanie wysokiej czystości preparatu.

Oczyszczanie białek rekombinowanych przebiegało według schematu, opisanego poniżej (tabela 5.), z uwzględnieniem różnic w składzie oraz pH buforów stosowanych na poszczególnych etapach oczyszczania, a także rodzaju kolumny używanej podczas chromatografii jonowymiennej. Szczegółowe różnice w składzie i pH buforów zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka warunków chromatografii jonowymiennej (IEX) stosowanych do oczyszczania białek PNP, RhpA i PapS

Białko	Teoretyczny punkt izoelektryczny*	Podstawowy składnik buforujący	pH buforu	Kolumna IEX
PNP	5,47	Tris-HCL	7,5	Anionowymienna HiTrap Q FF (Cytiva)
RhpA	8,78	Tris buf. Kw. Cytrynowym + 0,1M L-argininy	9,0	Anionowymienna HiTrap Q FF (Cytiva)
PapS	9.14	Tris-HCL + 0,1M L-argininy	7,0	Kationowymienna Hitrap SP (Cytiva)

*(Teoretyczne punkty izoelektryczne pochodzą z obliczeń ze strony Expasy.com, na podstawie sekwencji aminokwasowej białek). Stosowane skróty: PNP - białko foforylaza poliribonukleotydowa; RhpA - białko helikaza RhpA; PapS - białko PapS

5.5.1 Otrzymanie lizatu bakteryjnego w celu oczyszczania białek rekombinowanych

Hodowle bakteryjne szczepu *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (DE3) poddawano dwukrotnemu cyklowi zamrażania i odmrażania, po czym osad komórkowy zawieszano w buforze do lizy komórek *E. coli* w proporcji 30 ml buforu na 10 g biomasy. Powstałą mieszaninę inkubowano na mieszadle magnetycznym z prędkością 500 obr./min. przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Następnie zawiesinę komórkową poddawano lizie przy użyciu homogenizatora wysokociśnieniowego Constant Cell Disruption System (Constant Systems) z zastosowaniem ciągłego chłodzenia do 4°C. Uzyskany lizat odwirowywano przy 18000 x g. w temperaturze 4°C, aż do momentu uzyskania klarownego supernatantu.

5.5.2 Chromatografia metalopowinowactwa (IMAC)

Do oczyszczania białek z użyciem techniki chromatografii metalopowinowactwa wykorzystywano złożo kobaltowe HisPur™ (Thermo Scientific) opłaszczone jonami kobaltu Co²⁺ umożliwiającymi związanie sekwencji polihistydynowych oczyszczanych białek. Złożo o objętości 4 ml wstępnie przepłukiwano 20 ml buforu wiążąco-płuczącego A, celem jego zrównoważenia (ang. equilibration). Następnie złożo kobaltowe dodawano do lizatu bakteryjnego i inkubowano przez 30 minut na lodzie, przy ciągłym, delikatnym wytrząsaniu na kołysce laboratoryjnej. Po inkubacji oddzielano złożo od lizatu za pomocą filtracji, zatrzymując cząstki złoża na sączku filtracyjnym (Chempur). Następnie złożo dwukrotnie przepłukiwano 20 ml buforu A w celu usunięcia niespecyficznie związanych

białek. Elucję białek silnie i specyficznie związanych przeprowadzano poprzez dodanie 10 ml buforu elucyjnego B. Otrzymane frakcje zbierano, a ich niewielką część poddawano analizie elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym metodą SDS-PAGE. Pozostałą objętość frakcji przechowywano do dalszych analiz.

5.5.3 Chromatografia jonowymienna (IEX)

Eluat uzyskany po chromatografii metalopowinowactwa rozcieńczano każdorazowo w proporcji 1:9 (10 ml eluatu + 90 ml buforu A do rozcieńczeń) w celu redukcji stężenia soli i przygotowania próbek do chromatografii jonowymiennej. Proces oczyszczania kontynuowano przy użyciu zautomatyzowanego systemu chromatografii cieczonej ÄKTA Go (Cytiva), wykorzystując kolumnę jonowymienną. Rozdział prowadzono w trybie przepływu ciągłego o natężeniu 5 ml/min, z zastosowaniem dwóch buforów: buforu QA (bufor A - o niskiej zawartości NaCl) oraz buforu QB (bufor B zawierający 1 M NaCl). Białko wiązało się do złoża jonowymiennego w warunkach niskiego stężenia soli, natomiast elucję prowadzono przy zastosowaniu liniowego gradientu stężenia NaCl w zakresie od 0% do 100% buforu B. Proces elucji monitorowano w czasie rzeczywistym na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 280 nm. Frakcje białkowe zbierano automatycznie za pomocą kolektora frakcji, zgodnie z profilem chromatograficznym. Zebrane próbki rozdzielano w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), frakcje zawierające pożądane białko przechowywano w temperaturze -80 °C do dalszych analiz.

5.5.4 Chromatografia żelowa (SEC)

Otrzymane frakcje białkowe po chromatografii jonowymiennej - IEX, poddawano koncentracji z wykorzystaniem systemu odwróconej filtracji Vivaspin® 20, 30 kDa MWCO (GE Healthcare). Do koncentratora wlewano wyselekcjonowane frakcje białkowe, a następnie wirowano je przy 450 x g. w temperaturze 4 °C do momentu osiągnięcia objętości końcowej umożliwiającej naniesienie roztworu białka do pętli iniekcyjnej urządzenia ÄKTA Go o pojemności 500 µl. Skoncentrowaną próbkę nastrzykiwano do układu chromatograficznego, a następnie przeprowadzano chromatografię żelową wykluczania z wykorzystaniem kolumny Superdex™ 75 10/300 GL (Cytiva). Proces prowadzono w środowisku buforu do metody SEC, przepływającego przez układ chromatograficzny ze stałą szybkością 0,5 ml/min.

Elucję białek monitorowano w czasie rzeczywistym poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm. Frakcje zbierano automatycznie przez kolektor frakcji, zgodnie z profilem chromatograficznym. Zebrane próbki rozdzielano w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), celem oceny czystości oraz masy cząsteczkowej eluowanych białek. Frakcje zawierające białko o pożądanej czystości przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz biochemicznych i funkcjonalnych.

5.5.5 Pomiar stężenia białek metodą Bradford

Stężenie białka oznaczano kolorymetrycznie z użyciem odczynnika Bradford (Chempur). Do analizy przygotowywano szereg rozcieńczeń wzorcowego białka albuminy surowicy bydlęcej (BSA) w zakresie stężeń 0-1,5 mg/ml, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 600 nm przy użyciu spektrofotometru DEN 1B (Biosan). Odczynnik Bradford w objętości 1 ml umieszczano w plastikowej kuwecie spektrofotometrycznej i dodawano po 10 μl roztworu BSA (o znanym stężeniu) lub próby badanej. Stężenie białka w próbkach obliczano na podstawie wykreślonej krzywej kalibracyjnej.

5.5.6 Preparatyka białka PNP w celu obrazowania metodą mikroskopii krioelektronowej Cryo-EM

W pierwszym etapie preparatyki usuwano znacznik 10xHis-SUMO z białka PNP. W tym celu roztwór białka o stężeniu 10 mg/ml inkubowano w buforze zawierającym końcowo 1 mM DTT, 0,2% Triton X-100 oraz 20 μl enzymu Ulp1 (2 mg/ml). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji próbkę zatężano przy użyciu systemu odwróconej filtracji Vivaspin® 20 (30 kDa MWCO, GE Healthcare), a następnie poddawano filtracji żelowej zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 5.5.4, w celu uzyskania białka PNP pozbawionego znacznika 10xHis-SUMO. Na potrzeby obrazowania białka do eksperymentu używano białka PNP w stężeniu 15 μM zawieszonego w 1 x stężonym buforze do CryoEM (skład podany w rozdziale materiały). Na każde przygotowane siatki aplikowano 3 μl roztworu białka na uprzednio wyżarzoną siatkę UltrAuFoil R 1.2/1.3, Au 300 mesh. Nadmiar cieczy usuwano automatycznie przy użyciu urządzenia do błyskawicznego zamrażania Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) w następujących warunkach: czas blottingu: 3 s, siła: -1, temperatura: 4°C , wilgotność: 100%, co pozwalało uzyskać cienką warstwę filmu białkowego. Następnie siatki zamrażano w ciekłym etanie schłodzonym ciekłym azotem,

co umożliwia zeszklenie roztworu bez tworzenia kryształków lodu i zachowanie natywnej struktury białka.

Tak przygotowane siatki przenoszono do pojemników kriogenicznych zawierających ciekły azot i przechowywano w pojemniku kriogenicznym do momentu analizy mikroskopowej. Prace eksperymentalne obrazowania białka PNP zostały w ramach współpracy z dr Katarzyną Bandyrą z Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (kierownik dr hab. Maria Górna) na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

5.5.7 Termoforeza mikroskalarna dla badania oddziaływań pomiędzy białkami PapS oraz RhpA

Oddziaływanie pomiędzy białkami RhpA i PapS oceniano za pomocą mikroskalowej termoforezy - MST (ang. MicroScale Thermophoresis), wykorzystując aparat Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). Do eksperymentów użyto znakowanego białka PapS znakowanego fluorescencyjnie znacznikiem RED-NHS, które pełniło funkcję cząsteczki docelowej (z ang. target). Znakowanie białka przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, stosując zestaw Monolith™ NT Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies) zawierający m. in. znacznik RED-NHS. Końcowe stężenie PapS w każdej próbce wynosiło 100 nM.

Ligandem zastosowanym w badaniu było białko RhpA, przygotowane w zakresie stężeń od 0,03 nM do 10 μM. Zakres obejmował 16 punktów krzywej miareczkowania, z rozcieńczeniami wykonanymi w skali logarytmicznej. Każdą mieszaninę przygotowano w buforze zawierającym 50 mM Tris-cytrynian (pH 8,0), 150 mM NaCl oraz 0,05% (v/v) Tween-20. Próbkę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej a mieszaniny dodawano do kapilar MST Premium Capillaries (NanoTemper Technologies). Pomiar MST przeprowadzono przy użyciu niskiej mocy źródła światła (LED power: 20%) oraz mocy wzbudzenia lasera wynoszącej 60% w temp. 25°C. Dane analizowano przy użyciu oprogramowania MO.Affinity Analysis v2.3 (NanoTemper Technologies), dopasowując krzywą wiązania zgodnie z modelem interakcji 1:1 w celu określenia stałej dysocjacji (kD).

5.5.8 Technika Western-Blottingu

W celu identyfikacji poprawności przywrócenia genu kodującego białko PNP oraz ponownej ekspresji tego białka w szczepie *H. pylori* G27 Δpnp wykorzystano technikę

Western-Blottingu. Niewielką ilość wyhodowanej biomasy bakteryjnej po selekcji na podłożu zawierającym apramycynę, zbierano wymazówką i poddawano lizie termicznej (95°C, 10 min.), a następnie lizaty wirowano (np. 20000 x g., 10 min., 4°C), aby usunąć nierozpuszczalne komponenty. Supernatanty rozdzielano elektroforetycznie metodą SDS-PAGE (podrozdział 5.4.4). Po rozdziale przeprowadzano transfer białek w polu elektrycznym na membranę nitrocelulozową o średnicy porów 0.45 µm (Merck) w 1× buforze transferowym przez 1 godzinę przy napięciu 100 V z ciągłym chłodzeniem na lodzie. Po transferze, membranę przepłukiwano trzykrotnie w buforze TBST. Następnie, dodawano bufor blokujący TBST zawierający 5% BSA i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej blokując wolne miejsca wiązania przeciwciał na membranie. Po etapie blokowania, membranę ponownie przepłukiwano trzykrotnie w buforze TBST (každorazowo 10 min.), a następnie inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi - króliczymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko znacznikowi Strep-tag (Abcam) rozcieńczonymi w buforze TBST z dodatkiem 2,5% BSA. Inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej ze stałym mieszaniem (120 obr./min.). Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi, membranę przepłukiwano trzykrotnie w buforze TBST (každorazowo 10 min.), a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi - kozimi przeciwciałami przeciwko króliczym immunoglobulinom sprzężonych z peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase)(Invitrogen) - rozcieńczonymi w TBST z dodatkiem 2,5% mleka, przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, membranę przepłukiwano trzykrotnie w buforze TBST (10 min.), a następnie wykrywano utworzony kompleks w reakcji barwnej z użyciem mieszaniny chromogen-substrat dla enzymu z użyciem odczynnika 1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie wynik wizualizowano w postaci fotograficznej.

5.5.9 Badanie aktywności polimerazowej i degradacyjnej otrzymanych białek rekombinowanych białek *in vitro*

a) Ocena aktywności polimerazowej

Aktywność polimerazową (nukleotydylotransferazy) białka PNP z *H.pylori* oceniano w reakcji wydłużania jednoniciowego DNA (ssDNA) z wykorzystaniem difosforanu adenozy (ADP) jako substratu nukleotydylowego. Postęp reakcji monitorowano w czasie rzeczywistym metodą fluorescencyjną, wykorzystując tioflawinę T (ThT) jako

znacznik, którego fluorescencja wzrasta po związaniu z powstającymi polimerami biologicznymi o uporządkowanej strukturze. Reakcje prowadzono w formie 96-dółkowym, w płytkach z czarnym dnem. W pierwszym etapie przygotowywano 2× stężony bufor AP zawierający: 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM MnCl₂ oraz 10 mM cytrynian żelaza(III). Mieszanina do oceny aktywności polimerazowej badanego białka zawierała następujące składniki w końcowych stężeniach: 1× bufor AP, 0,25 μM ssDNA (ExoSubstrate), 2 mM ADP, 1% Tioflawiny T, 5 μM/L białka PNP *H. pylori* (dodanie białka stanowiło rozpoczęcie reakcji), oraz wodę do objętości 50 μl. Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C przez 30 minut, z ciągłym monitorowaniem fluorescencji (ekscytacja: 450 nm, emisja: 492 nm).

b) Ocena aktywności degradacyjnej

Reakcję oceny aktywności degradacyjnej PNPazy przeprowadzano analogicznie do reakcji polimeryzacji z opisanymi poniżej modyfikacjami. W pierwszym etapie przygotowywano 2× stężony bufor AD zawierający: 1× PBS, 40 mM MgCl₂ oraz 10 mM cytrynian żelaza(III). Mieszanina do oceny aktywności enzymatycznej zawierała następujące składniki w końcowych stężeniach: 1× bufor AD, 0,25 μM poliadenylowanego ssDNA (polyA-ExoSubstrate), 1% Tioflawiny T, 5 μM/L białka PNP *H. pylori* (dodanie białka stanowiło rozpoczęcie reakcji), oraz wodę do objętości 50 μl. Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C przez 30 minut, z ciągłym monitorowaniem fluorescencji (ekscytacja: 450 nm, emisja: 492 nm).

Kontrole ujemne dla obu reakcji stanowiły próby bez dodatku enzymu. Szczegóły dotyczące poszczególnych składników testu i ich stężeń zostały opisane w podrozdziale 4.8.4

5.5.10 Synteza poliadenylowanego odcinka oligo-poli(A)* stanowiącego substrat dla reakcji degradacji z udziałem PNPazy

W reakcji poddawano poliadenylacji syntetyczny oligonukleotyd ExoSubstrate: 5'-ACAGTATTTGGTACTGCGCTCT-3'. W tym celu do probówki typu Eppendorf dodawano następujące reagenty w końcowych stężeniach: 1× bufor AP, 5 μM/L białka PNP *H. pylori*, 5 mM ADP oraz 40 μM ssDNA ExoSubstrate. Reakcję przeprowadzono w temperaturze 25°C przez 1 godzinę. Następnie dodawano kulki magnetyczne VAHTS

DNA Clean Beads pokrytymi grupami karboksylowymi w ilości odpowiadającej 2× objętości próbki i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 25°C w celu związania DNA z kulkami magnetycznymi. Probówkę umieszczano na statywie do separacji magnetycznej MagnaRack™ (Invitrogen), usuwano supernatant, a następnie dodawano po 200 µl 80% etanolu na 30 sekund. Etanol usuwano, a próbkę suszono. Do złoża magnetycznego dodawano 200 µl wody wolnej od DNaz i RNaz, probówkę ponownie umieszczano na statywie magnetycznym i oddzielano supernatant zawierający oczyszczone kwasy nukleinowe od złoża.

5.5.11 Testy przesiewowe *in vitro* inhibitorów białka PNP *H. pylori*

Do przeprowadzenia przesiewowych testów poszukiwania inhibitorów białka PNP użyto komercyjnie dostępną bibliotekę związków chemicznych MedChemExpress. Biblioteka obejmuje ponad 8562 dobrze scharakteryzowanych, bioaktywnych związków niskocząsteczkowych (nr kat. HY-L001P). Związki te należą do różnych klas chemicznych i farmakologicznych, takich jak antybiotyki, inhibitory enzymów, leki przeciwnowotworowe, środki immunomodulujące, związki przeciwwirusowe, przeciwzapalne, neuroaktywne oraz regulatory szlaków sygnalizacyjnych. Biblioteka została zaprojektowana w celu umożliwienia identyfikacji cząsteczek o potencjale terapeutycznym i funkcjonalnym w różnych testach biologicznych, w tym przesiewach ukierunkowanych na aktywność enzymatyczną.

Na podstawie wcześniej zoptymalizowanych warunków reakcji poliadenylacji i degradacji RNA w układzie 96-dołkowym reakcje enzymatyczne przeprowadzano zgodnie z wypracowanymi, opisanymi powyżej, protokołami testów przeznaczonych do oznaczania tych aktywności. Jediną zmienną w stosunku do standardowego układu reakcyjnego było dodanie badanego związku chemicznego. W zależności od serii eksperymentalnej, końcowe stężenie związku w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 100 µM lub 1 µM. Końcowe stężenie rozpuszczalnika DMSO w mieszaninie reakcyjnej nie przekraczało 4% (v/v), nie wpływające na aktywność enzymu.

Wstępne testy enzymatyczne przeprowadzano przy stężeniu 100 µM dla wszystkich związków chemicznych, co pozwalało na wyłonienie związków o potencjale hamującym aktywność polimeryzacyjną białka PNP. Następnie, wytypowane związki, które hamowały co najmniej >50% aktywność białka były testowane ponownie w niższym stężeniu (1 µM). Wszystkie reakcje były przeprowadzane w warunkach zoptymalizowanych wcześniej dla reakcji polimeryzacji lub degradacji oligo-poli(A)*

przez białko PNP, a uzyskane dane z pomiaru fluorescencji były odpowiednio normalizowane względem kontroli bez związku chemicznego.

5.5.12 Normalizacja wyników

Surowe dane fluorescencyjne poddano normalizacji wyników. W tym celu dla każdego dołka obliczano względny przyrost fluorescencji (ΔF) według wzoru:

$$\Delta F = \frac{F_{30} - F_0}{F_0}$$

gdzie F_0 oznaczał sygnał fluorescencji w czasie 0, a F_{30} sygnał po 30 minutach reakcji.

Aby zminimalizować wpływ globalnych przesunięć sygnału pomiędzy różnymi płytkami oraz wyeliminować zmienność techniczną, dane poddano dalszej normalizacji względem mediany wartości całej płytki. Dla każdego eksperymentu obliczano medianę przyrostu fluorescencji (ΔF_c), definiowaną jako:

$$\Delta F_c = \frac{(\text{Median}(F_{30}) - \text{Median}(F_0))}{\text{Median}(F_0)}$$

Otrzymaną wartość traktowano jako odniesienie dla całej płytki. Każdy indywidualny przyrost fluorescencji (ΔF) normalizowano względem tego globalnego przesunięcia według wzoru:

$$\Delta_{norm} = \left(\frac{\Delta F}{\Delta F_c} \right) \times 100$$

Takie podejście umożliwiało przeskalowanie wszystkich zmian fluorescencji do wspólnego punktu odniesienia, odpowiadającego medianie globalnej danej płytki i tym samym pozwalało na porównywanie wyników pomiędzy różnymi eksperymentami. Ostateczne wartości wyrażano jako procentowy poziom inhibicji aktywności enzymatycznej w stosunku do mediany aktywności kontrolnej.

Na tej podstawie obliczano procentowy poziom zahamowania reakcji poliadenylacji bądź degradacji ssDNA, przy czym spadek różnicy fluorescencji w porównaniu do kontroli traktowano jako efekt działania inhibitora. Wstępne testy przesiewowe przeprowadzono w jednym powtórzeniu technicznym. Związek, który w stężeniu 100 μM powodował zahamowanie co najmniej 90% aktywności poliadenylacyjnej lub degradacyjnej ssDNA, kwalifikował się do dalszych testów enzymatycznych w stężeniu 1 μM , przeprowadzonych jak powyżej.

5.5.13 Badanie aktywności poliadenylacyjnej białka PapS *H. pylori*

Badania w kierunku oceny aktywności poliadenylacyjnej białka PapS *H. pylori* zostały przeprowadzane analogicznie do testów poliadenylacji białka PNP *H. pylori* (podrozdział 5.5.9), z następującymi różnicami: zamiast 0,25 μ M ssDNA użyto 0,25 μ M ssRNA; zamiast 2 mM ADP użyto 2mM ATP. Bufory i warunki reakcji pozostały niezmienione.

5.5.14 Rozdział elektroforetyczny RNA w warunkach denaturujących z mocznikiem - UREA-Page

Ze względu na możliwość występowania zakłóceń w pomiarze fluorescencji, wynikających z autofluorescencji lub fotowysielania niektórych związków zawartych w bibliotece MedChemExpress, zastosowano alternatywne podejście umożliwiające bezpośrednią ocenę wpływu badanych substancji na aktywność polimeryzacyjną i degradacyjną białka PNP.

W tym celu przeprowadzono rozdział produktów reakcji enzymatycznych metodą elektroforezy w warunkach denaturujących, wykorzystując żel poliakrylamidowy zawierający 7 M mocznika (10% roztwór akrylamid:bisakrylamid w stosunku 19:1, z dodatkiem 0,1% APS). Do wizualizacji produktów zastosowano jednoniciowy RNA znakowany fluoroforem HEX, syntetyzowany komercyjnie. W eksperymentach zastosowano dwa warianty substratów RNA, różniące się sekwencją i długością, w zależności od celu badania:

- dla reakcji polimeryzacji: 250 nM ssRNA o sekwencji 5'-HEX-ACAGUAUUUGGUACUGCGCUCU-3';
- dla testu degradacyjnego: 250 nM poliadenylowanego ssRNA o sekwencji 5'-HEX-ACAGUAUUUGGUACUGCGCUCU(A)-3', przygotowanego zgodnie z opisanym wcześniej protokołem.

Reakcje enzymatyczne prowadzono w temperaturze 25 °C przez 30 minut, bez dodatku tioflawiny T. Po inkubacji reakcje zatrzymywano poprzez dodanie 2× stężonego buforu próbkowego przeznaczanego do elektroforezy UREA-PAGE, zawierającego 96% formamid, 50 mM EDTA oraz 94 mM Oranżu G. Następnie próbki poddawano denaturacji w temperaturze 95 °C przez 5 minut, po czym szybko schładzano na lodzie. Na każdą linię żelu nanoszono po 20 μ l przygotowanej próbki. Przed właściwym

rozdziałem elektroforetycznym żel poddawano wstępnej elektroforezie przez 1 godzinę (600 V, 30 mA, 16 W), co pozwalało na stabilizację pola elektrycznego i wyrównanie temperatury w całej objętości żelu. Elektroforezę prowadzono następnie przez 4 godziny w temperaturze 65 °C, stosując bufor 0,5× TBE. Rozdzielone produkty RNA wizualizowano przy użyciu systemu do obrazowania żeli Azure 500.

Po wstępnym teście przesiewowym inhibitorów w stężeniu 10 µM, wybrane związki poddano dalszej analizie w szeregu stężeń (szczegóły podano w części wynikowej). Do analizy ilościowej zastosowano oprogramowanie Image Lab (Bio-Rad). W przypadku reakcji poliadenylacji mierzono całkowitą intensywność smugi odpowiadającej produktom poliadenylowanym, natomiast w reakcji degradacji analizowano intensywność prążków niskocząsteczkowych produktów degradacji. Dla każdej próbki odejmowano wartość sygnału tła, a wyniki przedstawiano jako procent zahamowania reakcji względem kontroli dodatniej.

5.5.15 Ocena zdolności białka PapS *H. pylori* do naprawy końca CCA tRNA

Ocenę zdolności białka PapS *H. pylori* do naprawy końca CCA tRNA przeprowadzano w warunkach *in vitro*. Do reakcji wykorzystano syntetyczne, fluorescencyjnie znakowane [Cy5] substraty tRNA pozbawione końcowych nukleotydów (C0-, C-, CC-). Przed użyciem tRNA rozpuszczano w 20 mM Tris-HCl (pH 9.0), a następnie rozcieńczano do stężenia 600 nM. W celu uzyskania prawidłowej struktury drugorzędowej tRNA przeprowadzano proces annealingu polegający na ogrzaniu próbek do 70 °C przez 2 minuty, a następnie szybkim schłodzeniu do 37 °C. Reakcje enzymatyczne prowadzono w buforze C zawierającym 20 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl, 12.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT oraz 17% (v/v) glicerolu. Standardowa mieszanina reakcyjna (50 µl) zawierała: 5 µl roztworu substratu tRNA (600 nM), 2 µl oczyszczonego białka PapS (8 mg/ml), 2 µl 25 mM roztworu nukleozydotrifosforanu (NTP), a całość uzupełniano buforem C do 50 µl a następnie inkubowano w 37 °C przez 15 minut.

Dla każdego substratu tRNA (C0-, C-, CC-) prowadzono reakcje w obecności:

- pojedynczych NTP (ATP, CTP, GTP, UTP),
- kombinacji dwóch nukleotydów (CTP + ATP),
- pełnego zestawu czterech nukleotydów (ATP + CTP + GTP + UTP).

Jako kontrole negatywne prowadzono układy:

- bez dodatku NTP,
- bez dodatku białka PapS.

Po inkubacji do każdej próbki dodawano 1.5 μ l proteiny K (20 mg/ml) oraz SDS do końcowego stężenia 1%. Próbkę inkubowano w 40 °C przez 45 minut w celu degradacji białek. Następnie dodawano równą objętość bufor obciążającego 2x stężonego do elektrofrez UREA-PAGE i poddawano denaturacji w 95 °C przez 15 minut. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie 600V przez 4 godziny a następnie wizualizowano przy użyciu systemu obrazowania Azure 500.

5.6 Testy fenotypowe szczepu delecyjnego PNPazy *H. pylori*

5.6.1 Ocena żywotności rekombinowanych szczepów *H. pylori*

W celu ilościowej oceny żywotności szczepów delecyjnych zliczano liczbę jednostek koloniotwórczych (CFU) każdego z trzech szczepów *H. pylori*: G27 WT, G27 Δ *pnp*, G27 Δ *pnp*⁺⁺. Przygotowywano zawiesinę szczepów w buforze PBS, standaryzując ich gęstość optyczną $OD_{600} = 1,0$. Następnie wykonywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych w zakresie od 10^{-1} do 10^{-7} . Z każdego szeregu rozcieńczeń wysiewano po 10 μ l zawiesiny na podłoże stałe GC + 10% FBS a płytki inkubowano przez 72 godziny w 37°C w warunkach mikroaerofilnych. Po inkubacji zliczano liczbę kolonii z poszczególnych rozcieńczeń, wyliczano miano bakterii i przedstawiano je jako CFU/ml.

5.6.2 Oznaczenie lekowrażliwości szczepów *H. pylori*

Hodowle *H. pylori* w logarytmicznej fazie wzrostu zawieszano w buforowanym fosforanami roztworze soli fizjologicznej (PBS, z ang. phosphate buffered saline) do uzyskania gęstości optycznej $OD_{600} = 1,0$. Wartość ta odpowiadała przybliżonej gęstości bakterii 1×10^8 jednostek koloniotwórczych - CFU/ml, co zweryfikowano wcześniej eksperymentalnie metodą posiewów ilościowych na podłożach mikrobiologicznych. Następnie zawiesinę rozcieńczano w podłożu Brucella z dodatkiem 10% FBS do końcowej gęstości odpowiadającej liczbie żywotnych bakterii na poziomie $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml. W formie płytki 96-dołkowej przygotowywano szereg geometrycznych rozcieńczeń badanych związków w objętości 100 μ l i dodawano po 100 μ l przygotowanej zawiesiny bakteryjnej *H. pylori* każdorazowo włączając do badania

kontrolę: dodatnią (kontrola wzrostu bakterii) oraz ujemną (kontrola jałowości podłoża). Układy eksperymentalne inkubowano w 37°C przez 72 godziny, w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂). Po zakończeniu inkubacji do każdej studzienki dodawano 20 µL 0,02% wodnego roztworu resazury (Merck) i prowadzono dalszą inkubację przez 4 godziny w warunkach mikroaerofilnych. Następnie mierzono absorbancję przy długościach fal 570 nm i 600 nm za pomocą czytnika mikropłytek SpectraMax i3.

Zmiana barwy z niebieskiej na różową świadczyła o redukcji resazury do resorufiny dzięki aktywności metabolicznej żywych komórek bakteryjnych. Stopień redukcji obliczano zgodnie z wytycznymi producenta odczynnika AlamarBlue (Thermo fisher scientific) oraz metodą opisaną przez Gavriš E. i wsp. [134] z wykorzystaniem wzoru różnic pomiaru absorbancji:

$$\% \text{Redukcji resazury} = \frac{(A_{570} - A_{600})_{\text{próbka}} - (A_{570} - A_{600})_{\text{kontrola ujemna}}}{(A_{570} - A_{600})_{\text{kontrola dodatnia}} - (A_{570} - A_{600})_{\text{kontrola ujemna}}} \times 100\%$$

Minimalne stężenie hamujące - MIC (ang. minimal inhibitory concentration) definiowano jako najniższe stężenie związku, przy którym nie obserwowano istotnej redukcji resazury, tj. zmiany absorbancji w porównaniu do kontroli dodatniej. Ponadto, na podstawie trzech niezależnych eksperymentów, wyznaczano wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ (stężenia hamujące wzrost odpowiednio 50% i 90% komórek bakteryjnych) z wykorzystaniem analizy nieliniowej regresji czteroparametrowej (ang. nonlinear regression, variable slope, GraphPad Prism). Wartości te odczytywano z punktów przecięcia wygenerowanych krzywych przeżywalności z wartościami oznaczającymi 50% i 10% przeżywalności.

5.6.3 Ocena zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *H. pylori*

Hodowle szczepów *H. pylori* wyhodowane na podłożu stałym GC agar z dodatkiem 10% FBS zawieszano w płynnym podłożu BB, suplementowanym odpowiednio 10%, 5% lub 2% FBS, a następnie standaryzowano do gęstości optycznej OD₆₀₀ = 0,1. Zawiesiny porcjowano do płytek 96-dołkowych (po 200 µl na dołek) i inkubowano w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37°C, w sposób statyczny przez 24, 48 lub 72 godziny. Po inkubacji usuwano supernatanty hodowlane, dołki dwukrotnie przepłukiwano PBS, po czym dodawano po 200 µl 96% etanolu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie usuwano etanol a płytki suszono w temperaturze 60°C przez 15 minut. Po wysuszeniu dołki trzykrotnie przepłukiwano

PBS, dodawano 200 μ l wodnego roztworu 0,1% fioletu krystalicznego i inkubowano przez 15 minut. Nadmiar barwnika usuwano przez trzykrotne przepłukanie PBS, a związany z biofilmem barwnik rozpuszczano w 33% roztworze kwasu octowego i mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm. Intensywność tworzenia biofilmu przez badane pałeczki *H. pylori* oznaczano przez porównanie wartości absorbancji dla próby badanej wobec absorbancji kontroli.

5.6.4 Ocena aktywności wewnątrzkomórkowej katalazy PNP *H. pylori*

Hodowle szczepów *H. pylori* prowadzone na podłożu stałym GC agar z dodatkiem 10% FBS zawieszano w buforze PBS i standaryzowano do gęstości optycznej $OD_{600} = 1,0$. Następnie, 2 ml zawiesiny odwirowywano przy 2300 x g przez 10 minut, a uzyskany osad zawieszano w 1 ml buforu lizującego do *H. pylori*. Zawiesinę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 25°C przy ciągłym wytrząsaniu. Otrzymane lizaty wirowano 20000 x g przez 10 minut, a supernatanty zbierano do dalszej analizy. Stężenie białka w supernatantach standaryzowano w oparciu o pomiar absorbancji z użyciem odczynnika Bradford, tak aby zapewnić porównywalną zawartość białka w każdej próbce. Aktywność katalazy oznaczano spektrofotometrycznie w kuwetach ze szkła kwarcowego na podstawie tempa rozkładu nadtlenku wodoru, monitorując spadek absorbancji przy długości fali 240 nm z wykorzystaniem aparatury BioDrop Duo (Biodrop). Do każdej próby dodawano 500 μ l 60 mM roztworu H_2O_2 , uruchamiano pomiar, po czym dodawano 50 μ l standaryzowanego lizatu białkowego. Zmiany absorbancji rejestrowano w czasie.

5.6.5 Pomiar aktywności ureazy *H. pylori*

Hodowle szczepów *H. pylori* prowadzone na podłożu stałym GC agar z dodatkiem 10% FBS zawieszano w PBS a następnie standaryzowano do gęstości optycznej $OD_{600} = 0,1$. Następnie w formie płytki 96-dołkowej dodawano po 100 μ l zawiesiny *H. pylori* oraz 100 μ l podłoża Stuart'a pH = 5,5, zawierający roztwór 2% mocznika i czerwień fenolową jako wskaźnik pH. Pomiar aktywności enzymatycznej prowadzono w temperaturze 37°C przy użyciu spektrofotometru mikropłytkowego SpectraMax i3 monitorując zmiany absorbancji przy długości fali 560 nm w czasie rzeczywistym. Zmiany absorbancji były wynikiem zmiany barwy wskaźnika pH (czerwieni fenolowej) wywołanej alkalizacją środowiska, która następowała wskutek produkcji amoniaku przez ureazę rozkładającą mocznik. Dane analizowano w celu oceny intensywności i dynamiki aktywności ureazy.

5.6.6 Testy przeżywalności szczepów *H. pylori* w różnych temperaturach

Badanie przeżywalności szczepów *H. pylori* prowadzono w trzech różnych temperaturach inkubacji: 4°C, 37°C lub 39°C.

Hodowla w 4°C - ocena długoterminowej przeżywalności

Szczepy *H. pylori* hodowano na stałym podłożu GC agar z dodatkiem 10% FBS. Następnie komórki zawieszano w płynnym podłożu BB suplementowanym 10% FBS i standaryzowano do gęstości optycznej $OD_{600} = 1,0$. Hodowle inkubowano w temperaturze 4°C w warunkach mikroaerofilnych przez 14 dni. Próbkę pobierano w dniu 0, 3, 7 oraz 14, a następnie wykonywano wysiewy z szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń na podłożu stałym GC agar z 10% FBS. Po trwającej 3 dni inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych oceniano przeżywalność bakterii na podstawie liczby jednostek tworzących kolonie (CFU).

Hodowla w 37°C lub 39°C - ocena dynamiki wzrostu szczepów

Hodowle *H. pylori* do testu przygotowywano poprzez zawieszenie komórek bakterii pobranych z hodowli na podłożu GC agar w płynnym podłożu BB z 10% FBS, standaryzując zawiesinę do gęstości $OD_{600} = 0,1$. Próbkę inkubowano w odpowiedniej temperaturze w warunkach mikroaerofilnych, z ciągłym wytrząsaniem (140 obr./min.). Pomiar gęstości optycznej OD_{600} prowadzono co godzinę przez 8 godzin, w celu monitorowania dynamiki wzrostu bakterii i porównania tempa namnażania w obu temperaturach.

5.6.7 Ocena wrażliwości szczepów *H. pylori* na wybrane mutageny z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej

W celu oceny wrażliwości szczepów *H. pylori* G27 (WT, Δpnp , Δpnp^{++}) na wybrane czynniki mutagenne zastosowano zmodyfikowany test dyfuzyjno-krażkowy. Przygotowano zawiesinę komórek *H. pylori* o gęstości optycznej (OD_{600}) równej 2,0, a następnie wysiewano po 500 μ l takiej zawiesiny na płytki (średnia szalki Petriego wynosiła 15cm) z podłożem GC agar + 10% FBS dla uzyskania jednolitego wzrostu powierzchniowego. Na każdą hodowlę nakładano jałowe krażki bibułowe (Oxoid) do oznaczania lekowrażliwości, na które nakrapiano po 10 μ l roztworów związków chemicznych pozostawiając płytki otwarte przez 15 min., w celu wysuszenia krażków. Test miał charakter porównawczy i nie służył do klasyfikacji szczepów pod względem

wrażliwości klinicznej, lecz do oceny względnych różnic w odpowiedzi badanych szczepów *H. pylori* na zastosowane czynniki w identycznych warunkach dyfuzji.

Zastosowano następujące związki genotoksyczne i antybiotyki o końcowych stężeniach:

- Nadtlenek wodoru (H_2O_2 , 88,2 μmol /krążek) - induktor stresu oksydacyjnego,
- Chloramfenikol (100 μg /krążek) - inhibitor translacji (wiązan z podjednostką 50S rybosomu),
- Ciprofloksacyna (100 μg /krążek) - inhibitor gyrazy DNA,
- N-tlenek 4-nitrochinoliny (4NQO, 500 μg /krążek) - związek genotoksyczny, uszkodza zasady DNA,
- 9-aminoakrydyna (9AAC, 500 μg) - związek interkalujący DNA, powodujący mutacje typu zmiana ramki odczytu.

5.6.8 Ocena wrażliwości szczepów *H. pylori* na promieniowanie UV-C

Szczepy *H. pylori* G27 (WT, Δpnp oraz Δpnp^{++}) hodowano na podłożu GC suplementowanym 10% PBS, w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37 °C. Z każdej hodowli przygotowywano zawiesinę komórek o optycznej gęstości $OD_{600} = 1.0$. Następnie przygotowywano szereg rozcieńczeń od 10^0 do 10^{-6} w PBS. Na podłożu GC z 10% FBS wysiewano po 10 μl zawiesiny bakterii z rozcieńczenia 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} i poddawano ekspozycji na promieniowanie UV-C ($\lambda = 254 \text{ nm}$) z użyciem aparatu typu Hoefer UVC 500 (Hoefer). Zastosowano trzy różne dawki promieniowania: 5 J/m^2 , 10 J/m^2 , 20 J/m^2 . Kontrolę stanowiła próba badana bez ekspozycji na promieniowanie UV-C (0 J/m^2). Płytki inkubowano przez 72 godziny w warunkach mikroaerofilnych w 37°C. Po zakończeniu inkubacji, zliczano kolonie bakteryjne i wyliczano CFU/ml. Każdy pomiar wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach dla każdego szczepu.

5.6.9 Test ruchliwości szczepów *H. pylori*

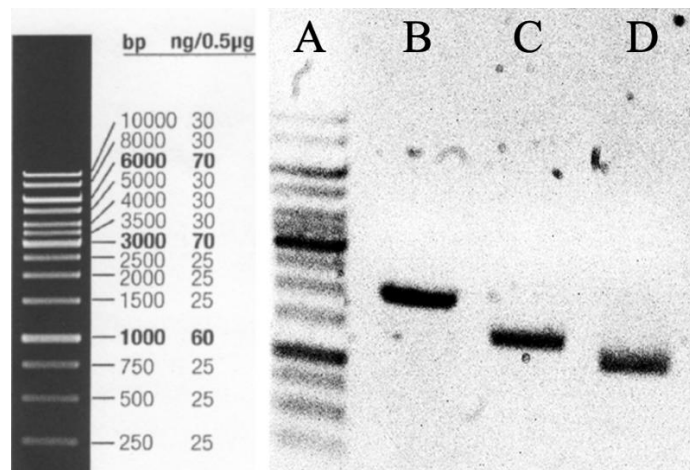
Szczepy *H. pylori* G27 (WT, Δpnp oraz Δpnp^{++}) hodowano na podłożu GC agar z dodatkiem 10% FBS w warunkach mikroaerofilnych (37 °C, 48 godzin). Następnie przygotowano zawiesiny komórek w PBS o gęstości optycznej $OD_{600} = 1,0$. Po 2 μl każdej zawiesiny nanoszono punktowo na środek szalki z półpłynnym podłożem Brucella agar zawierającym 0,35% agaru oraz 10% FBS. Hodowle inkubowano przez 5 dni w warunkach mikroaerofilnych w temperaturze 37 °C. Po inkubacji oceniano zdolność ruchu na podstawie pomiaru średnicy obszaru migracji bakterii z miejsca inokulacji. Każdy pomiar wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach dla każdego szczepu.

6. Wyniki

6.1 Wytwarzanie i oczyszczanie białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS *H. pylori*

6.1.1 Uzyskiwanie konstruktów genetycznych do produkcji białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS *H. pylori*

Na podstawie analiz obrazów rozdziału elektroforetycznego, uzyskano prawidłowe produkty amplifikacji genów *pnp*, *rhpA* oraz *papS*, odpowiadające następującym wielkościom: około 2067 bp, 1479 bp i 1209 bp (Ryc. 8). Na żelach agarozowych obserwowano wyraźne, pojedyncze prążki wskazujące na wysoką specyficzność reakcji amplifikacji.



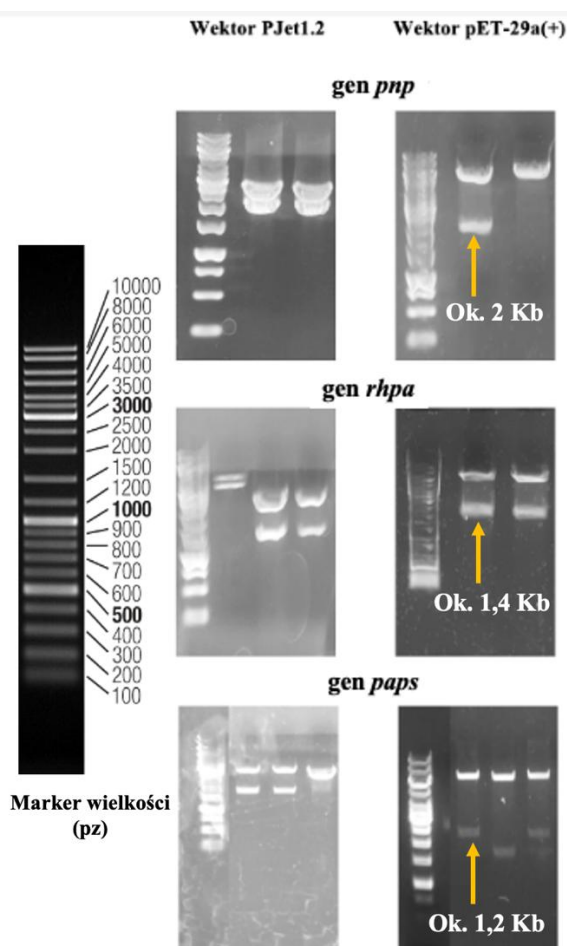
Ryc. 8. Obraz z rozdziału produktów amplifikacji genów *pnp*, *rhpA* i *papS* metodą elektroforezy w żelu agarozowym. (A) marker długości fragmentów DNA (GeneRuler 1 kb), produkt amplifikacji genu (B) *pnp*, (C) *rhpA* oraz (D) *papS*.

Otrzymane produkty amplifikacji genów *pnp*, *rhpA* oraz *papS* zostały poddane dalszym etapom klonowania molekularnego. W pierwszym etapie fragmenty DNA ligowano do wektora klonującego pJET 1.2, co umożliwiło stabilne namnożenie oraz wstępną weryfikację uzyskanych wstawek DNA. Następnie, po izolacji plazmidów pJET zawierających odpowiednie wstawki, fragmenty genów zostały wycięte enzymami restrykcyjnymi i przeklonowywane do wektora ekspresyjnego pET-29a(+), pod kontrolą promotora T7.

Analiza restrykcyjna otrzymanych konstrukcji pET-29a(+) potwierdziła obecność wstawek o oczekiwanych wielkościach oraz ich prawidłową orientację względem promotora T7 (Ryc. 9). Wzory trawienia uzyskane dla każdego z analizowanych

plazmidów były zgodne z wartościami teoretycznymi, obliczonymi na podstawie map restrykcyjnych.

Ostateczna weryfikacja sekwencji przeprowadzona metodą sekwencjonowania Sangera (opis metodyki w podrozdziale 5.2.9) potwierdziła integralność regionów kodujących genów *pnp*, *rhpA* oraz *papS*, brak mutacji punktowych i delecji, a także zachowanie ciągłości ramki odczytu oraz prawidłową fuzję z sekwencją kodującą znacznik 6×His-SUMO. Uzyskane wektory ekspresyjne, zawierające pełne sekwencje genów w poprawnej konfiguracji, zostały następnie wykorzystane w dalszych etapach badań obejmujących ekspresję oraz oczyszczanie białek rekombinowanych.



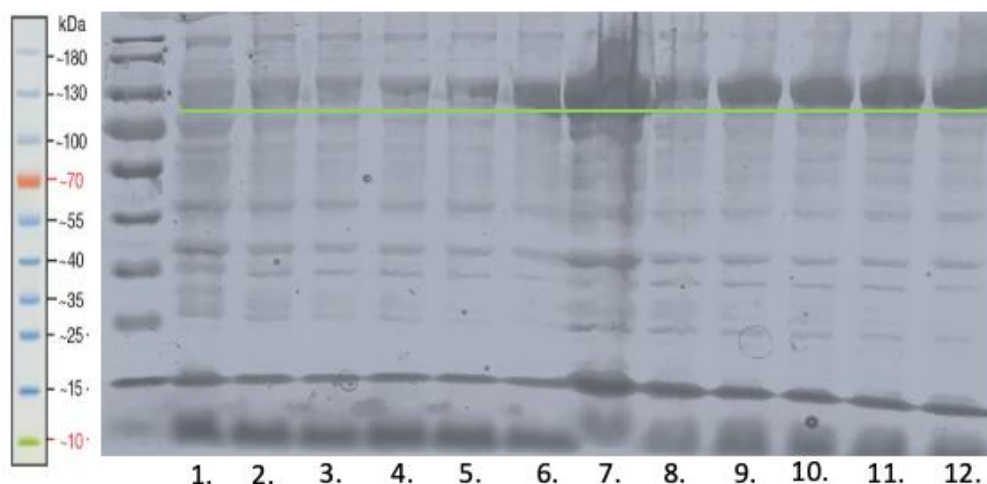
Ryc. 9. Obrazowanie plazmidów pJET1.2 oraz pET-29b(+) zawierających geny *pnp*, *rhpA* i *papS*. Plazmidy poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI, odpowiadającymi miejscom restrykcyjnym wprowadzonym w sekwencjach starterów, a następnie produkty trawienia rozdzielono w 1% żelu agarozowym. Po lewej stronie przedstawiono wyniki trawienia plazmidów pośrednich (pJET1.2::*pnp*, pJET1.2::*rhpA*, pJET1.2::*papS*), natomiast po prawej stronie - konstrukcji ekspresyjnych (pET-29b(+))::*pnp*, pET-29b(+))::*rhpA*, pET-29b(+))::*papS*). Obecność dwóch wyraźnych prążków w każdej próbce, odpowiadających liniowemu wektorowi oraz wstawionemu fragmentowi genu, potwierdza poprawność klonowania oraz zachowanie oczekiwanej orientacji wstawek.

6.1.2 Optymalizacja ekspresji białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS

Nadekspresja białek rekombinowanych wykorzystywanych w poniższej pracy, prowadzona była w systemie bakteryjnym, w szczepie *E. coli* One Shot™ BL21™ (DE3) (Thermo fisher Scientific) transformowanym plazmidem pET-29a(+)-SUMO umożliwiającym produkcję białka fuzyjnego ze znacznikiem polihistydynowym (10xHis-SUMO) na N-końcu białka PNP, RhpA lub PapS.

W pierwszym etapie przeprowadzono optymalizację warunków hodowli, obejmującą temperaturę wzrostu (37°C lub 25°C), skład podłoża (LB lub wzbogacone MMTB), czas indukcji (16 lub 24 godziny), temperaturę indukcji (37°C lub 25°C) oraz stężenie induktora IPTG (1 mM lub 0,4 mM). Wzrost hodowli monitorowano na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy 600 nm (OD600), natomiast wydajność ekspresji białek rekombinowanych oceniano na podstawie analizy profili białkowych metodą SDS-PAGE (Ryc. 10). Wykazano, że najbardziej wydajna ekspresja każdego z białek zachodziła w następujących warunkach:

Temperatura hodowli	37°C
Podłoże hodowlane	Wzbogacone MMTB
Temperatura ekspresji	25°C
Gęstość optyczna hodowli do indukcji	OD600 - 0.6
Stężenie induktora IPTG	1mM
Czas indukcji	16 godzin



Ryc. 10. Ocena ekspresji rekombinowanego białka PNP w rozdziale elektroforetycznym metodą SDS-PAGE podczas optymalizacji warunków nadekspresji w systemie *E. coli* BL21(DE3). Przedstawiono reprezentatywny żel ilustrujący ekspresję białka uzyskaną w różnych wariantach warunków hodowli i indukcji. Pasma odpowiadające białku fuzyjnemu ze znacznikiem 10×His o oczekiwanej masie cząsteczkowej ~89 kDa zaznaczono zieloną linią. Warunki zapewniające najwyższą wydajność ekspresji opisano w podrozdziale 6.1.2, a na rycinie zostały oznaczone numerem 7. Numery 1-12 odpowiadają różnym wariantom warunków hodowli i indukcji ekspresji tego samego konstruktu PNP, testowanym w ramach procedury optymalizacji.

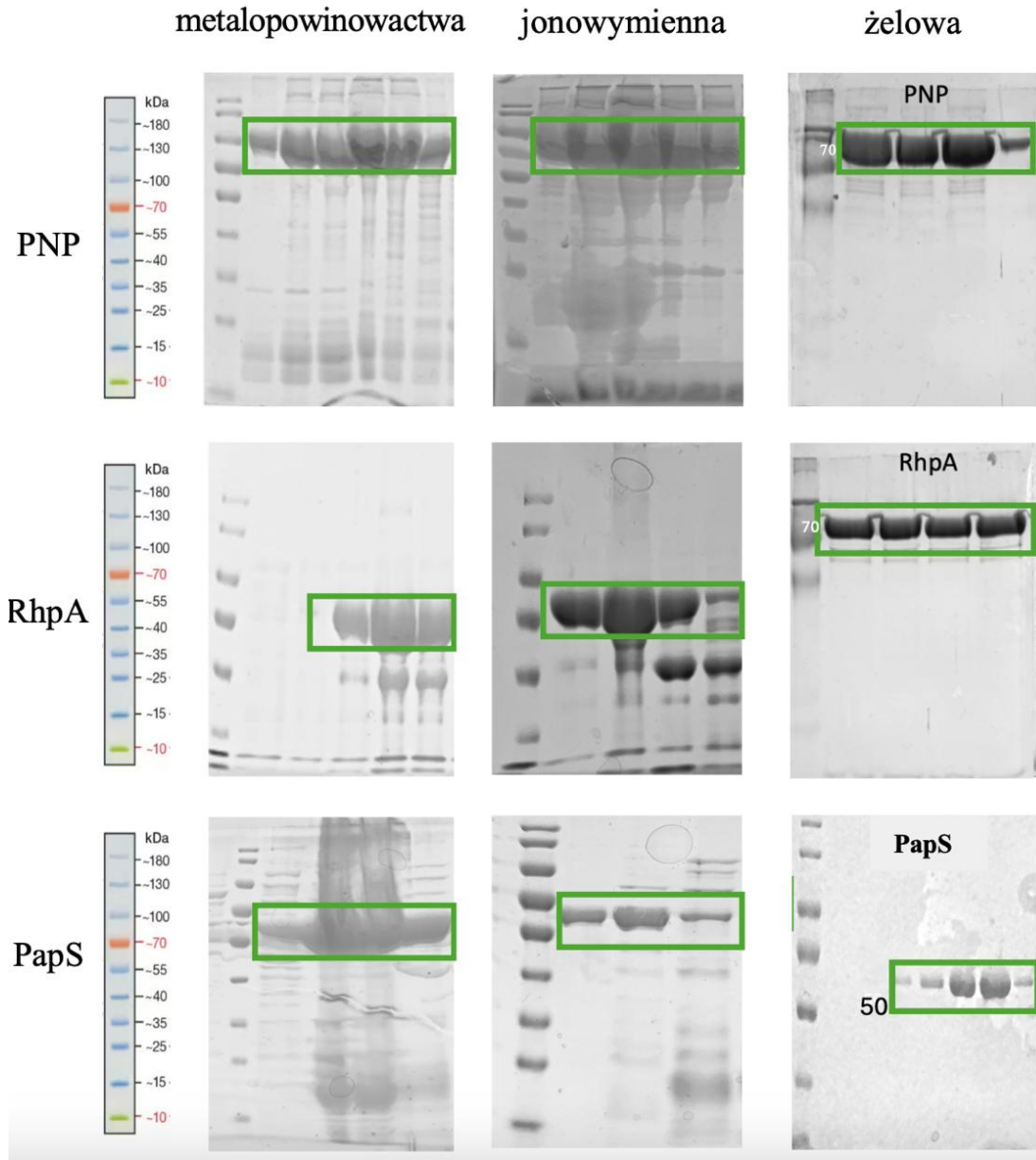
6.1.3 Pozyskiwanie biomasy bakteryjnej w warunkach kontrolowanej hodowli

Zastosowanie kontrolowanej hodowli w bioreaktorze znacząco zwiększyło wydajność produkcji biomasy bakteryjnej w porównaniu do hodowli przeprowadzanych na skale nie większą niż 1L roboczy hodowli. Uzyskano powtarzalny wzrost kultur do gęstości optycznej przekraczającej $OD_{600} = 20$, co odpowiadało około 400 g mokrej biomasy komórek z 10 litrów hodowli. Utrzymanie stabilnych parametrów środowiska wzrostu drobnoustrojów, w tym stałej temperatury, natlenienia i pH, zapewniło wysoką jednorodność uzyskanej biomasy, co umożliwiło dalsze etapy oczyszczania i charakterystyki białek rekombinowanych.

6.1.4 Oczyszczanie białek rekombinowanych metodami chromatograficznymi

Po zakończeniu hodowli, biomasę zawierającą komórki bakteryjne poddawano dezintegracji zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 5.5.1. Otrzymany lizat białkowy oczyszczano trójstopniowo, stosując kolejno: chromatografię metalopowinowactwa (IMAC), chromatografię jonowymienną (IEX) oraz chromatografię żelową (SEC) (techniki opisane szczegółowo w podrozdziale 5.5). Obrazy rozdzielów elektroforetycznych oczyszczanych białek przedstawiono na rycinie 11. Stężenie uzyskanych preparatów białkowych oceniano metodami opisanymi w tym samym podrozdziale. Otrzymano oczyszczone frakcje białek rekombinowanych: PNP, RhpA oraz PapS, o końcowym stężeniu odpowiednio 15 mg/ml, 12 mg/ml i 10 mg/ml. Każde z białek porcjowano we frakcje o objętości 500 μ l, przy łącznej objętości 6 ml. Ze względu na obecność znacznika 10 $\times$ His-SUMO masa cząsteczkowa białek była o ok. 12 kDa większa od masy teoretycznej. Na rycinie 11 przedstawiono zbiorcze zdjęcie z rozdzielu elektroforetycznego białek rekombinowanych PNP, RhpA, PapS.

Chromatografia:

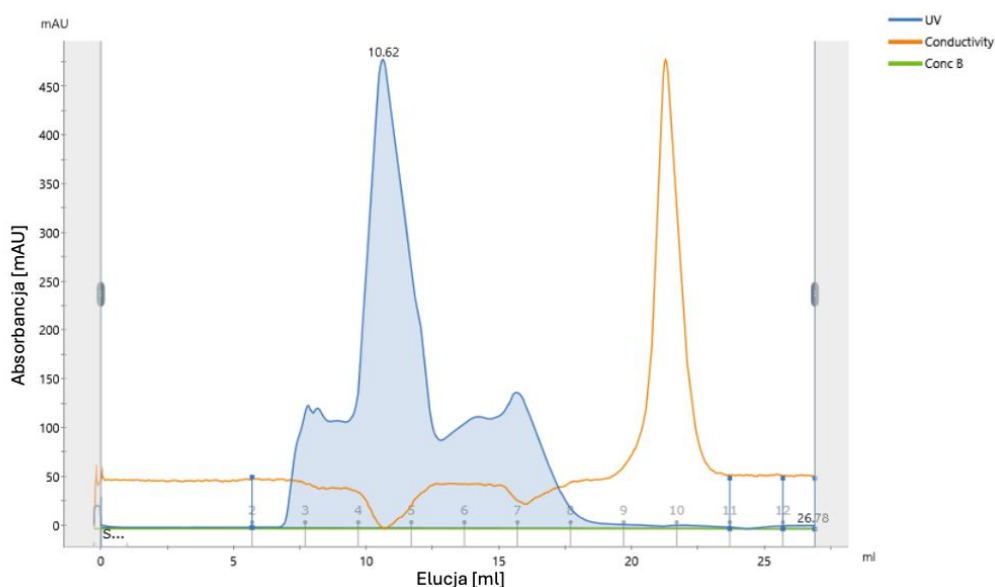


Ryc. 11. Obrazy rozdziału elektroforetycznego białek rekombinowanych: PNP (89kDa); RhpA (68kDa); i PapS (58,5kDa) metodą SDS-PAGE. W badaniu wykorzystano metody chromatografii: metalopowinowactwa (IMAC); jonowymiennej (IEX) i filtracji żelowej (SEC). Po lewej stronie umieszczono marker masy cząsteczkowej w zakresie 10-180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Różnica w wysokości rozdziału markera mas na zdjęciach wynika z braku jednolitej rozdzielczości poszczególnych żeli. Zieloną ramką oznaczano właściwe białka. PNP- białko PNP, RhpA - białko RhpA, PapS - białko PapS.

6.1.5 Analiza form oligomerycznych białek metodą chromatografii żelowej

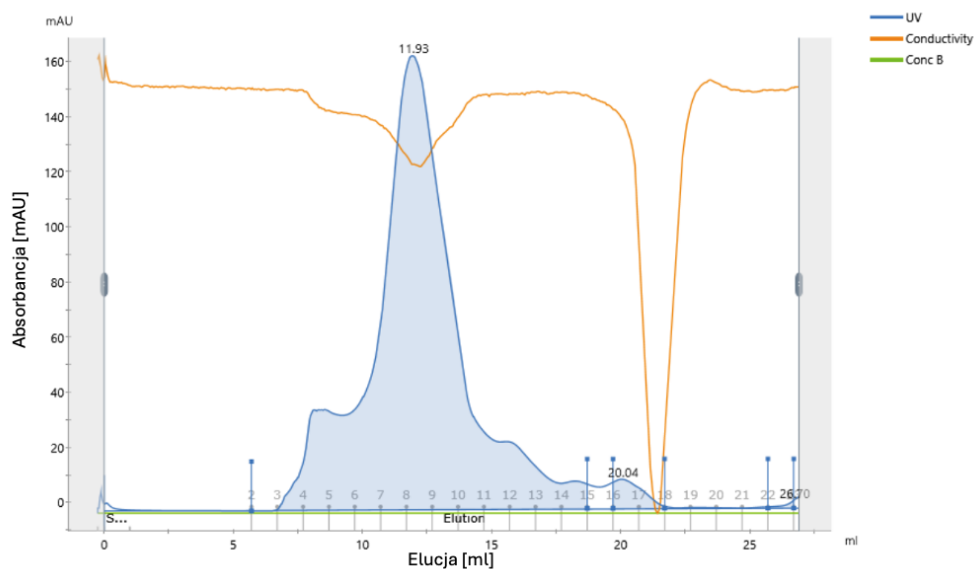
W celu określenia stanu oligomerycznego badanych białek zastosowano chromatografię wykluczeniową (SEC) na kolumnie Superdex 200 Increase 10/300 GL. Każde z białek zostało nastrzyknięte na kolumnę i profile chromatograficzne były niezależnie analizowane. Retencje głównych pików absorbancji UV odniesiono do literaturowych danych kalibracyjnych dla tej kolumny. Wyniki badań przedstawiono na rycinie 12a, 12b, 12c.

Białko PNP



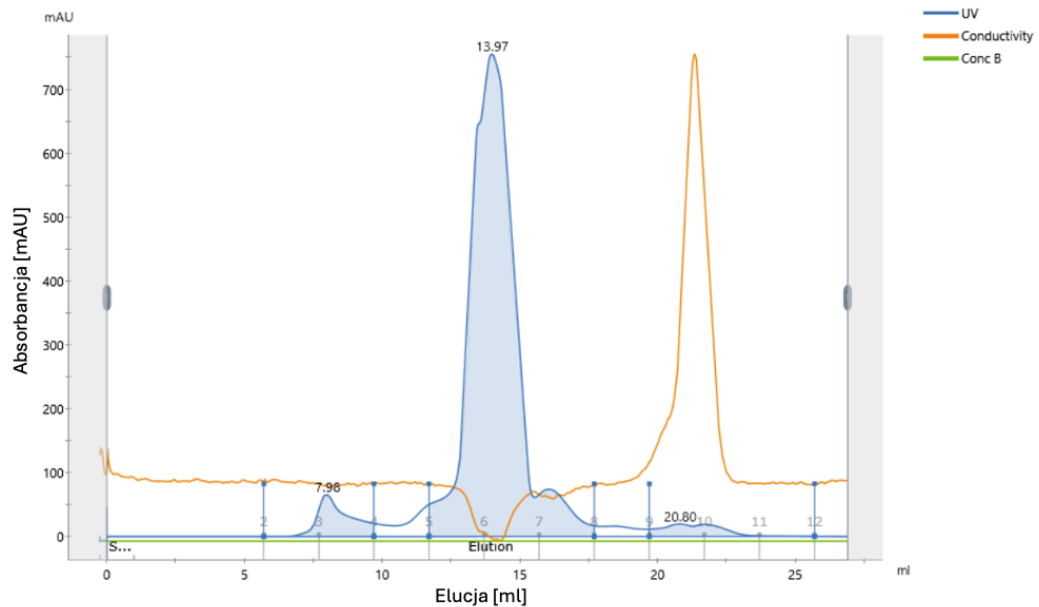
Ryc. 12a. Wykres obrazujący rozdział chromatograficzny SEC białka PNP. Zarejestrowano pojedynczy, dominujący pik chromatograficzny przy ~10.62 ml. Objętość kolumny przy której dochodzi do elucji PNP odpowiada białku o masie cząsteczkowej ~230 kDa, co wskazuje na obecność trimerycznej formy enzymu (monomer ~77 kDa + 12 kDa). Obserwowany wzór rozdziału potwierdza wysoką czystość oraz jednorodność oligomeryczną trimery. SEC - chromatografia żelowa; AU - jednostki absorbancji; conductivity - przewodność; Conc B - stężenie buforu B; UV - sygnał absorbancji przy 280 nm.

Białko RhpA



Ryc. 12b. Wykres obrazujący rozdział chromatograficzny SEC białka RhpA *H. pylori*. Zarejestrowano dominujący pik chromatograficzny przy objętości eluatu ~11,93 ml. Taka objętość elucji odpowiada białku o zwiększonym promieniu hydrodynamicznym w porównaniu do masy teoretycznej monomeru, co jest charakterystyczne dla białek o wydłużonej lub asymetrycznej strukturze, takich jak helikazy z rodziny DEAD-box [135]. Na podstawie samej chromatografii SEC nie można jednoznacznie określić stanu oligomerycznego białka. SEC - chromatografia żelowa; AU - jednostki absorbancji; conductivity - przewodność; Conc B - stężenie buforu B; UV - sygnał absorbancji przy 280 nm.

Białko PapS



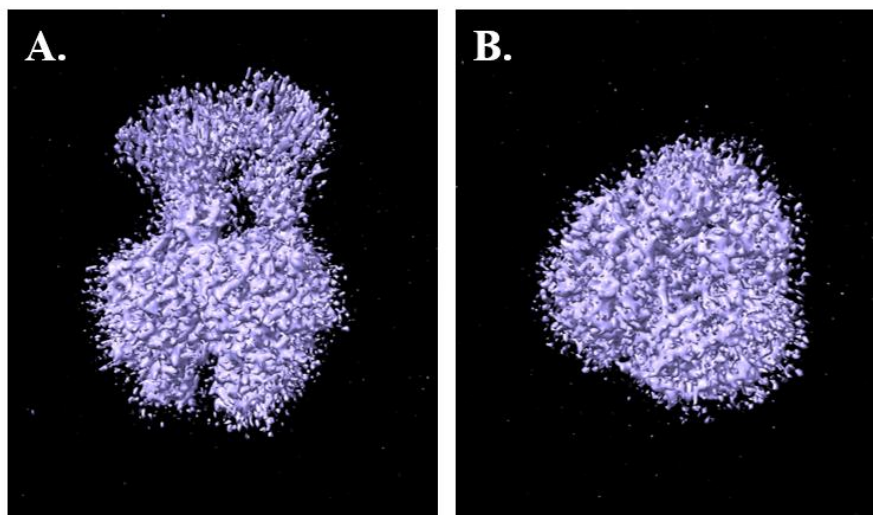
Ryc. 12c. Wykres obrazujący rozdział chromatograficzny SEC białka PapS. Profil chromatograficzny ujawnił dominujący pik przy objętości elucji ~13,97 ml. Taka objętość elucji odpowiada białku o przybliżonej masie cząsteczkowej ~60-70 kDa, co jest zgodne z masą teoretyczną monomeru PapS wraz z sekwencją fuzyjną (~47 kDa + ~12 kDa). Wynik ten wskazuje, że badane białko występuje głównie w formie monomerycznej w ustalonych warunkach. SEC - chromatografia żelowa; AU - jednostki absorbancji; conductivity - przewodność; Conc B - stężenie buforu B; UV - sygnał absorbancji przy 280 nm.

6.2 Struktura przestrzenna PNPazy

W wyniku wstępnych badań z wykorzystaniem mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM), przeprowadzonych przez specjalistów Grupy Biologii Strukturalnej w Centrum Badań Biologiczno-Chemicznych i Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, uzyskano wstępną trójwymiarową mapę gęstości elektronowej białka PNPazy *H. pylori* (HP_1213). Dane obrazowe zebrano z wykorzystaniem mikroskopu Thermo Fisher Glacios 200 kV, a rekonstrukcję i obróbkę przeprowadzono w środowisku CryoSPARC, uzyskując mapę o średniej rozdzielczości około 3,5 Å. Uzyskaną mapę gęstości przedstawiono jako izopowierzchnię w programie UCSF ChimeraX v.1.9 (ryc. 12.1).

Rekonstrukcja wskazuje na zwartą cząsteczkę o wyraźnie zarysowanej architekturze globalnej. W widoku bocznym obserwuje się dwupoziomową organizację: masywniejszą, bardziej zwartą część dolną oraz część górną o odmiennym kształcie, połączoną z dolnym segmentem przewężeniem w obszarze środkowym. Widok „od dołu” sugeruje w przybliżeniu osiowo-symetryczny obrys cząsteczki, zgodny z oligomeryczną organizacją białka w preparacie. Zaobserwowany zarys gęstości jest spójny z kanoniczną organizacją bakteryjnych PNPaz, które tworzą trimeryczny rdzeń katalityczny zbudowany z domen PH oraz dodatkowe elementy odpowiedzialne za wiązanie substratu RNA (domeny KH/S1).

Należy podkreślić, że przedstawione wyniki mają charakter wstępny a badania są kontynuowane w celu uzyskania pełniejszej rekonstrukcji struktury oraz dalszego dopracowania modelu. Ruchliwość domen peryferyjnych może skutkować ich słabszym odwzorowaniem w mapie gęstości w porównaniu do zwartego rdzenia katalitycznego. Z tego względu dalsze etapy analizy ukierunkowane są na poprawę interpretacji gęstości w obszarach bardziej dynamicznych dla uzyskania możliwie kompletnego modelu strukturalnego. Prace nad pełną rekonstrukcją i dopracowaniem modelu będą kontynuowane niezależnie od niniejszego doktoratu, natomiast już na obecnym etapie uzyskana mapa gęstości jednoznacznie potwierdza klasyczną, trimeryczną organizację PNPazy *H. pylori*, co samo w sobie stanowi istotny i w pełni wartościowy rezultat, zapewniający wiarygodną podstawę do modelowania i projektowania potencjalnych inhibitorów ukierunkowanych na konserwatywny rdzeń katalityczny tego enzymu.



Ryc. 12.1. Trójwymiarowa mapa gęstości elektronowej białka PNP *H. pylori* (*hp_1213*) uzyskana metodą mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) i zwizualizowana w UCSF ChimeraX 1.9 jako izopowierzchnia. Przedstawiono (A) widok boczny oraz (B) widok wzdłuż osi cząsteczki („od dołu”). Mapę gęstości przedstawiono bez dopasowanego modelu atomowego.

6.3 Badania aktywności enzymatycznej otrzymanych białek *H. pylori*

6.3.1 Aktywność polimeryzacyjna białka PNP

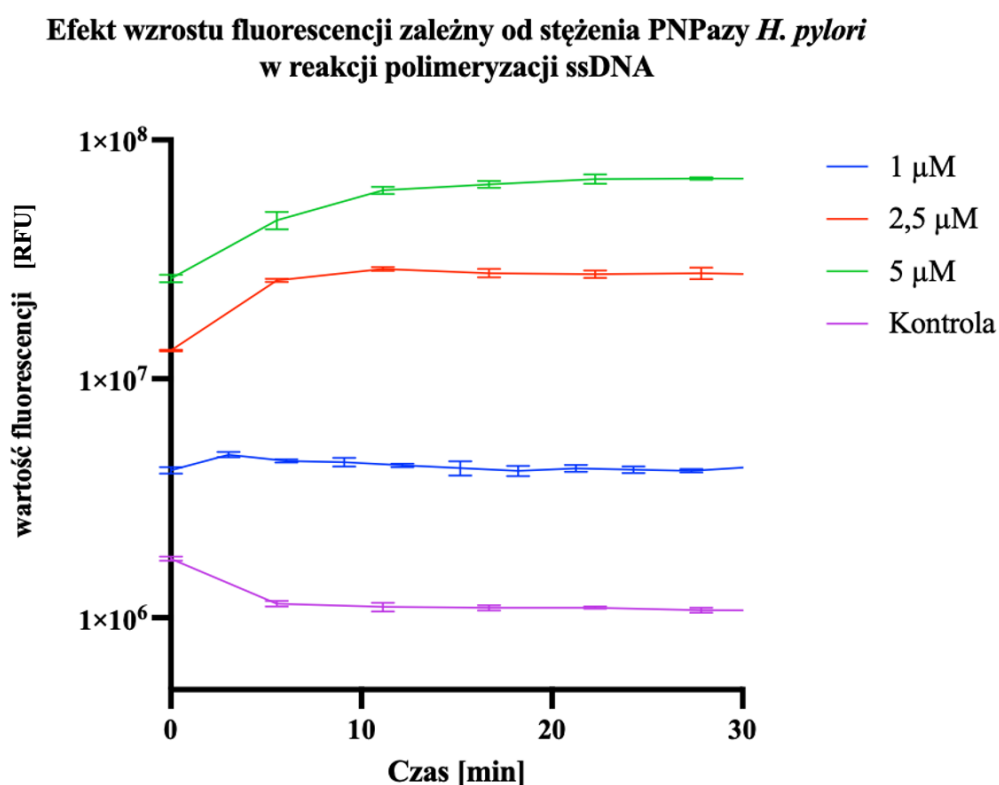
Weryfikacja aktywność polimeryzacyjnej otrzymanego białka PNP była niezbędna do kolejnych etapów eksperymentalnych, tj. poszukiwania inhibitorów hamujących aktywność polimeryzacyjną i degradacyjną białka PNP. Pierwszym etapem było opracowanie i optymalizacja testu oceniającego aktywność polimeryzacyjną.

W tym celu opracowano test fluorymetryczny możliwy do przeprowadzenia w formacie 96-dółkowym, z wykorzystaniem fluorochromu Tioflawiny T, która niespecyficznie wiąże się z odcinkami ssDNA. Tioflawina T jest barwnikiem fluorescencyjnym, który wykazuje zdolność do interkalacji oraz wiązania powierzchniowego z kwasami nukleinowymi, co prowadzi do wzrostu intensywności fluorescencji samej Tioflawiny T[137].

Podczas reakcji poliadenylacji dochodziło do wydłużania kilkunastonukleotydowych odcinków ssDNA dzięki aktywności poliadenylacyjnej PNP. Reakcja enzymatyczna odbywała się w obecności ADP niezbędnego do stymulacji aktywności polimeryzacyjnej i w środowisku jonów manganu (II) i jonów żelaza (III). Wyniki badań przedstawiono na Ryc. 13a. Stosując białko w stężeniu 5 μ M uzyskano wyraźny sygnał w teście dla około 8 tys. związków chemicznych spośród potencjalnych inhibitorów w badaniach przesiewowych.

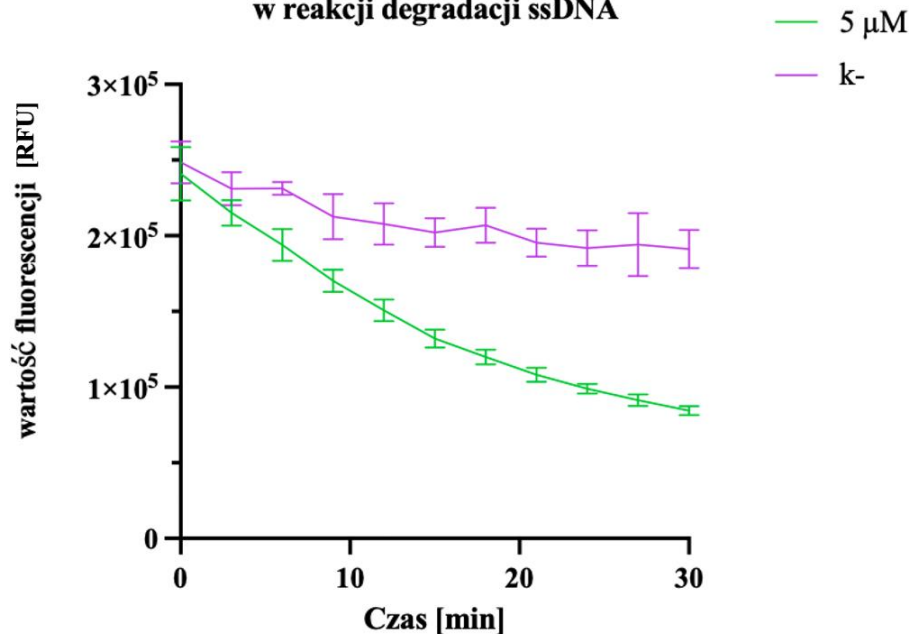
Potwierdzono, że wraz z wydłużaniem łańcucha ssDNA przyłącza się więcej cząsteczek Tioflawiny T, czego dowodem był wzrost sygnału mierzonej fluorescencji w czasie.

W drugim etapie opracowano test do badania aktywności degradacyjnej białka PNP łańcucha oligo-poli(A)*, w formacie podobnym do opisanego powyżej. Aby badać aktywność degradacyjną, w początkowym etapie wydłużano krótkie odcinki ssDNA (metoda opisana w podrozdziale 5.5.9). Zaobserwowano, że do stymulacji aktywności degradacyjnej białka PNP niezbędna jest obecność jonów magnezu (II), jonów żelaza (III) oraz fosforanów (PBS). Podczas skracania łańcucha oligo-poli(A)* (wydłużonego podczas reakcji polimeryzacji) obserwowano spadek bazowego sygnału przyłączonej Tioflawiny T, czego dowodem był spadek mierzonej fluorescencji w czasie. Wyniki badań przedstawiono na Ryc. 13b.



Ryc. 13a. Efekt wzrostu fluorescencji zależny od stężenia PNPazy *H. pylori* w reakcji polimeryzacji ssDNA. Sygnał fluorescencji monitorowano przez 30 minut (wzbudzenie = 450 nm, emisja = 492 nm). Stosując różne stężenia enzymu (1 μM, 2,5 μM i 5 μM) wykazało wyraźną zależność kinetyki narastania fluorescencji od stężenia. Nie zaobserwowano istotnego przyrostu sygnału w przypadku układu kontrolnego, nie zawierającego białka. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. RFU - relatywna jednostka fluorescencji, PNPaza - fosforylaza poliribonukleotydowa, ssDNA - jednoniciowy DNA.

**Efekt spadku fluorescencji zależny od stężenia PNPazy *H. pylori*
w reakcji degradacji ssDNA**



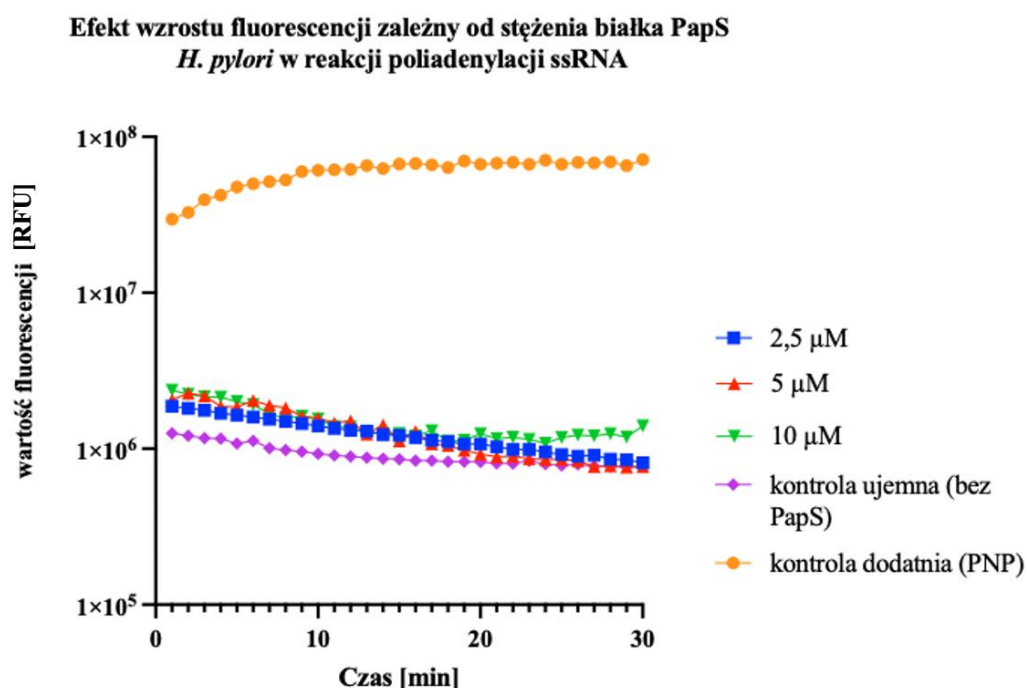
Ryc. 13b. Spadek sygnału fluorescencji w czasie reakcji degradacji oligo-poli(A)* katalizowanej przez PNPazę *H. pylori*. Fluorescencję monitorowano przez 30 minut (wzbudzenie 450 nm, emisja 492 nm). W obecności enzymu w stężeniu 5 μ M, odpowiadającym warunkom stosowanym w reakcjach polimeryzacji, obserwowano systematyczny spadek sygnału fluorescencji, zgodny z postępującą degradacją substratu. W próbce kontrolnej bez dodatku enzymu nie wykazano istotnych zmian sygnału w czasie. Przedstawiono średnią $\pm$ SD z trzech niezależnych powtórzeń. RFU - relatywna jednostka fluorescencji, PNPaza - fosforylaza poliribonukleotydowa, ssDNA – jednoniciowy DNA, k- - kontrola ujemna (bez enzymu)

6.3.2 Aktywność polimeryzacyjna białka PapS

Białko *H. pylori* PapS zostało sklasyfikowane w bazie UniProt.com (UniProt: 025357 stan na czerwiec 2025) jako polimeraza(A) RNA, co sugeruje, że posiada aktywność dodawania reszt adenozytowych do 3'-końca odcinków RNA, natomiast opisana aktywność nie została potwierdzona eksperymentalnie. W celu weryfikacji tej aktywności, przeprowadzano test fluorymetryczny, podobny do testu badania aktywności poliadenylacyjnej białka PNP z modyfikacjami (opis metodyki podrozdział 5.5.9). W każdej reakcji dodawano ssRNA jako substrat, Thioflawinę T jako znacznik fluorescencyjny oraz ATP. Badano aktywność białka PapS w trzech różnych stężeniach (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M). Kontrolę negatywną reakcji stanowiła próba bez enzymu. Wyniki badania przedstawiono na rycinie 14. Pomiar fluorescencji prowadzono przez 30 minut w temperaturze 25°C. Dla próbek z białkiem PapS w stężeniu 1,5 μ M fluorescencja zmieniła się z $1\,530\,815 \pm 244\,118$ do $1\,462\,364 \pm 215\,858$ jednostek RFU, co wskazuje

na nieistotny spadek sygnału w czasie. W stężeniu 3 μM PapS, wartość fluorescencji wynosiła początkowo $1\,874\,179 \pm 345\,909$, a końcowo $1\,764\,483 \pm 306\,529$ RFU, natomiast w próbkach zawierających białko o stężeniu 5 μM nastąpił nieistotny wzrost fluorescencji z $2\,063\,081 \pm 209\,924$ RFU do $2\,182\,620 \pm 509\,273$ RFU. W przypadku najwyższego stężenia, 10 μM , odnotowano spadek z $2\,368\,059 \pm 1\,154\,495$ RFU do $2\,154\,418 \pm 928\,750$ RFU.

W żadnym z testowanych stężeń białka PapS nie zaobserwowano narastania sygnału fluorescencji w czasie, które byłoby charakterystyczne dla reakcji polimeryzacji. Sygnał fluorescencji we wszystkich próbach pozostawał względnie stabilny, z niewielką tendencją malejącą, niezależnie od zastosowanego stężenia enzymu. Poziom sygnału fluorescencji w próbach zawierających białko PapS był porównywalny z wartością obserwowaną w próbce kontrolnej bez enzymu, co wskazuje na brak wykrywalnej aktywności polimeryzacyjnej w zastosowanym układzie eksperymentalnym.



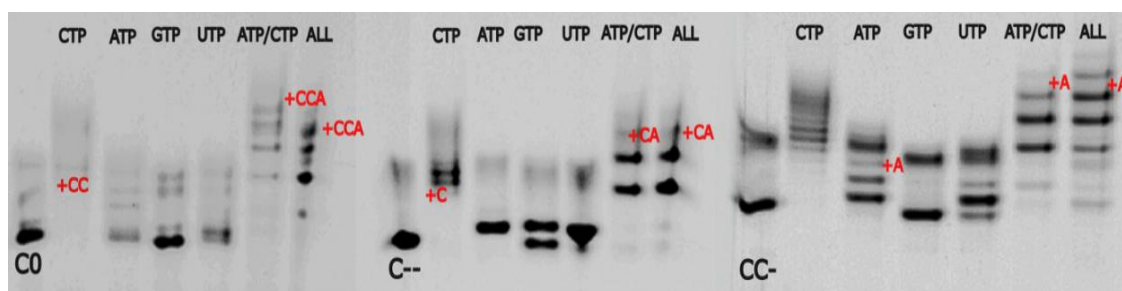
Ryc. 14. Brak narastania sygnału fluorescencji w reakcji poliadenylacji ssRNA katalizowanej przez białko PapS *H. pylori*. Sygnał fluorescencji monitorowano przez 30 minut (ekscytacja 450 nm, emisja 492 nm). Zastosowanie trzech różnych stężeń enzymu (2,5 μM , 5 μM i 10 μM) nie wykazało zależności kinetyki sygnału fluorescencji od stężenia białka. Przebieg reakcji w obecności PapS był porównywalny z próbą kontrolną bez enzymu. Przedstawiono średnią $\pm$ SD z trzech niezależnych powtórzeń. RFU - relatywna jednostka fluorescencji, PapS - białko PapS, ssRNA - jednoniciowy RNA, k- - kontrola ujemna (bez enzymu)

6.3.3 Aktywność dodawania CCA do tRNA przez białko PapS *H. pylori*

Produkty reakcji z substratami RNA C0-, C- i CC- analizowano w 15% żelu denaturującym poliakrylamidowym z mocznikiem (Ryc. 15). W próbach kontrolnych, w których nie dodano ani enzymu, ani nukleotydów, uzyskano wyłącznie prążki odpowiadające nienaruszonym substratom, co stanowiło punkt odniesienia do dalszych analiz. Szczegółowy opis metodyki znajduje się w podrozdziale 5.5.15.

Analiza produktów reakcji w denaturującym żelu UREA-PAGE wykazała, że PapS katalizuje dobudowę końca 3' tRNA zgodnie z oczekiwaną, sekwencyjną ścieżką C-C-A i wykazuje znaczącą specyficzność względem rodzaju nukleotydu w mieszaninie reakcyjnej. W obecności CTP obserwowano spowolnienie migracji substratów C0- i C-, odpowiadające ich cytydylacji: wariant C0- ulegał wydłużeniu do formy CC- (dwukrotne włączenie C), natomiast wariant C- do formy CC- (jednokrotne włączenie C). Dla substratu CC- sam CTP nie prowadził do powstania dominującego produktu końcowego, co potwierdza, że etap adenylacji wymaga obecności ATP. Wyniki zaprezentowano na rycinie 15.

W środowisku samego ATP zidentyfikowano wyraźne przesunięcie prążka dla substratu CC-, zgodne z adenylacją i wytworzeniem końca CCA ($CC- \rightarrow +A$). Dla substratów C0- oraz C- nie obserwowano analogicznie jednoznacznego, dominującego produktu w warunkach z samym ATP, co wskazuje, że wydajna konwersja tych form wymaga wcześniejszej cytydylacji zależnej od CTP. Najbardziej jednoznaczny obraz uzyskano w reakcjach z ATP+CTP, w których wszystkie trzy substraty były przekształcane do produktów odpowiadających pełnej lub brakującej części końca CCA: $C0- \rightarrow +CCA$, $C- \rightarrow +CA$, $CC- \rightarrow +A$. Analogiczny, zwykle najsilniejszy efekt obserwowano po zastosowaniu pełnego zestawu NTP, gdzie dodatkowo pojawiały się słabsze prążki, odzwierciedlające wolniej migrujące formy - interpretowane jako produkty uboczne/heterogenne wynikające z okazjonalnego nadwydłużenia 3' końca w warunkach *in vitro*. Reakcje prowadzone w obecności wyłącznie GTP lub UTP nie skutkowały zmianą mobilności prążków względem prób kontrolnych, co wskazuje na brak ich efektywnego włączania przez PapS w badanym układzie.



Ryc. 15. Ocena aktywności dobudowy końca CCA przez białko PapS z *H. pylori*. Substraty rybo-oligonukleotydowe znakowane Cy5 (C0-, C-, CC-) inkubowano z białkiem PapS w obecności pojedynczych nukleotydów lub ich mieszanin, a produkty reakcji rozdzielano w 15% denaturującym żelu UREA-PAGE i wizualizowano w kanale Cy5. Kolejność warunków dla każdego substratu: CTP, ATP, GTP, UTP, ATP+CTP, ALL. CTP/ATP/GTP/UTP - rybonukleozydo-5'-trifosforany; ALL - mieszanina NTP (ATP+CTP+GTP+UTP); UREA-PAGE - denaturująca elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z mocznikiem; Cy5 - fluorofof. Zaznaczono produkty odpowiadające sekwencyjnej rekonstrukcji końca CCA: C0- → +CCA, C- → +CA, CC- → +A.

6.3.4 Przesiewowe testy potencjalnych inhibitorów aktywności PNPazy *H. pylori*

W celu identyfikacji potencjalnych inhibitorów PNPazy *H. pylori* przeprowadzono przesiewowy test enzymatyczny obejmujący 8562 drobnocząsteczkowe związki chemiczne z dostępnej komercyjnie biblioteki związków bioaktywnych MedChemExpress. W pierwszym etapie oceniano wyłącznie hamowanie aktywności polimeryzacyjnej enzymu PNP w obecności każdego związku w stężeniu 100 μ M. Po 30 minutach inkubacji rejestrowano sygnał fluorescencji, a uzyskane dane odnoszono względem wartości początkowej, zgodnie z opisaną metodyką w podrozdziale 5.5.11. Na podstawie przeprowadzonych obliczeń wyłoniono 192 związki chemiczne, które w stężeniu 100 μ M powodowały $\geq 90\%$ zahamowanie aktywności poliadenylacyjnej PNPazy.

Następnie wyselekcjonowane związki przetestowano ponownie w stężeniu 1 μ M, w identycznych warunkach reakcji i według tego samego schematu normalizacji danych, w celu identyfikacji inhibitorów zachowujących aktywność przy obniżonym stężeniu jako potencjalnie bardziej efektywne. Do dalszych badań zakwalifikowano związki chemiczne, które hamowały aktywność enzymatyczną białka PNP w stopniu nie mniejszym niż 51%. W tym etapie wybrano 26 związków chemicznych.

Równolegle przeprowadzono analogiczne testy ukierunkowane na aktywność degradacyjną PNPazy wobec produktu reakcji poliadenylacji, określanego jako oligo-poli(A)*, co pozwoliło na wytypowanie dodatkowych 38 związków wykazujących

zahamowanie aktywności degradacyjnej PNPazy w stężeniu 1 μM , w stopniu nie mniejszym niż 51%.

Z uzyskanej puli związków wykluczono substancje wykazujące potencjalnie nieswoisty mechanizm działania, w szczególności te które wykazują właściwości interkalujące z DNA lub RNA. W kolejnym etapie przeprowadzono test przesiewowy na całych komórkach bakterii (ang. whole-cell screening), polegający na ocenie aktywności przeciwbakteryjnej wytypowanych związków wobec żywych komórek *H. pylori* na podstawie wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC). Testy prowadzono w obecności 50 μM każdego związku, analizując wpływ na wzrost szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT oraz szczepów *H. pylori* G27 Δpnp i *H. pylori* G27 pnp^{++} . W wyniku tego etapu wyselekcjonowano 23 związki wykazujące aktywność przeciwbakteryjną wobec *H. pylori*, które skierowano do dalszych badań. Szczegółowe wartości MIC przedstawiono w rozdziale 5.7.

6.4 Badanie oddziaływań międzybiałkowych

6.4.1 Charakterystyka sekwencji i domen białka PapS *H. pylori*

W celu scharakteryzowania białka PapS *H. pylori* (UniProt: O25357) oceniano sekwencji aminokwasowej oraz przewidywanej struktury trzeciorzędowej z wykorzystaniem narzędzia AlphaFold3. Uzyskany model strukturalny poddano następnie analizie w środowisku UCSF ChimeraX (wersja 1.10). W strukturze białka PapS zidentyfikowano konserwowany motyw EDxLR obejmujący reszty E157, D158, L160 i R161, tj. odpowiednio glutaminian PROF., asparaginian (D), leucynę (L) i argininę PROF. w pozycjach 157, 158, 160 i 161 sekwencji białka. Motyw ten jest charakterystyczny dla nukleotydylotransferaz klasy II i bierze udział w koordynacji jonów metali dwuwartościowych (Mg^{2+} , Mn^{2+}), niezbędnych do katalizy reakcji przyłączania nukleotydów do końca 3' RNA. Analogiczny motyw w wariantie EdxxR występuje również w poli(A) polimerazie I *E. coli*, co odzwierciedla wspólny rdzeń katalityczny enzymów należących do tej samej nadrodziny. Jednocześnie obecność reszty leucyny w pozycji 160 (L160) w białku PapS odpowiada wzorcowi obserwowanemu w enzymach typu CCA-dodającemu (ang. CCA-adding enzyme) i może mieć znaczenie dla stabilizacji struktury centrum aktywnego oraz potencjalnych interakcji z substratem RNA.

Przeprowadzono porównawcze wyrównanie sekwencji regionu zawierającego motyw EdxLR w białku PapS *H. pylori* oraz odpowiadających fragmentów enzymu CCA-

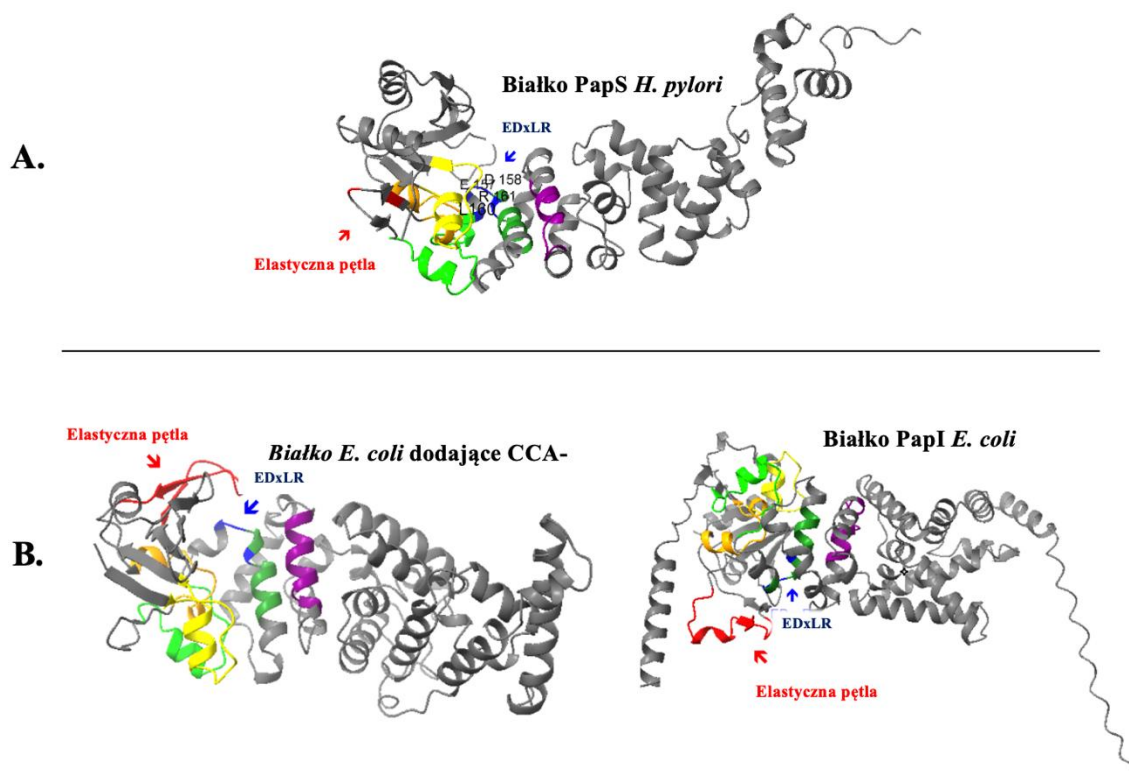
dodającego *E. coli* (UniProt: P06961) i poli(A) polimerazy I (*pcnB*) *E. coli* (UniProt: P0ABF1), z wykorzystaniem narzędzia Clustal Omega (EMBL-EBI). Analiza wykazała zachowanie kluczowych reszt kwasowych przy jednoczesnych różnicach w sekwencji aminokwasowej otaczającej rdzeń katalityczny, co jest typowe dla enzymów o wspólnym mechanizmie katalitycznym, lecz odmiennej specyficzności funkcjonalnej (Ryc. 16)

PapS <i>H. pylori</i>	P-FKGQNAIENQMIECVGEARLRF EDALR ILRSLRFSAT---LGFKIAPNTKEAVFAC-	187
CCA-adding <i>E. coli</i>	P-YNGLGDLQN---RLLRHVSPAF GEDPLR /LRVARFAARYAHLGFRIADETLALMREMT	164
PapI <i>E. coli</i>	DYVGGMKDLKDGVI RLIGNPETRY EDPVR MLRAVRFAAK---LGMRIISPETAEPRL-	234

PapS <i>H. pylori</i>	:ARLRF EDALR ILRSLRFSAT---LG	187
CCA-adding <i>E. coli</i>	I VSPAFGEDPLR /LRVARFAARYAHLG	164
PapI <i>E. coli</i>	I PETRYEDPVR MLRAVRFAAK---LG	234

Ryc. 16. Fragment porównawczego wyrównania sekwencji aminokwasowych białka PapS *H. pylori*, enzymu CCA-dodającego *E. coli* oraz poli(A) polimerazy I (*pcnB*) *E. coli*, obejmujący region zawierający konserwowany motyw EdxLR/EdxxR. Zaznaczono kluczowe reszty kwasowe motywu katalitycznego, charakterystycznego dla nukleotydylotransferaz klasy II. PapS - białko PapS; CCA-adding - enzym dobudowujący koniec CCA tRNA (CCA-dodający) z *E. coli*; PAP I - poli(A) polimeraza I *E. coli*

W modelu strukturalnym PapS *H. pylori* zaobserwowano również krótką, elastyczną pętlę zlokalizowaną pomiędzy motywami A i B w domenie N-końcowej. Pętla ta stanowi istotny element aparatu katalitycznego nukleotydylotransferaz klasy II i odgrywa kluczową rolę w selekcji nukleotydu oraz inkorporacji adenozyiny w reakcjach katalizowanych przez enzymy typu CCA-adding enzyme. Analogiczna pętla występuje zarówno w enzymach CCA-dodających, jak i w bakteryjnych poli(A) polimerazach, co wskazuje na ich ewolucyjne i strukturalne pokrewieństwo [137]. Jednocześnie analiza przestrzennego ułożenia motywu EdxLR, elastycznej pętli oraz sąsiadujących motywów katalitycznych wykazała, że w białku PapS ich wzajemna orientacja oraz dostępność w obrębie centrum katalitycznego są bardziej zbliżone do obserwowanych w enzymie CCA-dodającym *E. coli* niż w poli(A) polimerazie I, w której motyw EdxxR jest inaczej zorientowany i częściowo przesłonięty (Ryc.17).



Ryc. 17. Porównanie struktury trzeciorzędowej białka PapS *H. pylori* (A.) oraz enzymów referencyjnych *E. coli* (B.)

A. Model struktury trzeciorzędowej białka PapS *H. pylori* (UniProt: O25357) wygenerowany przy użyciu narzędzia AlphaFold3 i analizowany w środowisku UCSF ChimeraX. Zaznaczono konserwowany motyw EdxLR (kolor niebieski), krótką elastyczną pętlę zlokalizowaną pomiędzy motywami A i B (kolor czerwony) oraz dodatkowe konserwowane motywy katalityczne A-E charakterystyczne dla nukleotydylotransferaz klasy II. Przedstawione elementy ilustrują ich wzajemne ułożenie przestrzenne w obrębie centrum katalitycznego.

B. Modele struktur trzeciorzędowych enzymu CCA-dodającego *E. coli* (UniProt: P06961) oraz poli(A) polimerazy I (pcnB) *E. coli* (UniProt: P0ABF1), wygenerowane przy użyciu AlphaFold3 i analizowane w środowisku UCSF ChimeraX. Zaznaczono motyw EdxLR/EdxxR (kolor niebieski), elastyczną pętlę katalityczną (kolor czerwony) oraz konserwowane motywy A-E, umożliwiające bezpośrednie porównanie orientacji i dostępności elementów katalitycznych pomiędzy enzymami o pokrewnej architekturze strukturalnej. PapS - białko PapS; CCA-dodający - enzym dobudowujący koniec CCA tRNA *E. coli*; PAP I - poli(A) polimeraza I z *E. coli*; EdxLR/EdxxR - konserwowany motyw katalityczny nukleotydylotransferaz klasy II; UCSF ChimeraX - środowisko do wizualizacji i analizy struktur białek.

W testach aktywności poliadenylacyjnej, prowadzonych w różnych warunkach reakcji (jony Mg^{2+} i Mn^{2+} , obecność PEG 8000, substraty ssDNA i ssRNA), nie zaobserwowano wydłużania łańcucha poli(A). W odrębnych testach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykazano natomiast zdolność białka PapS do katalizowania reakcji dodawania sekwencji CCA do substratów naśladujących końce tRNA.

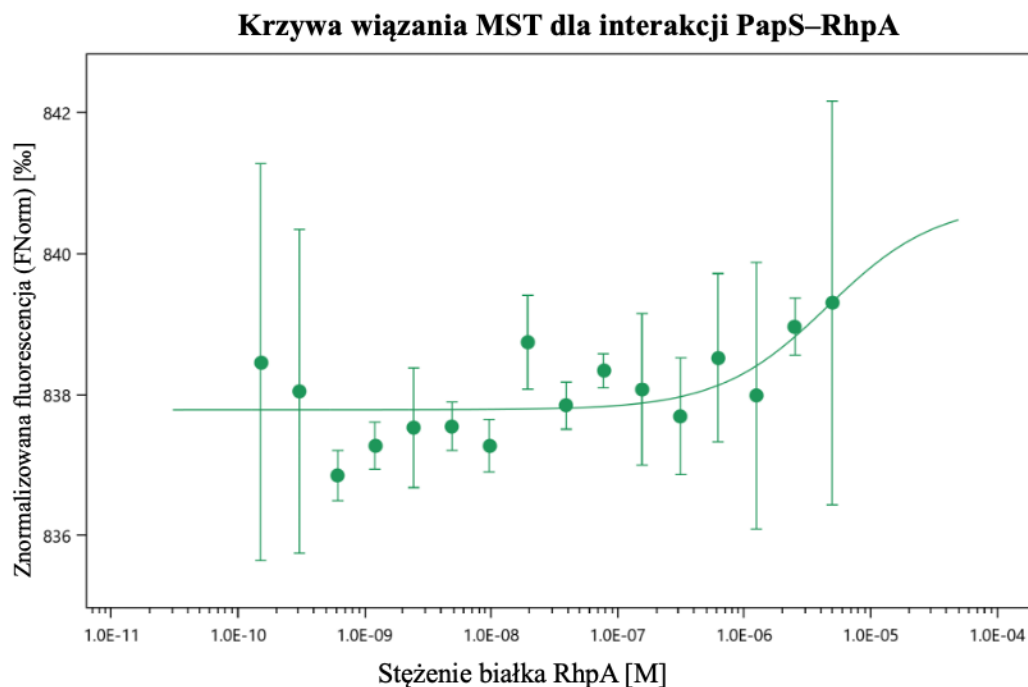
Dane wykorzystane w niniejszym podrozdziale zostały uzyskane w ramach pracy doktorskiej, a część wyników została równolegle wykorzystana w pracy licencjackiej

Pani Agaty Kręciejewskiej pt. “Decoding the role of *Helicobacter pylori* PapS Protein in tRNA biogenesis: A potential target for novel Antimicrobial Strategies” (Hogeschool Utrecht, Biologie & Medisch Laboratoriumonderzoek, Microbiologie; promotr: W. Hendriksen; opiekun stażu: dr hab. P. Płociński, prof. UŁ). Udział A. Kręciejewskiej miał charakter pomocniczy.

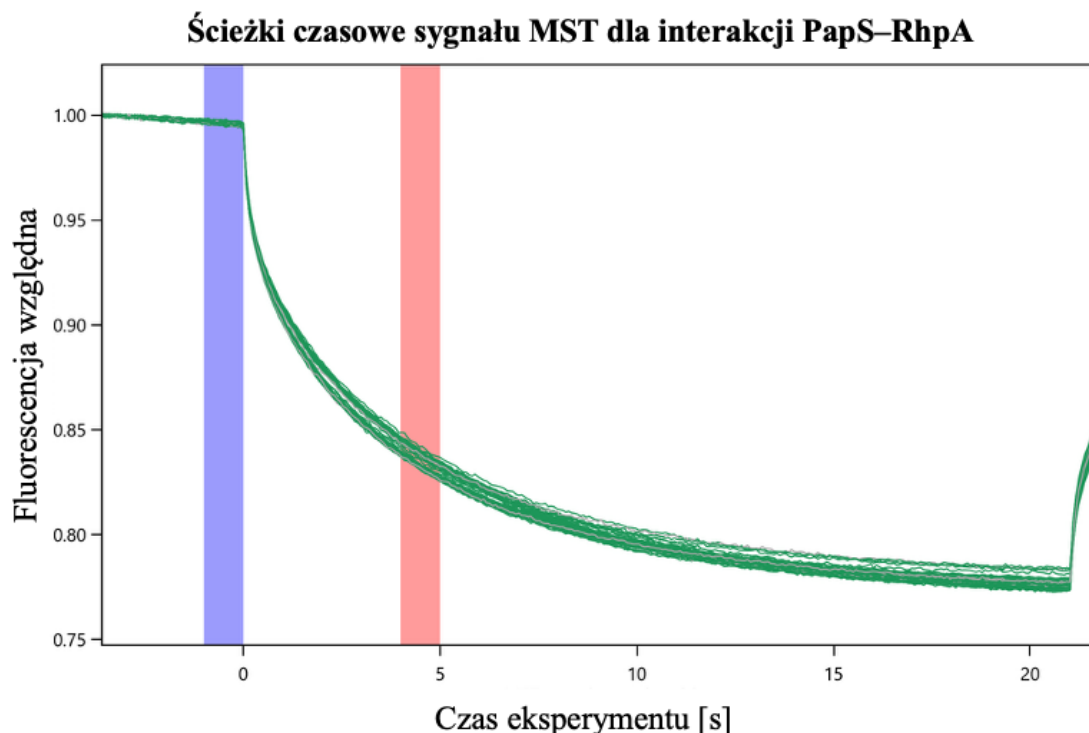
6.4.2 Termoforeza mikroskalarna

Analiza wyników termoforezy mikroskalarnej MST (ang. microscale thermophoresis) wykazała zależną od stężenia zmianę sygnału fluorescencji, zgodną z możliwym oddziaływaniem białka PapS z helikazą RhpA. Doświadczenie przeprowadzono z użyciem fluorescencyjnie znakowanego białka PapS (RED-NHS) w stężeniu 100 nM oraz białka RhpA w zakresie stężeń od 0,153 nM do 5 μ M.

Krzywa miareczkowania kompleksu PapS-RhpA (ryc. 18a) wykazywała przebieg zbliżony do sigmoidalnego, charakterystyczny dla reakcji zależnych od stężenia ligandu. W zakresie niskich stężeń RhpA ($<10^{-8}$ M) sygnał znormalizowanej fluorescencji (F_{norm}) utrzymywał się na względnie stałym poziomie ($\sim 837,8\%$). Wraz ze wzrostem stężenia RhpA obserwowano stopniowy wzrost sygnału, osiągający $\sim 840,7\%$ przy stężeniu 5 μ M. W zastosowanym zakresie stężeń nie uzyskano jednoznacznie zdefiniowanego plateau, co ogranicza precyzję wyznaczenia parametrów wiązania. Dopasowanie danych do modelu interakcji 1:1 wykazało wartość $K_d = 4,53 \pm 10,56$ μ M, przy amplitudzie zmiany sygnału 2,94 oraz stosunku sygnału do szumu (S/N) = 5,96. Standardowy błąd dopasowania regresji wynosił 0,53. Ze względu na wysoką niepewność oszacowania K_d , wynik należy traktować jako przybliżoną ocenę, wskazującą na słabe, przejściowe oddziaływanie pomiędzy białkami PapS i RhpA w zakresie mikromolowym. Wykresy ścieżek czasowych (rys. 18b) dla wszystkich stężeń RhpA wykazywały typowy przebieg odpowiedzi termoforetycznej: po fazie początkowej (0-1 s) następował spadek fluorescencji w strefie „gorącej” (4-5 s), a następnie stabilizacja sygnału. Ze względu na ograniczoną stabilność preparatu białkowego oraz koszty i ograniczenia dostępności pomiarów MST, nie przeprowadzono dodatkowych niezależnych serii eksperymentalnych ponad wykonane powtórzenia (3 powtórzenia biologiczne i 3 techniczne). W konsekwencji, mimo obserwowanej zależności sygnału od stężenia ligandu, oszacowanie K_d obarczone jest zwiększoną niepewnością i powinno być traktowane jako wartość przybliżona.



Ryc. 18a. Krzywa termoforezy mikroskalarnej (MST) do badania interakcji białek Rhpa-PapS. Analiza MST wykazała stężeniowo-zależną zmianę sygnału Fnorm dla układu PapS-Rhpa. Zmiana sygnału była nieistotna w porównaniu do rozrzutu pomiarowego, a w zastosowanym zakresie stężeń ligandu nie uzyskano jednoznacznie zdefiniowanego plateau, co ogranicza precyzję oceny parametrów wiązania. Dopasowanie do modelu 1:1 dało wartość K_d w zakresie mikromolowym ($K_d = 4,53 \mu\text{M}$), jednak niepewność dopasowania była wysoka ($\pm 10,56 \mu\text{M}$), dlatego wynik należy traktować jako przybliżoną ocenę powinowactwa (apparent K_d), wskazującą na słabe, przejściowe oddziaływanie białko-białko. PapS - białko PapS, Rhpa - Helikaza Rhpa.

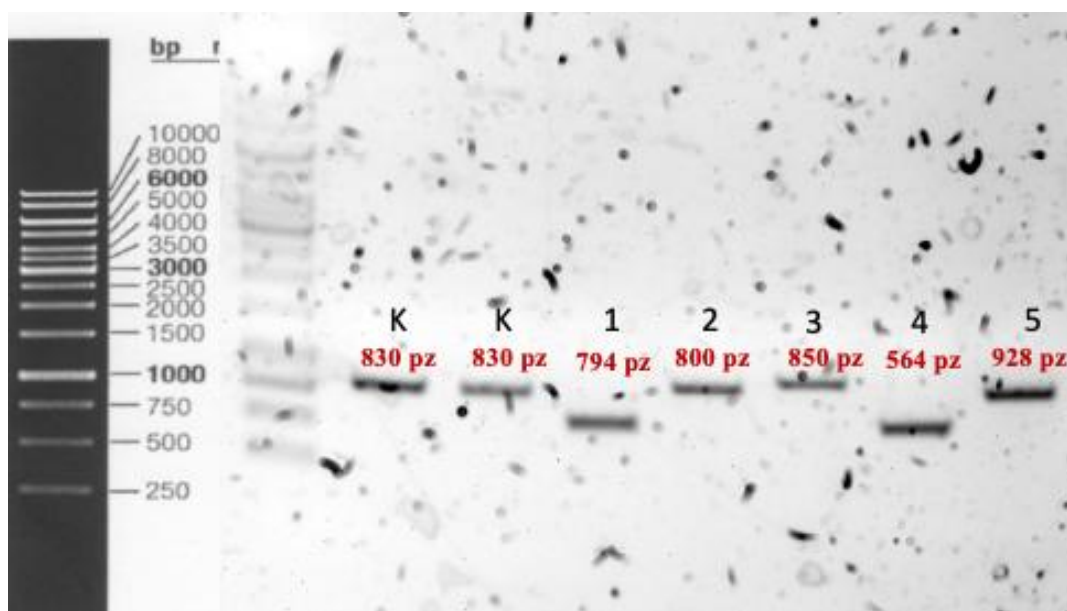


Ryc. 18b. Ścieżki czasowe sygnału termoforezy mikroskalarnej (MST) dla oddziaływań białek PapS-RhpA. Na wykresie przedstawiono przebieg zmian fluorescencji względnej (F) w czasie dla różnych stężeń ligandu (RhpA) w trakcie pomiaru MST. Niebieski pasek oznacza fazę początkową pomiaru, w której rejestrowana jest fluorescencja w warunkach bez ogrzewania próbki. Czerwony pasek wskazuje na moment włączenia podgrzewania wiązką promieniowania podczerwonego, wywołującego zjawisko termoforezy, a tym samym zmianę dystrybucji cząsteczek w układzie kapilarnym. Po włączeniu ogrzewania obserwuje się charakterystyczny spadek wartości fluorescencji, którego głębokość i przebieg różnią się w zależności od stężenia białka RhpA, co odzwierciedla różny stopień nasycenia kompleksu PapS-RhpA. Po etapie nagrzewania, sygnał stabilizuje się na niższym poziomie, a w końcowym etapie rejestruje się częściowy powrót fluorescencji związany z wyrównaniem temperatury w kapilarach. Powtarzalny kształt krzywych dla poszczególnych stężeń oraz niski poziom szumu tła wskazują na wysoką jakość pomiaru. PapS - białko PapS, RhpA - Helikaza RhpA.

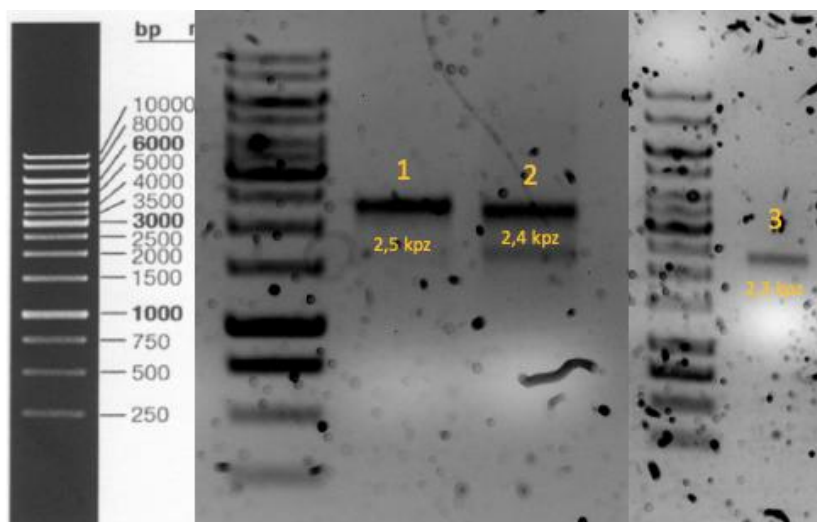
6.5 Konstrukcja szczepów delecyjnych *H. pylori* dla białek PNP, RhpA i PapS oraz przywracanie genu *pnp*

W celu uzyskania mutantów delecyjnych *H. pylori* przygotowano konstrukty delecyjne obejmujące kasetę oporności na kanamycynę oraz homologiczne regiony flankujące docelowych genów. Prawidłowość amplifikacji poszczególnych fragmentów potwierdzono analizując wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów PCR.

Na Ryc. 19 przedstawiono produkty reakcji PCR obejmujące kasetę oporności na kanamycynę (K) oraz rekombinowane fragmenty dla poszczególnych konstruktów delecyjnych. Otrzymano produkty o wielkościach zgodnych z oczekiwanymi: Kasetę oporności - 830 pz; konstrukt KanaCass0247F/190RkanaCassR - 794 pz.; konstrukt 0247 Δ F/0247KanaR - 800 pz; konstrukt KanaCass1213F/1213SelectionR - 850 pz; konstrukt PNP FOR F11 1213/1213KanaR - 564 pz; konstrukt PapSFor1/0640Kana Δ delR - 928 pz. Uzyskane fragmenty odpowiadały przewidywanym długościom, co potwierdza poprawne przygotowanie rekombinowanych produktów PCR.

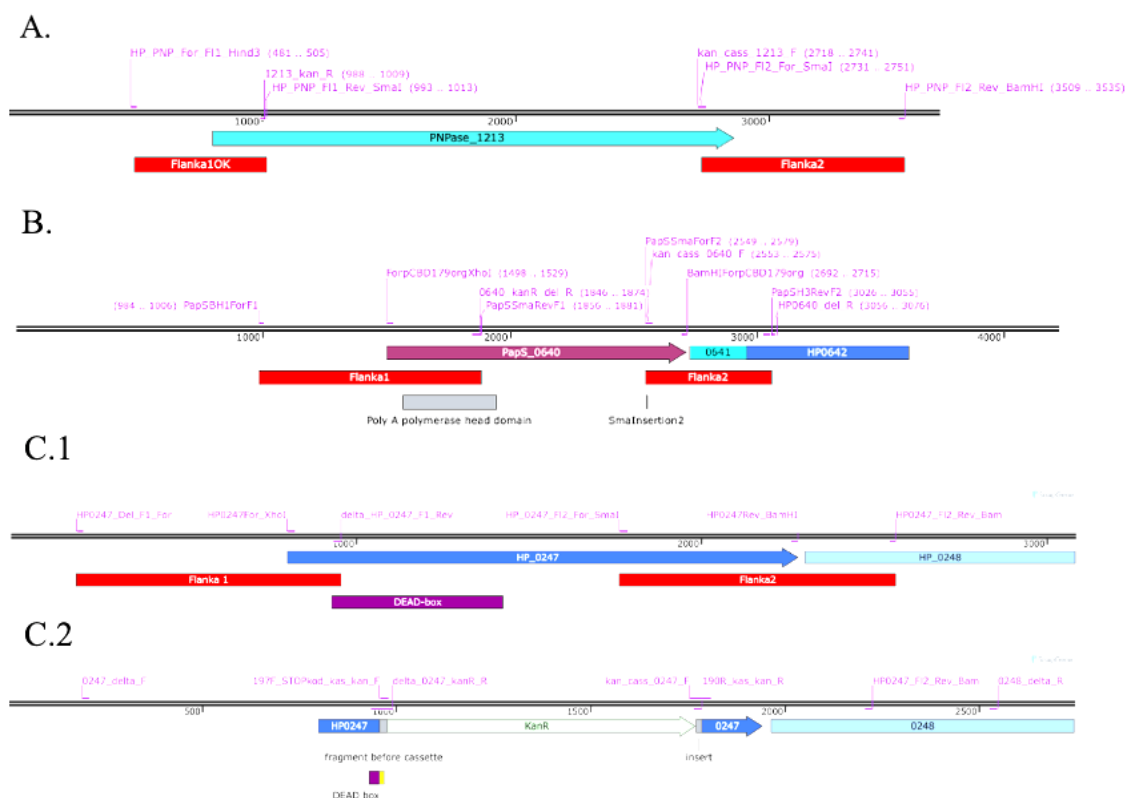


Ryc. 19. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR. Uzyskany obraz był podstawą analizy podczas przygotowania konstruktów rekombinacyjnych dla delecji genów *H. pylori*.



Ryc. 20. Obraz rozdziału elektroforetycznego konstruktów rekombinacyjnych przygotowanych metodą PCR z zachodzącymi na siebie fragmentami (z ang. overlap PCR) dla wybranych genów *H. pylori*. Widoczne są produkty o oczekiwanych długościach odpowiadających poszczególnym genom: 1. *pnp* (*hp_1213*) ~2,5 kbp; 2. *rhpA* (*hp_0247*) ~2,4 kbp; 3. *papS* (*hp_0640*) ~2,3 kbp. Uzyskane wielkości fragmentów potwierdzają poprawność konstrukcji rekombinacyjnych zawierających flankujące regiony genów oraz kasetę oporności na kanamycynę.

Wielkość uzyskanych fragmentów jest zgodna z przewidywaną wielkością konstruktu (flanki 5' i 3' + kasetka kanR), co potwierdza poprawność zaprojektowanej reakcji (ryc. 20). Uzyskane produkty zostały wykorzystane w transformacji naturalnej *H. pylori* w celu przeprowadzenia wymiany allelicznej i otrzymania szczepów delecyjnych.



Ryc. 21. Schemat przygotowania konstrukcji do inaktywacji genów metodą overlap PCR oraz oczekiwanej organizacji poszczególnych genów po rekombinacji homologicznej w genomie *H. pylori*.

(A) Projekt kasety delecyjnej dla genu *pnp* (*hp_1213*): dwa ramiona homologii (Flanka1/Flanka2) flankujące kasety oporności na kanamycynę (kanR); zaznaczono startery użyte do amplifikacji fragmentów.

(B) Analogiczny projekt kasety dla genu *105aps* (*hp_0640*).

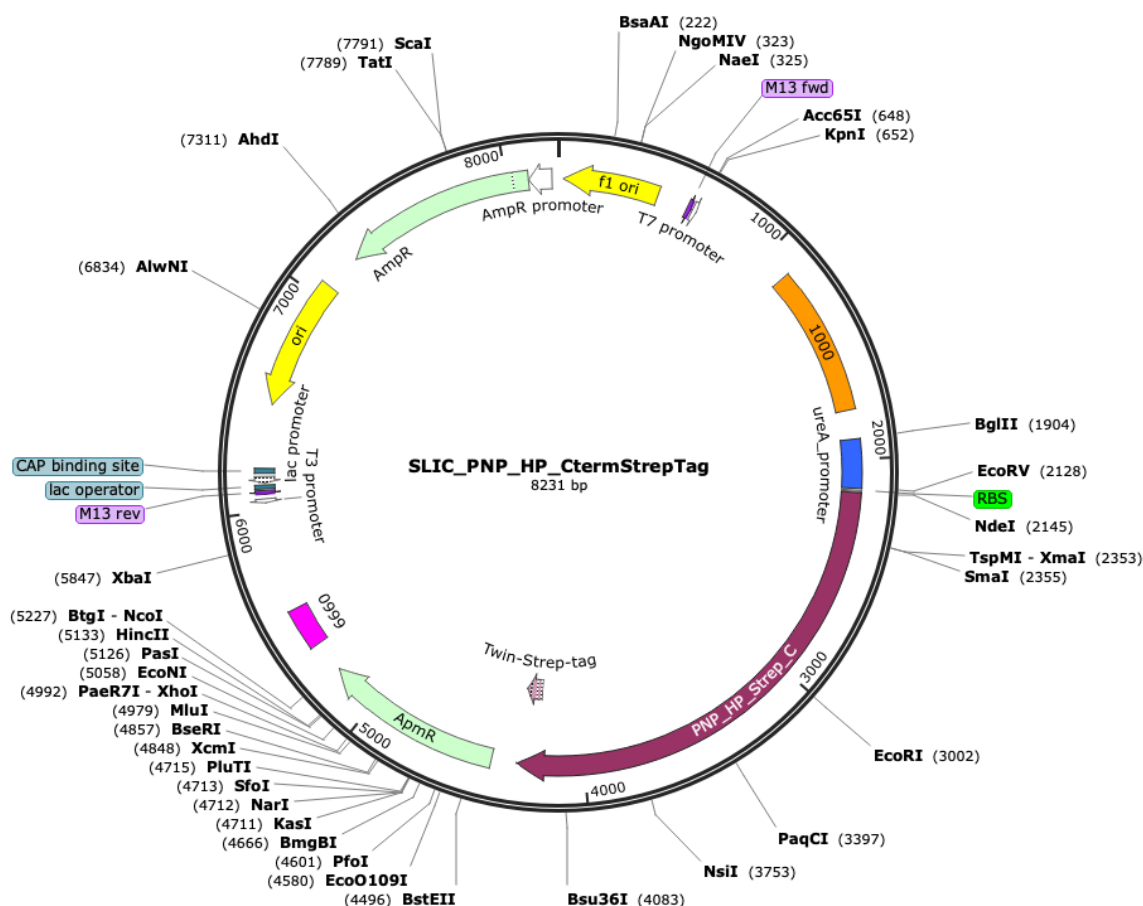
(C.1) Organizacja regionu chromosomalnego obejmującego gen *rhpA* (*hp_0247*) w szczepie *H. pylori* G27 WT oraz lokalizacja ramion homologii wykorzystywanych do przygotowania konstruktów.

(C.2) Oczekiwany układ locus po rekombinacji homologicznej: inaktywacja *rhpA* poprzez insercję kasety *kanR*, prowadząca do przerwania ciągłości sekwencji kodującej.

Uzyskane wyniki potwierdziły poprawność przygotowania konstrukcji delecyjnych genów *pnp*, *rhpA* i *paps* (Ryc. 21). Analiza elektroforetyczna wykazała produkty o oczekiwanych długościach zarówno dla fragmentów pośrednich, jak i dla pełnych, zligowanych konstruktów rekombinacyjnych. Zgodność wyników PCR z zaprojektowanymi mapami konstrukcji potwierdziła prawidłowość klonowań genetycznych, co umożliwiło ich dalsze wykorzystanie w procesie transformacji *H. pylori* w celu uzyskania mutantów delecyjnych.

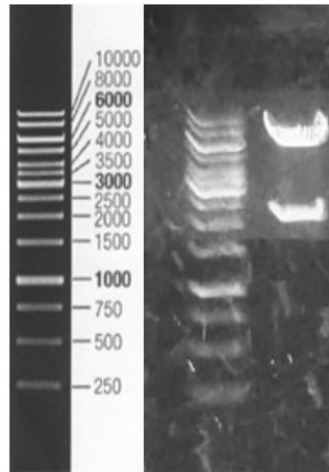
W celu komplementacji delecji genu *pnp* (*hp_1213*) przygotowano konstrukty genetyczne oparte na wektorze pUC19, w których umieszczono pełną sekwencję kodującą genu *pnp* umożliwiającą jego wytwarzanie jako białka fuzyjnego z dodanym

na C-końcu znacznikiem Strep-tag II. Uzyskany plazmid został zaprojektowany w taki sposób, aby ulegał integracji do chromosomu *H. pylori* w obrębie tzw. strefy plastyczności, co pozwalało na stabilne włączenie genu i jego ekspresję niezależnie od delekcji natywnego locus. Uzyskany konstrukt został zweryfikowany poprzez trawienie restrykcyjne enzymami NdeI/BamHI a następnie wykorzystany do transformacji naturalnej szczepu *H. pylori* G27 Δpnp . Dzięki temu uzyskano szczep komplementacyjny (*H. pylori* G27 *pnp*⁺⁺), w którym funkcjonalność genu została przywrócona poprzez integrację konstrukt do chromosomu (Ryc. 22).



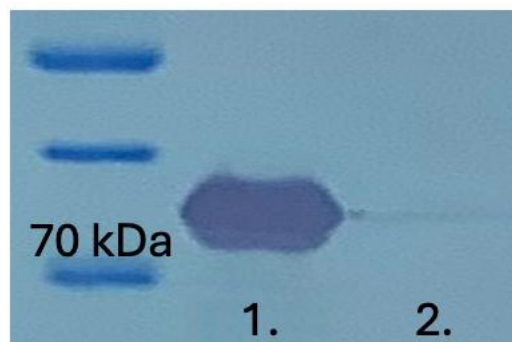
Ryc. 22. Mapa plazmidu SLIC_PNP_HP_CtermStrepTag (8231 pz) wykorzystanego do komplementacji delekcji genu *pnp* w szczepie *H. pylori* G27 Δpnp .

Plazmid zawiera pełną sekwencję kodującą genu *pnp* z dołączonym na C-końcu znacznikiem Strep-tag II, wklonowaną do zmodyfikowanego wektora pUC19. Konstrukcja nie posiada funkcjonalnego miejsca inicjacji replikacji w *H. pylori*, co wymusza jego integrację z chromosomem bakterii. Stabilna integracja zachodzi na drodze rekombinacji homologicznej w obrębie sekwencji homologicznej do regionu plastyczności chromosomu *H. pylori* (oznaczonej kolorem pomarańczowym), umożliwiając konstytutywną ekspresję genu *pnp* niezależnie od delekcji natywnego locus.



Ryc. 23. Obraz rozdziału elektroforetycznego po trawieniu restrykcyjnym plazmidu SLIC_PNP_HP_CtermStrepTag z użyciem enzymów NdeI i BamHI. Po trawieniu uzyskano dwa fragmenty o przewidywanych wielkościach: ~6,9 kbp (szkielet plazmidu) oraz ~1,4 kbp (fragment obejmujący sekwencję genu *pnp* wraz z flankami). Widoczne na żelu dwa prążki (brzegowa ścieżka po prawej stronie) odpowiadają oczekiwany produktom, co potwierdza poprawność przygotowanej konstrukcji plazmidowej.

Dodatkowo, obecność białka PNP w szczepie komplementacyjnym potwierdzono metodą Western blotting z użyciem przeciwciał anti-Strep-tag II. Sygnał immunoreaktywny wykryto wyłącznie w próbkach pochodzących ze szczepu *H. pylori* G27 Δpnp^{++} , natomiast nie był on obecny w szczepie delecyjnym Δpnp , co potwierdza skuteczne przywrócenie ekspresji genu *pnp* na poziomie białka.



Ryc. 24. Obraz analizy Western blottingu potwierdzający ekspresję białka PNP-Strep-tag II w szczepie komplementacyjnym *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . Detekcję przeprowadzono z użyciem przeciwciał anti-Strep-tag II. **1** - lizaty komórkowe szczepu *H. pylori* G27 Δpnp^{++} (szczep komplementacyjny); **2** - lizaty komórkowe szczepu *H. pylori* G27 Δpnp (mutant delecyjny). Oznaczono pozycję markera masy cząsteczkowej (~70 kDa). Sygnał immunoreaktywny obserwowano wyłącznie w próbkach szczepu komplementacyjnego.

6.6 Testy fenotypowe szczepu *H. pylori* G27 WT, Δpnp oraz Δpnp^{++}

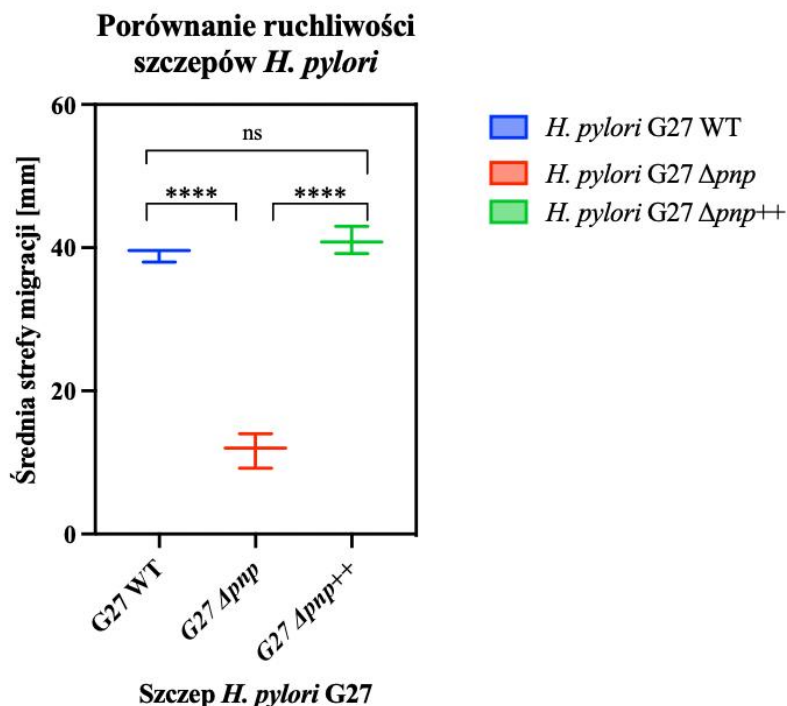
6.6.1 Ocena ruchliwości

Zdolność ruchu szczepu *H. pylori* G27 WT, szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp oraz szczepu komplementacyjnego *H. pylori* G27 Δpnp^{++} oceniano na półpłynnym podłożu Brucella agar (0,35% agaru) z dodatkiem 10% FBS. Po 5 dniach inkubacji w warunkach mikroaerofilnych w temperaturze 37°C, oceniano migrację szczepów poprzez mierzenie długości strefy migracji z miejsca pierwotnej inokulacji. Wyniki oznaczeń przedstawiono na ryc. 25.

Szczep *H. pylori* G27 Δpnp wykazywał istotnie obniżoną ruchliwość względem szczepu dzikiego WT, ze średnią średnicą strefy migracji wynoszącą 11,73 mm (wobec 39,07 mm dla WT). Z kolei szczep *H. pylori* G27 Δpnp^{++} wykazywał przywrócony fenotyp ruchliwości (średnio 41,00 mm), bez różnic istotnych w porównaniu do szczepu WT.

Dane zostały poddane analizie statystycznej z zastosowaniem testu nested one-way ANOVA, w obrębie trzech niezależnych powtórzeń biologicznych ($n = 3$). Analiza wykazała istotny efekt grupowy ($p < 0,0001$; $F(2, 42) = 320,9$), bez istotnych różnic wewnątrz powtórzeń biologicznych, co wskazuje na wysoką spójność i powtarzalność danych.

W celu identyfikacji różnic między parami grup zastosowano test post-hoc Tukeya z poprawką na wielokrotne porównania. Różnice pomiędzy *H. pylori* G27 WT a *H. pylori* G27 Δpnp oraz pomiędzy *H. pylori* G27 Δpnp a *H. pylori* G27 Δpnp^{++} okazały się statystycznie istotne ($p < 0,0001$), natomiast porównanie *H. pylori* G27 WT a *H. pylori* G27 Δpnp^{++} wykazało brak istotności statystycznej ($p = 0,3029$), co może wskazywać, że delecja genu *pnp* u *H. pylori* może wpływać negatywnie na ruchliwość tego drobnoustroju.



Ryc. 25. Porównanie zdolności tworzenia przedstawiający wyniki oceny ruchliwości szczipów *H. pylori* G27 WT, G27 Δpnp oraz szczepu komplementacyjnego G27 Δpnp^{++} na półpłynnym podłożu Brucella agar (0,35% agaru, 10% FBS) po 5 dniach inkubacji. Przedstawiono średnie średnice stref migracji (w mm) $\pm$ SD. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą nested one-way ANOVA z testem post-hoc Tukeya. Znak „****” oznacza $p < 0,0001$, „ns” - brak istotności statystycznej ($p > 0,05$).

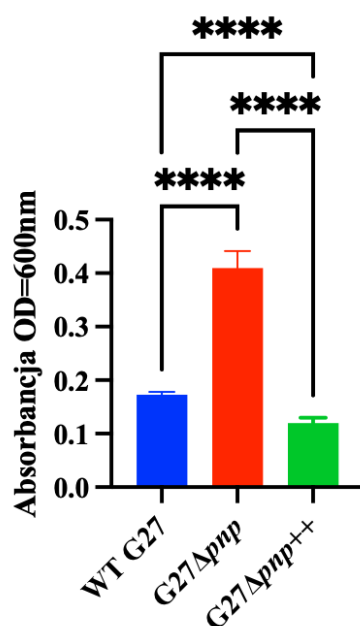
6.6.2 Ocena zdolności tworzenia biofilmu

W celu oceny wpływu białka PNP na zdolność do tworzenia biofilmu przez *H. pylori*, porównywano fenotyp szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT, szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp oraz szczepu komplementacyjnego *H. pylori* G27 Δpnp^{++} po 72 godzinach hodowli w obecności 10% FBS. Ilość biofilmu oceniano metodą spektrofotometryczną mierząc absorbancję po barwieniu fioletem krystalicznym, przy długości fali 600nm (metodyka opisana w podrozdziale 5.6.3). Dane poddawano analizie statystycznej z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem Tukeya jako analizą post-hoc.

Wyniki analizy ANOVA wykazały istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami ($F(2, 21) = 429,2$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9761$), co potwierdza silny wpływ obecności białka PNP na ilość wytwarzanego biofilmu. Testy Bartlett’a i Browna-Forsythe’a wykazały istotne różnice wariancji między grupami, ale ze względu na zrównoważoną liczebność próbek ($n = 8$ w każdej grupie) i bardzo wysokie wartości F , przeprowadzona analiza zachowuje moc interpretacyjną.

Szczep delecyjny *H. pylori* G27 Δpnp wykazywał istotnie wyższą zdolność tworzenia biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego *H. pylori* G27 (średnia różnica: 0,2379; 95% CI: 0,2112-0,2645; $p < 0,0001$), co sugeruje, że brak funkcjonalnego białka PNP sprzyjał formowaniu biofilmu przez te bakterie. Szczep komplementarny G27 Δpnp^{++} charakteryzował się istotnie znacząco niższą zdolnością tworzenia biofilmu w tych samych warunkach w porównaniu do szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp (różnica: 0,2907; 95% CI: 0,2641-0,3174; $p < 0,0001$). Różnica pomiędzy szczepem dzikim a szczepem z przywróconą ekspresją białka PNP, była istotna statystycznie (różnica: 0,05286; 95% CI: 0,0262-0,0795; $p = 0,0001$).

**Porównanie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy
H. pylori G27 WT, G27 Δpnp oraz G27 Δpnp^{++}
po 72 godzinach inkubacji**



Ryc. 26. Porównanie zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *H. pylori* G27, *H. pylori* G27 Δpnp i *H. pylori* G27 Δpnp^{++} po 72 godzinach w teście z fioletem krystalicznym. Efektywność tworzenia biofilmu określono na podstawie pomiaru absorbancji przy 600 nm po barwieniu fioletem krystalicznym. Przedstawiono średnie $\pm$ SEM. Różnice między grupami oceniono testem ANOVA z testem post-hoc Tukeya. **** $p < 0,0001$. WTG27 - Szczep dziki *H. pylori*, G27 Δpnp - szczep delecyjny genu *pnp* *H. pylori*, G27 Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny *H. pylori* genu *pnp* *H. pylori*,

6.6.3 Ocena aktywności katalazy

Oceniano aktywność wewnątrzkomórkowej katalazy *H. pylori*, w lizatach szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} (metodyka opisana w podrozdziale 5.6.4.), na podstawie rozkładu H_2O_2 wg. następującej reakcji:



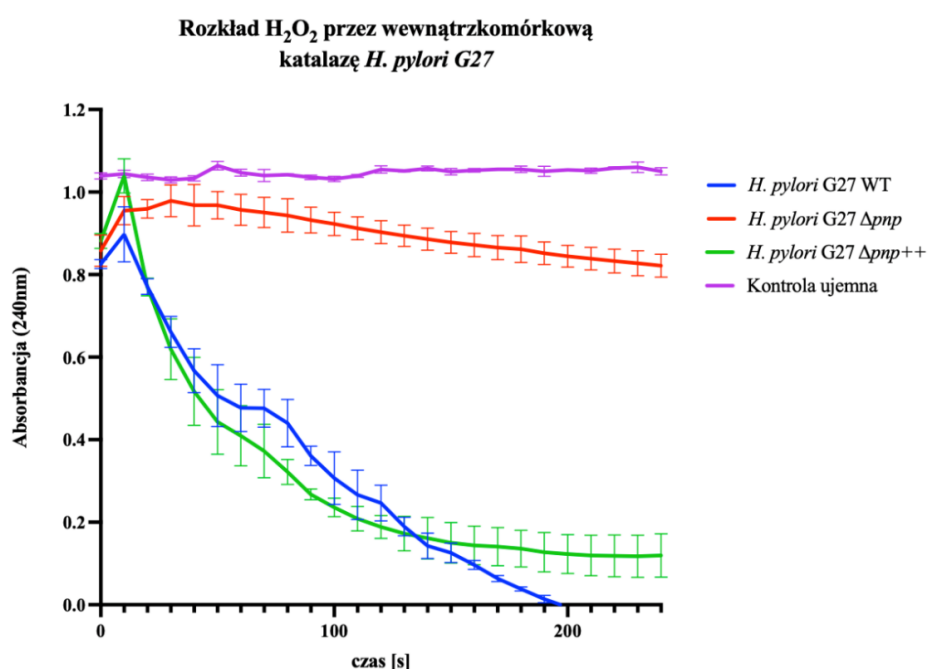
W celu ilościowej oceny aktywności katalazy w szczepach *H. pylori* przeprowadzono analizę obejmującą:

- A. Ocenę obszaru pod krzywą AUC (ang. *Area under the curve*) jako miara ilości H_2O_2 w czasie trwania eksperymentu. Obszar AUC wyrażany jest w jednostkach absorbancji pomnożonych przez czas ($AU \cdot s$, gdzie AU = jednostka absorbancji, s = sekundy). Niższe wartości AUC wskazują na szybszy i skuteczniejszy rozkład nadtlenu wodoru.
- B. Ocena początkowego tempa reakcji enzymatycznej (nachylenia krzywej w pierwszych 60 s trwania reakcji, reprezentujący tempo reakcji - im bardziej ujemna wartość, tym szybszy rozkład H_2O_2 , nachylenie wyrażane jest w AU/s).
- C. Ocenę czasu połowicznego rozkładu H_2O_2 ($t_{1/2}$) (czas potrzebny do redukcji H_2O_2 o połowę). Wartości reprezentują średnie z pięciu niezależnych powtórzeń biologicznych ($n = 5$) wraz z odchyleniem standardowym.

Wyniki z testu oceny aktywności katalazy badanych szczepów przedstawiono na ryc. 27 oraz w tabeli 6. Dla szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT wykazano najniższą wartość AUC (średnio $\sim 69 AU \cdot s$), co świadczy o efektywnym i szybkim rozkładzie H_2O_2 . Dla szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp wykazano znacznie wyższą AUC ($\sim 221 AU \cdot s$), co wskazuje słabszą aktywność enzymatyczną katalazy tego szczepu. W badaniu szczepu komplementacyjnego *H. pylori* G27 Δpnp^{++} wykazano wartości pośrednie ($\sim 92 AU \cdot s$), co sugeruje częściowe odzyskanie aktywności enzymatycznej po przywróceniu ekspresji genu PNPazy. Analizując nachylenia krzywych wykazano, dla szczepów *H. pylori* G27 WT oraz *H. pylori* G27 WT Δpnp^{++} ujemne wartości początkowego nachylenia krzywej, odzwierciedlające szybki spadek ilości H_2O_2 w ciągu pierwszych 60 sekund, co świadczy o rozkładzie H_2O_2 . Dla szczepu *H. pylori* G27 Δpnp oraz kontroli ujemnej (H_2O_2 bez dodatku enzymu) nachylenie krzywej było bliskie zeru lub przyjmowało wartości

dodatnie, co potwierdza brak aktywności katalazy. Czas połowicznego rozkładu H_2O_2 ($t_{1/2}$) wynosił średnio 83 s dla szczepu G27 WT oraz 57 s dla G27 Δpnp^{++} . W przypadku szczepu *H. pylori* G27 Δpnp oraz kontroli ujemnej, nie zaobserwowano spadku poniżej połowy wartości początkowej.

Wyniki zostały poddane analizie statystycznej w teście ANOVA, oraz Kruskala-Wallisa. Analizy wykazały istotne różnice pomiędzy grupami dla AUC ($p < 0,000000000006$; $p \approx 0,0188$) oraz nachylenia ($p \approx 0,000007$; $p \approx 0,0188$). Obserwowane zmiany sugerują, że obecność PNPaży może pośrednio warunkować aktywność katalazy.



Ryc. 27. Rozkład H_2O_2 przez wewnątrzkomórkową katalazę *H. pylori*: (1A) Szczep dziki *H. pylori* G27 WT; (1B) szczep komplementacyjny G27 Δpnp^{++} ; (1C) szczep delecyjny G27 Δpnp ; (1D) kontrola negatywna (H_2O_2 bez dodatku lizatu komórkowego). Przedstawiono zmiany absorbancji H_2O_2 przy 240 nm w czasie reakcji. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ SD z pięciu niezależnych powtórzeń biologicznych ($n = 5$). Kontrola ujemna - próba bez dodatku lizatu.

Tabela 6. Zestawienie parametrów kinetycznych reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru przez katalazę szczepów *H. pylori* (G27 WT, Δpnp , Δpnp^{++}).

Grupa	AUC (AU·s) +- SD AUC	Nachylenie (AU/s)	SD Nachylenia	$t_{1/2}$ (s)
<i>H. pylori</i> G27 WT	69 +- 5	-0.0043	0.0005	83.0
<i>H. pylori</i> G27 Δpnp	221 +- 12	0.0001	0.0003	
<i>H. pylori</i> G27 Δpnp^{++}	92 +- 7	-0.0028	0.0004	57.0

W tabeli rzedstawiono wartości pola pod krzywą (AUC, AUx s), nachylenie początkowe krzywej (AU/s), oraz wyliczony czas połowicznego rozkładu H_2O_2 ($t_{1/2}$, w sekundach). Dane pochodzą ze średnich z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. WT - szczep dziki, *H. pylori* G27; Δpnp - szczep *H. pylori* G27 z delecją genu *pnp*, Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny (Δpnp z przywróconą ekspresją genu *pnp*). AUC (area under the curve) - pole pod krzywą wyrażone w AU·s, gdzie AU (arbitrary units) oznacza jednostki umowne sygnału; AU/s - jednostka nachylenia (jednostki umowne na sekundę). SD (standard deviation) - odchylenie standardowe; $t_{1/2}$ - czas połowicznego rozkładu H_2O_2 (s).

6.6.4 Analiza kinetyczna aktywności ureazy szczepów *H. pylori*

W celu oceny wpływu delecji genu *pnp* na aktywność ureazy *H. pylori* przeprowadzono pomiar kinetyki wytwarzania ureazy przez szczepy *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz szczep komplementacyjny *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . Reakcję inicjowano przez dodanie mocznika (substratu ureazy) do mieszaniny reakcyjnej, a postęp hydrolizy mocznika monitorowano pośrednio na podstawie zmian pH rejestrowanych jako zmiana OD₅₆₀. Aktywność enzymatyczna była mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 560 nm (OD₅₆₀), w 5 minutowych interwałach przez 200 minut, co odpowiada jednemu podziałowi komórki *H. pylori* (+180 min.). Szczegółowa metodyka została opisana w podrozdziale 5.6.5.

Uzyskane dane umożliwiły przeprowadzenie ilościowych porównań pomiędzy aktywnością ureazy badanych szczepów w zakresie: A) całkowitej aktywności enzymu (AUC), B) szybkości początkowej reakcji, C) maksymalnej aktywności enzymu (szczytowy pomiar OD). Wyniki przedstawiono w tabeli nr. 7, oraz na rycinie 28.

W pierwszym etapie obliczono pole pod krzywą (AUC) dla każdej serii pomiarowej, przyjmując linię bazową na poziomie $Y = 0$. Analizę przeprowadzono dla pięciu niezależnych powtórzeń biologicznych dla każdego szczepu. Średnia wartość AUC dla szczepu *H. pylori* G27 WT wynosiła $61,20 \pm 0,25$, natomiast dla szczepu *H. pylori* Δpnp $27,88 \pm 0,18$, co stanowiło ok. 45% aktywności ureazy szczepu dzikiego. Dla szczepu

komplementacyjnego *H. pylori* G27 *pnp*⁺⁺ osiągał średnią wartość AUC wynoszącą $60,97 \pm 0,14$. Jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA) wykazała istotne statystycznie różnice między grupami ($F(2,12) = 991,5$, $p < 0,0001$). Analiza z wykorzystaniem post-hoc Tukeya wykazała, że różnice pomiędzy *H. pylori* G27 Δpnp a pozostałymi szczepami *H. pylori* były istotne statystycznie ($p < 0,0001$), natomiast zaobserwowano brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy szczepami *H. pylori* G27 *pnp*⁺⁺ a *H. pylori* G27 WT ($p = 0,9616$).

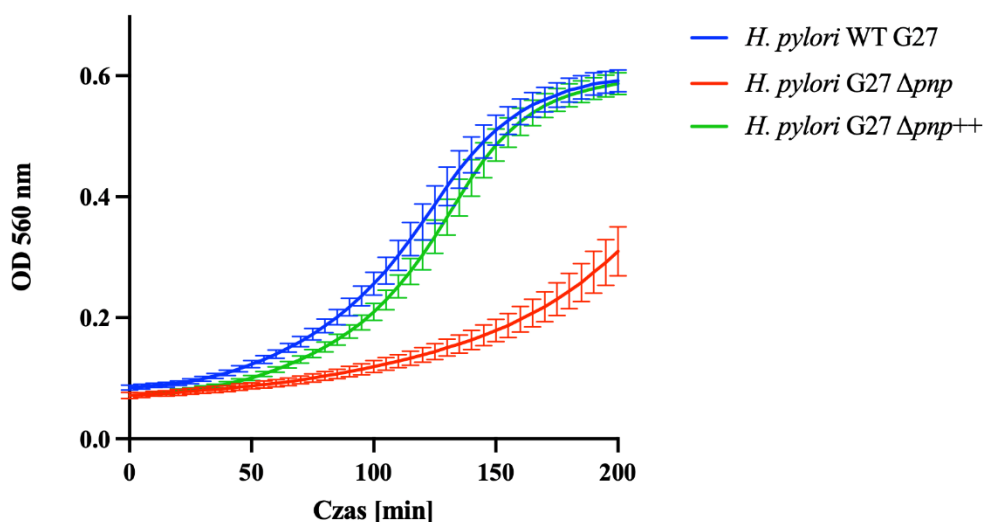
Zaobserwowano, że szczep *H. pylori* G27 Δpnp wykazywał wolniejsze tempo wzrostu aktywności enzymatycznej w porównaniu do *H. pylori* G27 WT i *H. pylori* G27 *pnp*⁺⁺. Analiza szybkości początkowej reakcji wykazała, że wartości nachylenia krzywych wynosiły odpowiednio: 0,0009009 OD/min dla szczepu *H. pylori* G27 WT; 0,0003405 OD/min dla *H. pylori* G27 Δpnp oraz 0,0009000 OD/min dla *H. pylori* G27 *pnp*⁺⁺. Współczynnik determinacji (R^2) przekraczał 0,87 dla wszystkich krzywych, co świadczy o bardzo dobrym dopasowaniu regresji liniowej. Statystyczna analiza porównawcza nachyleń wykazała istotne różnice pomiędzy szczepami ($F(2,189) = 128,9$, $p < 0,0001$). Maksymalna aktywność ureazy uzyskana dla szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 *H. pylori* G27 *pnp*⁺⁺ wynosiły odpowiednio 0,5915 i 0,5911, a dla szczepu *H. pylori* G27 Δpnp 0,3073, co odpowiada ok. 52% maksymalnej aktywności obserwowanej u szczepu WT. Wszystkie szczepy osiągały maksymalną aktywność po 200 minutach inkubacji.

Tabela 7. Zestawienie parametrów reakcji enzymatycznej ureazy dla trzech szczepów *Helicobacter pylori* (G27 WT, Δpnp oraz Δpnp ⁺⁺), uzyskanych na podstawie analizy kinetyki reakcji barwnej z mocznikiem i odczynnikiem fenol-czerwień tymolowa (OD₅₆₀).

Szczep <i>H. pylori</i>	AUC (średnia)	AUC (SEM)	Szybkość początkowa reakcji	R ²	Max. Wartość OD560	95% CI AUC (min)	95% CI AUC (max)
G27 WT	61.2	0.2509	0.0009009	0.9061	0.5915	60.71	61.7
G27 Δpnp	27.88	0.1804	0.0003405	0.8746	0.3073	27.53	28.24
G27 Δpnp ⁺⁺	60.97	0.1446	0.0009	0.9392	0.5911	60.69	61.25

Podano wartości pola pod krzywą (AUC, średnia), błędu standardowego średniej (SEM), szybkości początkowej reakcji (nachylenie krzywej), współczynnika determinacji dopasowania krzywej (R^2), maksymalnej zmierzonej wartości absorbancji (OD₅₆₀), oraz przedziałów ufności 95% (CI) dla AUC. Dane pochodzą ze średnich z co najmniej trzech niezależnych powtórzeń biologicznych.

**Aktywność ureazy szczepów *H. pylori* oceniana
na podstawie alkalizacji podłoża Stuart's Broth z czerwienią fenolową**



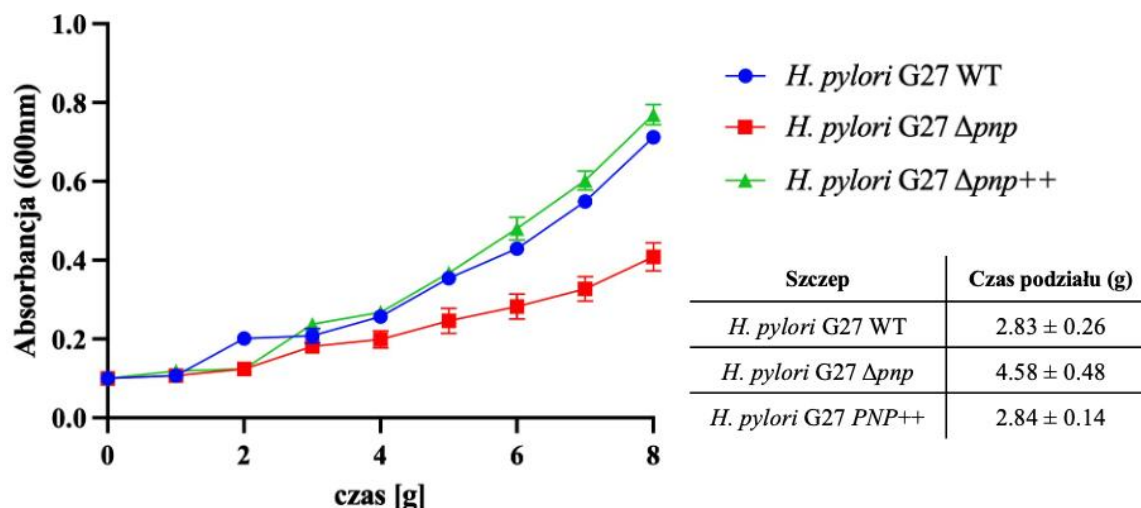
Ryc. 28. Aktywność ureazy szczepów *H. pylori* oceniana na podstawie alkalizacji podłoża Stuart's Broth z czerwienią fenolową. Na wykresie przedstawiono przebieg reakcji enzymatycznej mierzonej metodą spektrofotometryczną (OD₅₆₀ nm) dla szczepów *H. pylori* G27 WT, Δpnp oraz Δpnp^{++} podczas 200 minut inkubacji w podłożu Stuart's Broth zawierającym mocznik i czerwień fenolową jako wskaźnik pH. Punkty na krzywych przedstawiają średnie z pięciu niezależnych pomiarów biologicznych $\pm$ SD. Dla lepszej czytelności, dane dla szczepu Δpnp^{++} zostały graficznie przesunięte o +10 min na osi X. WT - szczep dziki (wild type) *H. pylori* G27; Δpnp - szczep *H. pylori* G27 z delecją genu *pnp*; Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny (Δpnp z przywróconą ekspresją genu *pnp*); OD₅₆₀ - gęstość optyczna mierzona przy 560 nm; SD - odchylenie standardowe.

6.6.5 Czas generacji szczepów *H. pylori* w 37°C

W celu oceny wpływu delecji genu *pnp* na tempo wzrostu *H. pylori*, mierzono czas generacji trzech szczepów: *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* Δpnp oraz *H. pylori* Δpnp^{++} poprzez pomiar zmętnienia podłoża (OD=600 nm) Brucella Broth + 10% FBS w warunkach mikroaerofilnych w 37°C z ciągłym wytrząsaniem (metodyka opisana w rozdziale 4.1.2). Analiza statystyczna została przeprowadzona na podstawie danych uzyskanych z fazy logarytmicznej wzrostu (czas pomiędzy 3 a 7 godziną hodowli), w której wzrost bakterii przebiegał w sposób wykładniczy ($R^2 > 0,98$) (Ryc. 29). Dla każdego powtórzenia biologicznego wartości OD₆₀₀ zostały przekształcone do logarytmu naturalnego (ln OD), a następnie wykorzystane do dopasowania funkcji liniowej opisującej zależność ln OD od czasu w zakresie fazy logarytmicznej. Na podstawie nachylenia tej funkcji, obliczono czas potrzebny do podwojenia liczby komórek (Td) według wzoru:

$$\text{Czas generacji} = \frac{\ln(2)}{\text{nachylenie krzywej}} \approx \frac{0.693}{\text{nachylenie krzywej}}$$

Krzywa wzrostu *H. pylori* w 37°C

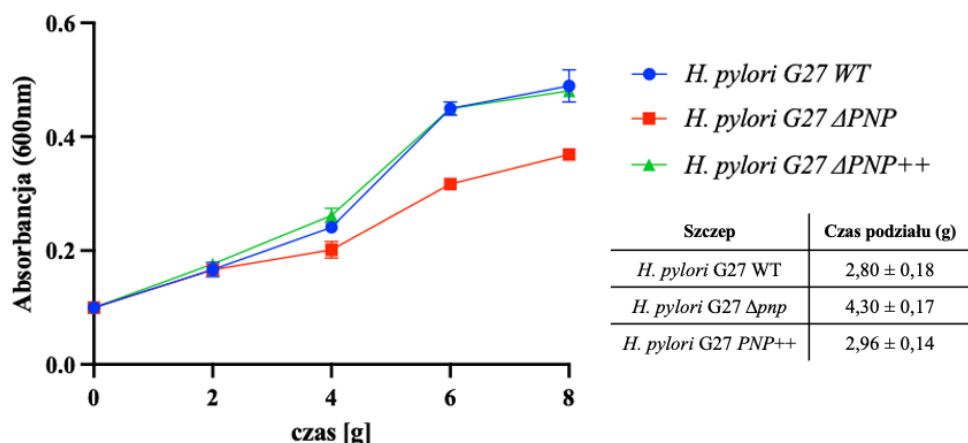


Ryc. 29. Krzywa wzrostu szczepów *H. pylori* G27 WT, Δpnp i pnp^{++} w temperaturze 37°C. Bakterie hodowano w pożywce Brucella z 10% FBS z wytrząsaniem. OD₆₀₀ mierzono co godzinę przez 8 godzin. Dane przedstawiają średnie ± SD z trzech niezależnych hodowli biologicznych. WT - szczep dziki (wild type) *Helicobacter pylori* G27; Δpnp - szczep *H. pylori* G27 z delecją genu *pnp*; Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny (Δpnp z przywróconą ekspresją genu *pnp*); OD₆₀₀ - gęstość optyczna mierzona przy 600 nm; SD - odchylenie standardowe; g - godziny.

Średni czas podziału komórkowego w 37°C szczepu *H. pylori* G27 WT wyniósł 2,83 ± 0,26 godziny, natomiast szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp był istotnie dłuższy i wynosił 4,58 ± 0,48 godziny. Tempo podziału w szczepie G27 Δpnp^{++} z komplementacyjnym genem *pnp* było podobne do czasu generacji szczepu dzikiego WT (2,84 ± 0,14 godziny). Jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA) wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy szczepami ($F(2,6) = 7,06$; $p = 0,0265$). Wykazano, że brak genu *pnp* prowadzi do wyraźnego spowolnienia tempa podziałów komórkowych, natomiast jego komplementacja przywraca wyjściowe tempo podziału. Efekt ten potwierdza rolę PNPazy w regulacji dynamiki wzrostu *H. pylori* w warunkach standardowej hodowli *in vitro*.

W temperaturze 39°C średni czas podziału szczepu dzikiego WT wyniósł 2,80 ± 0,18 godziny, podczas gdy szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp 4,30 ± 0,17 godziny. W przypadku szczepu komplementacyjnego (G27 Δpnp^{++}), czas podziału wyniósł 2,96 ± 0,14 godziny, co wskazuje na przywrócenie fenotypu zbliżonego do szczepu WT. Jednoczynnikowa analiza wariancji (one-way ANOVA) wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami ($F(2,6) = 78,95$; $p = 4,91 \times 10^{-5}$). Wyniki zaprezentowano na ryc. 30.

Krzywa wzrostu *H. pylori* w 39°C



Ryc. 30. Krzywa wzrostu szczepów *H. pylori* G27 WT, Δpnp i Δpnp^{++} w temperaturze 39°C. Bakterie hodowano bulionie Brucella z 10% FBS z wytrząsaniem. OD₆₀₀ mierzono co godzinę przez 8 godzin. Dane przedstawiają średnie ± SD z trzech niezależnych hodowli biologicznych. WT - szczep dziki; Δpnp - szczep delecyjny genu *pnp*; Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny (z przywróconą ekspresją *pnp*); OD₆₀₀ - absorbancja przy 600 nm; SD - odchylenie standardowe; g - godziny.

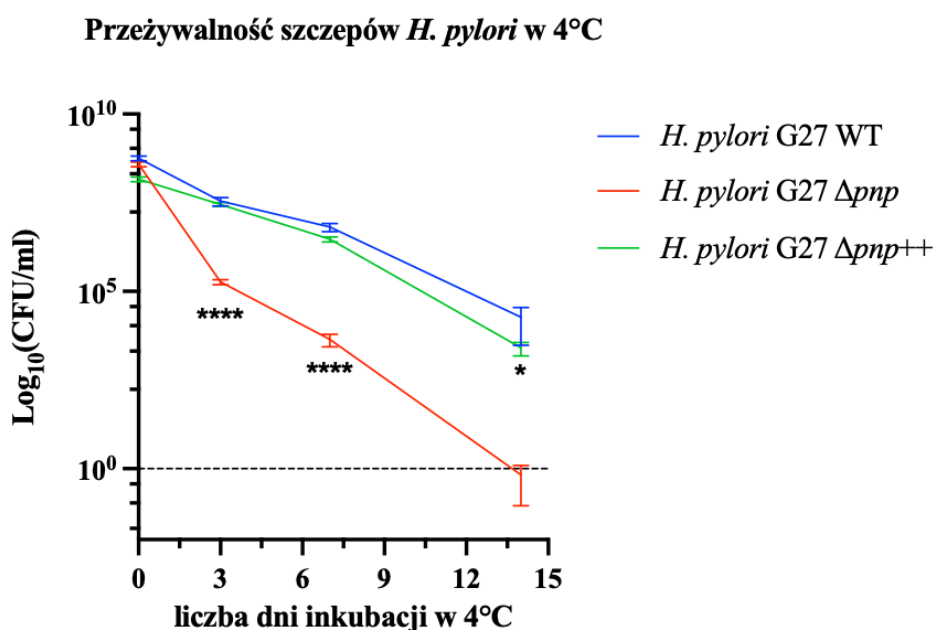
6.6.6 Przeżywalność szczepów *H. pylori* w 4°C

Po przeprowadzonej ocenie przeżywalności trzech szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} , wykazano stopniowy spadek liczby komórek zdolnych do tworzenia kolonii (CFU/ml) w trakcie inkubacji w 4°C (Ryc. 31). Największe zmiany obserwowano w ciągu pierwszych trzech dni, w których liczba żywych komórek w przypadku szczepu *H. pylori* G27 Δpnp spadła poniżej 10⁵ CFU/ml, podczas gdy liczba komórek szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT oraz szczepu komplementacyjnego *H. pylori* G27 Δpnp^{++} wynosiła 10⁷ CFU/ml.

Po 7 dniach inkubacji przeżywalność szczepu *H. pylori* G27 Δpnp spadła do granicy wykrywalności metody, natomiast po 14 dniach hodowli liczba CFU/ml była poniżej progu detekcji metody. W tym samym czasie liczba komórek szczepu *H. pylori* G27 WT utrzymywała się na poziomie 10⁴ CFU/ml, natomiast szczepu komplementacyjnego *H. pylori* G27 Δpnp^{++} na poziomie około 10³ CFU/ml. Analiza wyników wykazała, że delecja genu *pnp* skutkuje ograniczeniem podziałów *H. pylori* przetrwania w niskiej temperaturze 4°C. Zaobserwowano również, że komplementacja genu *pnp* prowadzi do istotnej poprawy przeżywalności w porównaniu do szczepu delecyjnego, jednak nie przywraca jej w pełni do poziomu obserwowanego dla szczepu dzikiego.

W celu ilościowej oceny obserwowanych różnic dane dotyczące liczby CFU/ml zostały przekształcone do logarytmu dziesiętnego (log₁₀ CFU/ml) i poddane analizie

statystycznej z uwzględnieniem trzech niezależnych powtórzeń biologicznych dla każdego szczepu i punktu czasowego. Wartości równe zeru, odpowiadające brakowi kolonii, zastąpiono wartością granicy detekcji metody. Istotność statystyczną różnic pomiędzy szczepami w poszczególnych punktach czasowych oznaczono na wykresie przy użyciu symboli gwiazdek. Dwuczynnikowa analiza wariancji (two-way ANOVA) wykazała istotny statystycznie wpływ zarówno czasu inkubacji ($p = 3,2 \times 10^{-24}$), jak i rodzaju szczepu ($p = 3,2 \times 10^{-17}$), a także istotną zależność pomiędzy tymi czynnikami ($p = 3,8 \times 10^{-11}$). Brak genu *pnp* skutkuje całkowitym zahamowaniem wzrostu *H. pylori* w 4°C.



Ryc. 31. Przeżywalność szczepów *H. pylori* G27 WT, Δ*pnp* oraz Δ*pnp*++ podczas inkubacji w 4°C. Próbkę pobierano w dniach 0, 3, 7 i 14, a następnie wysiewano dziesięciokrotne rozcieńczenia hodowli na podłożu GC agar z dodatkiem 10% FBS i oceniano liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU/ml). Wartości przedstawiono jako średnią ± SD z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Przerywana linia oznacza granicę detekcji metody (1 CFU/ml); wartości poniżej tej granicy interpretowano jako brak wykrywalnych jednostek tworzących kolonie. Dane przedstawiono w skali logarymicznej (log₁₀ CFU/ml). Istotność statystyczną różnic pomiędzy szczepami w poszczególnych punktach czasowych oceniano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA) z testem post hoc Dunnetta, porównując szczepy mutantowe do szczepu WT; gwiazdki oznaczają istotność statystyczną ($p < 0,05$; **** $p < 0,0001$). WT - szczep dziki, Δ*pnp* - szczep delecyjny genu *pnp*, *pnp*++ (Δ*pnp*++) - szczep komplementacyjny (z przywróconą ekspresją *pnp*); CFU/ml - jednostki tworzące kolonie na mililitr; SD - odchylenie standardowe; FBS - surowica płodów bydłych.

6.6.7 Wrażliwość badanych szczepów *H. pylori* na wybrane czynniki genotoksyczne i antybiotyki

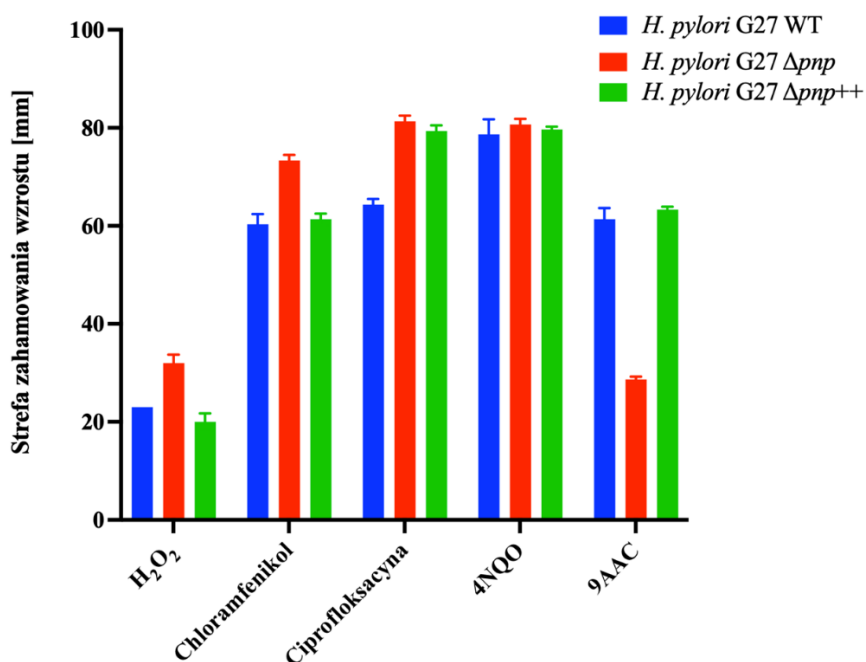
W celu oceny wpływu funkcjonalnego genu *pnp* na wrażliwość *H. pylori* wobec czynników stresogennych i mutagennych, przeprowadzono test oceny wrażliwości szczepów metodą dyfuzyjno-krażkową z użyciem następujących związków chemicznych: nadtlenu wodoru (H_2O_2), chloramfenikolu, ciprofloksacyny, N-tlenku 4-nitrochinoliny (4NQO) oraz 9-aminoakrydyny (9AAC). Pomiary stref zahamowania wzrostu przeprowadzono dla trzech szczepów *H. pylori*: *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych (metodyka opisana w podrozdziale 5.6.7).

Dla nadtlenu wodoru (H_2O_2 , 88,2 μmol /krażek), strefa zahamowania wzrostu wynosiła średnio 23 mm dla szczepu *H. pylori* G27 WT, 32 mm dla szczepu *H. pylori* G27 Δpnp , oraz 20 mm dla szczepu *H. pylori* G27 Δpnp^{++} (tabela 8). W przypadku chloramfenikolu (100 μg /krażek), średnie strefy zahamowania wzrostu wynosiły, odpowiednio 60 mm dla *H. pylori* G27 WT, 73 mm dla *H. pylori* G27 Δpnp oraz 61 mm dla *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . Dla ciprofloksacyny (100 μg /krażek), średnie strefy zahamowania, wnosły 64 mm dla *H. pylori* G27 WT, 81 mm dla *H. pylori* G27 Δpnp , oraz 80 mm dla *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . Dla związku genotoksycznego 4NQO (500 μg /krażek), zaobserwowano niewielkie różnice pomiędzy strefami zahamowania wzrostu pomiędzy szczepami. Dla szczepu *H. pylori* G27 WT było to 79 mm, dla *H. pylori* G27 Δpnp strefa wynosiła 81 mm natomiast dla szczepu *H. pylori* G27 Δpnp^{++} strefa wynosiła 80 mm. W przypadku 9-aminoakrydyny (9AAC, 500 μg /krażek), strefy zahamowania wzrostu wynosiły 61 mm dla *H. pylori* G27 WT, 29 mm dla *H. pylori* G27 Δpnp , oraz 63 mm dla *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . Wszystkie opisane dane zostały przedstawione w tabeli nr. 8 i na rycinie 32.

Tabela 8. Średnie strefy zahamowania wzrostu szczepów *H. pylori* G27 w zmodyfikowanym teście dyfuzyjno-krażkowym

Związek (stężenie na krążek)	Strefa zahamowania wzrostu (mm) <i>H. pylori</i>		
	G27 WT	G27 Δpnp	Δpnp^{++}
Nadtlenek wodoru (H ₂ O ₂ , 88,2 μ mol)	23	32	20
Chloramfenikol (100 μ g)	60	73	61
Ciprofloksacyna (100 μ g)	64	81	80
4-nitrochinolina-N-tlenek (4NQO, 500 μ g)	79	81	80
9-aminoakrydyna (9AAC, 500 μ g)	61	29	63

Średnie strefy zahamowania wzrostu szczepów *H. pylori* G27 WT, Δpnp i Δpnp^{++} w odpowiedzi na wybrane czynniki genotoksyczne i antybiotyki w teście dyfuzyjno-krażkowym



Ryc. 32. Wrażliwość szczepów *Helicobacter pylori* G27 WT, Δpnp oraz Δpnp^{++} na wybrane czynniki genotoksyczne i antybiotyki. Strefy zahamowania wzrostu [mm] określono w teście dyfuzyjno-krażkowym po aplikacji: nadtlenku wodoru (H₂O₂, 88,2 μ mol/krążek), chloramfenikolu (100 μ g/krążek), ciprofloksacyny (100 μ g/krążek), N-tlenku 4-nitrochinoliny (4NQO, 500 μ g/krążek) oraz 9-aminoakrydyny (9AAC, 500 μ g/krążek). Test dyfuzyjno-krażkowy miał charakter porównawczy a każdy krążek aplikowano na osobnej szalce Petriego. Dane przedstawiają średnie z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych $\pm$ SD. WT - szczep dziki, Δpnp - szczep delecyjny genu *pnp*, Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny (z przywróconą ekspresją *pnp*); H₂O₂ - nadtlenek wodoru; 4NQO - N-tlenek 4-nitrochinoliny, 9AAC - 9-aminoakrydyna, SD - odchylenie standardowe, μ mol/krążek i μ g/krążek - ilość związku naniesiona na krążek.

6.6.8 Przeżywalność szczepów *H. pylori* po ekspozycji na promieniowanie UV C-254 nm

W celu oceny wrażliwości trzech szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} na działanie promieniowania UV-C (254 nm), analizowano zmiany w liczbie jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) po 72 godzinach od ekspozycji na promieniowanie w dawkach 5, 10 oraz 20 J/m², a następnie po inkubacji przez 72 h. Uzyskane wyniki porównywano z hodowlą kontrolną bez ekspozycji na promieniowanie (0 J/m²) (Ryc. 33).

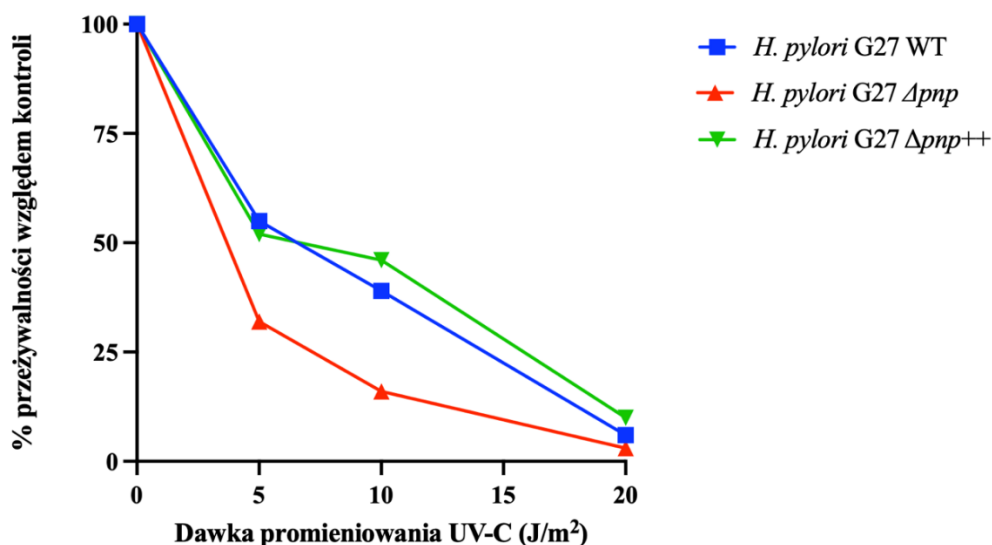
Dla szczepu *H. pylori* G27 WT średnia liczba bakterii w hodowli kontrolnej wynosiła $2,85 \times 10^8$ CFU/ml. Ekspozycja na dawkę 5 J/m² powodowała spadek liczby CFU/ml do $1,54 \times 10^8$, co odpowiadało redukcji przeżywalności o około 46% względem kontroli. Przy dawce 10 J/m² liczba komórek obniżała się do $7,77 \times 10^7$ CFU/ml (redukcja o 73%), natomiast przy dawce 20 J/m² obserwowano spadek liczby kolonii do $1,52 \times 10^7$ CFU/ml, co odpowiadało redukcji o 94,7% względem wartości początkowej.

W przypadku szczepu *H. pylori* G27 Δpnp liczba CFU/ml w kontroli wynosiła $7,45 \times 10^7$. Po ekspozycji na promieniowanie w dawce 5 J/m² liczba żywych bakterii spadała do $2,36 \times 10^7$ CFU/ml, co stanowiło redukcję przeżywalności o 68% względem kontroli. Dawka 10 J/m² powodowała dalsze obniżenie liczby CFU/ml do $1,38 \times 10^7$ (spadek o 81%), natomiast przy dawce 20 J/m² liczba bakterii wynosiła $2,96 \times 10^6$ CFU/ml, co odpowiadało redukcji przeżywalności o 96%.

Dla szczepu komplementacyjnego *H. pylori* G27 Δpnp^{++} początkowa liczba bakterii przed ekspozycją na promieniowanie UV-C wynosiła $3,16 \times 10^8$ CFU/ml. Ekspozycja na dawkę promieniowania 5 J/m² powodowała spadek przeżywalności do $1,44 \times 10^8$ CFU/ml (redukcja o 54%). Przy dawce 10 J/m² liczba CFU/ml wynosiła $6,46 \times 10^7$ (spadek o 79%), natomiast przy najwyższej dawce 20 J/m² obserwowano obniżenie liczby bakterii do $3,79 \times 10^7$ CFU/ml, co odpowiadało redukcji przeżywalności o 88%.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (two-way ANOVA) wykazała, że przeżywalność pałeczek *H. pylori* zależy od dawki promieniowania UV-C, jak i rodzaju szczepu, a także istotną interakcję pomiędzy tymi czynnikami ($p = 0,0016$). Szczep delecyjny *H. pylori* G27 Δpnp wykazywał istotnie zwiększoną wrażliwość na działanie promieniowania UV-C w porównaniu do szczepu dzikiego, natomiast komplementacja genu *pnp* przywracała przeżywalność bakterii do poziomu zbliżonego do przeżywalności szczepu *H. pylori* G27 WT.

Procentowy spadek żywotności szczepów *H. pylori* po ekspozycji na promieniowanie UV-C (254nm)



Ryc. 33. Przeżywalność szczepów *H. pylori* po ekspozycji na promieniowanie UV-C (254 nm). Przedstawiono procentową przeżywalność szczepów *H. pylori* G27 WT, Δpnp oraz Δpnp^{++} po ekspozycji na promieniowanie UV-C względem kontroli (0 J/m²), która stanowiła przeżywalność bakterii nieskonowanych na promieniowanie. Analizę statystyczną przeprowadzono na surowych wartościach CFU/ml po transformacji $\log_{10}$ z użyciem dwuczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. Wykazano istotny wpływ dawki promieniowania UV-C, szczepu oraz interakcji pomiędzy tymi czynnikami na przeżywalność bakterii ($p < 0,05$). WT - szczep dziki; Δpnp - szczep delecyjny genu *pnp*; Δpnp^{++} - szczep komplementacyjny genu *pnp*; UV-C - promieniowanie ultrafioletowe typu C; CFU/ml - jednostki tworzące kolonie na mililitr; J/m² - dżule na metr kwadratowy (dawka); $\log_{10}$ - logarytm dziesiętny; ANOVA - analiza wariancji.

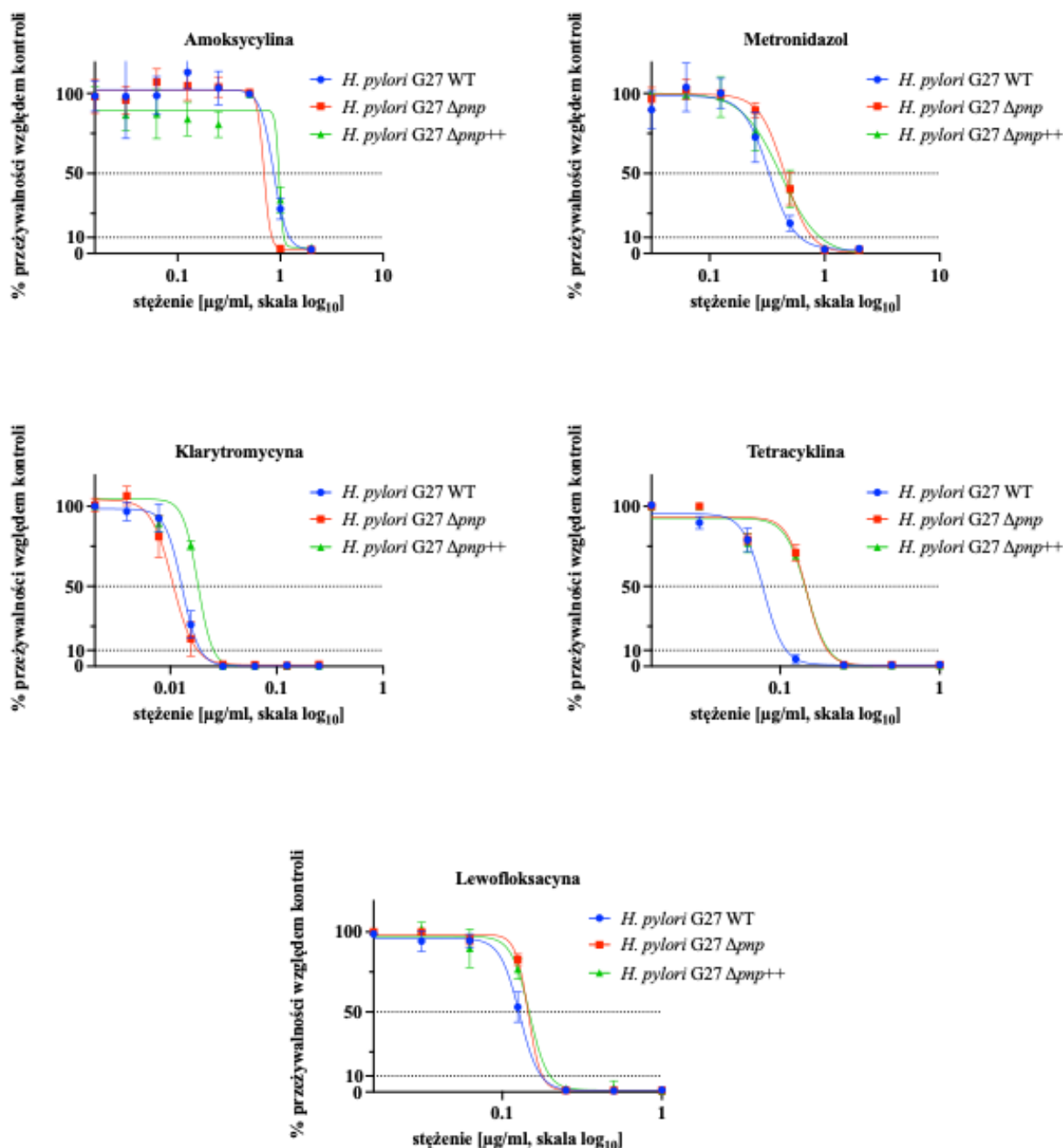
6.6.9 Oznaczenie wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ dla wybranych antybiotyków

W celu określenia wrażliwości szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} na wybrane antybiotyki (amoksycylina, metronidazol, klarytromycyna, tetracyklina, lewofloksacyna) przeprowadzono test celem wyznaczenia najmniejszego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów MIC (ang. minimal inhibitor concentration) (metodyka opisana w podrozdziale 5.6.2). Otrzymane dane przedstawiono jako krzywe przeżywalności (ryc. 34), gdzie oś X reprezentuje stężenie antybiotyku (w skali $\log_{10}$), a oś Y reprezentuje procent przeżywalności względem kontroli, bez antybiotyku. Na podstawie uzyskanych wykresów wyznaczono wartości MIC₅₀ (stężenie redukujące przeżywalność o 50%) oraz MIC₉₀ (stężenie redukujące przeżywalność o 90%) dla każdego szczepu i każdego z podanych związków (Tabela 9).

W teście z użyciem amoksycyliny, dla szczepu *H. pylori* G27 WT wykazano, że MIC₅₀ wynosi 0,85 µg/ml a MIC₉₀ 1,23 µg/ml. Dla szczepu G27 *H. pylori* G27 Δpnp wartości MIC wyniosły odpowiednio 0,69 µg/ml (MIC₅₀) i 0,83 µg/ml (MIC₉₀), natomiast dla szczepu G27 *H. pylori* G27 Δpnp^{++} 0,97 µg/ml oraz 1,08 µg/ml. W teście z użyciem metronidazolu wartości MIC₅₀/MIC₉₀ dla szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp i *H. pylori* G27 Δpnp^{++} wyniosły odpowiednio: 0,33/0,19 µg/ml, 0,45/0,26 µg/ml oraz 0,41/0,18 µg/ml. Dla klarytromycyny MIC₅₀ był równy 0,01 µg/ml, MIC₉₀ = 0,01 µg/ml dla szczepu *H. pylori* G27 WT i *H. pylori* G27 Δpnp , natomiast dla *H. pylori* G27 Δpnp^{++} MIC₅₀ wyniósł 0,02 µg/ml a MIC₉₀ 0,01 µg/ml. Dla tetracykliny wyznaczniki MIC₅₀/MIC₉₀ wynoszące odpowiednio: 0,08/0,06 µg/ml dla szczepu *H. pylori* G27 WT, 0,15/0,11 µg/ml dla *H. pylori* G27 Δpnp oraz 0,15/0,10 µg/ml dla *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . MIC₅₀ lewofloksacyliny dla szczepu *H. pylori* G27 WT wynosił 0,13 µg/ml, dla szczepu *H. pylori* G27 Δpnp 0,15 µg/ml i 0,15 µg/ml dla *H. pylori* G27 Δpnp^{++} , natomiast MIC₉₀: 0,09 µg/ml, 0,12 µg/ml i 0,11 µg/ml odpowiednio dla wszystkich wymienionych szczepów. Krzywe przeżywalności badanych wariantów szczepów *H. pylori*, w środowisku wybranych antybiotyków przedstawiono na ryc. 34.

Tabela 9 Wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ (µg/ml) wybranych antybiotyków wobec szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp i *H. pylori* G27 Δpnp^{++}

Antybiotyk	Wartość MIC	Szczep <i>H. pylori</i>		
		G27 WT	G27 Δpnp	G27 Δpnp^{++}
Amoksycylina	MIC ₅₀	0,85	0,69	0,97
	MIC ₉₀	1,23	0,83	1,08
Metronidazol	MIC ₅₀	0,33	0,45	0,41
	MIC ₉₀	0,19	0,26	0,18
Klarytromycyna	MIC ₅₀	0,01	0,01	0,02
	MIC ₉₀	0,01	0,01	0,01
Tetracyklina	MIC ₅₀	0,08	0,15	0,15
	MIC ₉₀	0,06	0,11	0,10
Lewofloksacyna	MIC ₅₀	0,13	0,15	0,15
	MIC ₉₀	0,09	0,12	0,11



Ryc. 34. Krzywe przeżywalności szczepów *H. pylori* G27 WT, G27 *H. pylori* Δpnp oraz *H. pylori* G27 $\Delta pnp++$ w obecności różnych stężeń wybranych antybiotyków: amoksylicyny, metronidazolu, klarytromycyny, tetracykliny i lewofloksacyny. Komórki hodowano przez 48 godzin w obecności rosnących stężeń antybiotyku, a przeżywalność oceniano na podstawie liczby CFU w odniesieniu do kontroli bez antybiotyku (100%). Na osi X przedstawiono stężenie związku w $\mu\text{g/ml}$ (skala log₁₀), a na osi Y - % przeżywalności względem kontroli. Przerwane linie poziome odpowiadają wartościom MIC₅₀ i MIC₉₀. Krzywe wygenerowano na podstawie trzech niezależnych eksperymentów biologicznych (średnia $\pm$ SD). WT - szczep dziki; Δpnp - szczep delecyjny genu *pnp*; $\Delta pnp++$ - szczep komplementacyjny (z przywróconą ekspresją *pnp*); CFU - jednostki tworzące kolonie; $\mu\text{g/ml}$ - mikrogramy na mililitr; log₁₀ - logarytm dziesiętny; MIC₅₀ i MIC₉₀ - minimalne stężenie hamujące wzrost odpowiednio 50% i 90% populacji; SD - odchylenie standardowe

6.7 Analiza transkryptomiczna uzyskanych szczepów delecyjnych *H. pylori*

6.7.1 Analiza transkryptomiczna szczepu *H. pylori* G27 Δpnp

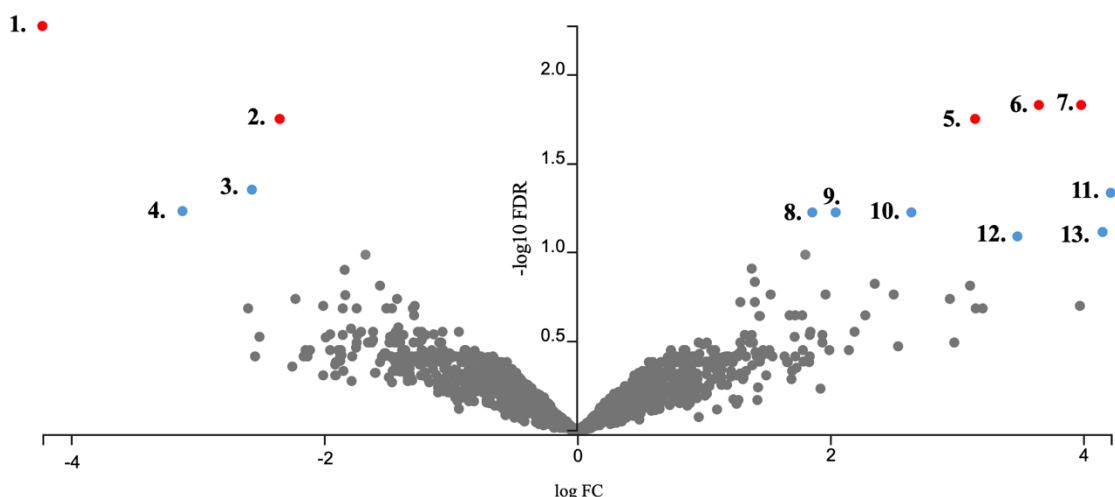
W celu identyfikacji genów podlegających regulacji transkrypcyjnej przy udziale produktu genu *pnp* przeprowadzono ocenę ekspresji genów, porównując profil transkryptomiczny, szczepu *H. pylori* G27 Δpnp i szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT. Dane przedstawiono w postaci wykresu typu wulkanowego (z ang. volcano plot), którym zmiana poziomu ekspresji ($\log_2$ fold change) została zestawiona z wartością oczekiwanego ujemnego logarytmu o podstawie 10 odsetka fałszywych odkryć ($-\log_{10}$ FDR, z ang. *False Discovery Rate*) (Ryc. 35).

Zastosowane kryteria istotności biologicznej i statystycznej (bezwzględna wartość $\log_2FC \geq 1,583$ oraz $FDR \leq 0,05$) pozwoliły na wyodrębnienie w szczepie delecyjnym (Δpnp) łącznie 13 genów, których poziom ekspresji uległ istotnej zmianie w porównaniu do szczepu dzikiego (WT). Wśród analizowanych genów 9 wykazywało zwiększoną ekspresję, natomiast 4 geny charakteryzowały się istotnym obniżeniem poziomu transkryptów w warunkach braku funkcjonalnego białka PNP. Wykazano istotny wzrost poziomu transkryptów genu *purD*, kodującego syntazę adenilobursztynianową - enzym uczestniczący w szlaku reutilizacji puryn (ang. purine salvage pathway), umożliwiający syntezę nukleotydów purynowych z prekursorów dostępnych w środowisku komórkowym. Podwyższoną ekspresję genów odnotowano również w przypadku kilku otwartych ramek odczytu ORF (ang. *Open Reading Frames*) o nieznannej funkcji, zlokalizowanych w tzw. regionach plastyczności genomu szczepu *H. pylori* G27. Do tej grupy należą m.in. HPG27_RS04385, HPG27_RS01665, HPG27_RS08585, HPG27_RS07535 oraz HPG27_RS00045. Regiony te stanowią zmienne fragmenty genomu, często unikalne dla danego szczepu, które potencjalnie mogą kodować białka zaangażowane w regulację metaboliczną, interakcje z gospodarzem lub procesy adaptacyjne związane z przeżywaniem *H. pylori*. Z uwagi na ograniczoną charakterystykę funkcjonalną tych sekwencji, ich znaczenie biologiczne w kontekście delecji genu *pnp* pozostaje nieokreślone.

Ponadto, w szczepie *H. pylori* G27 Δpnp wykazano istotne obniżenie poziomu transkryptów genu *acpS*, kodującego syntazę białka przenoszącego reszty acylowe. Enzym ten katalizuje przeniesienie grupy 4'-fosfopanteteiny z koenzymu A na apoproteinę ACP, co prowadzi do powstania aktywnej formy holo-ACP, niezbędnej do wydłużania łańcuchów kwasów tłuszczowych w procesie biosyntezy lipidów.

Obniżoną ekspresję odnotowano również dla trzech genów hipotetycznych: HPG27_RS06080, HPG27_RS06930 oraz HPG27_RS05285. Geny te kodują białka o nieokreślonej funkcji i zlokalizowane są w obszarach genomu, które pozostają słabo scharakteryzowane.

Szczegółowe dane dotyczące wszystkich genów spełniających przyjęte kryteria różnicowej ekspresji przedstawiono w tabeli 10.



Ryc. 35. Profil transkryptomyczny szczepu *H. pylori* G27 Δpnp w porównaniu do szczepu dzikiego G27 WT przedstawiony w formie wykresu typu wulkanowego. Na osi X przedstawiono $\log_2$ zmiany poziomu ekspresji genów ($\log_2 FC$), natomiast na osi Y ujemny logarytm dziesiętny współczynnika fałszywych odkryć ($-\log_{10} FDR$). Każdy punkt odpowiada pojedynczemu genowi. Geny spełniające kryteria istotności statystycznej i biologicznej ($|\log_2 FC| \geq 1,583$ oraz $FDR \leq 0,05$) zaznaczono kolorem czerwonym. Geny spełniające kryterium istotności statystycznej ($FDR \leq 0,05$), lecz charakteryzujące się mniejszą zmianą poziomu ekspresji, zaznaczono kolorem niebieskim. Pozostałe geny oznaczono kolorem szarym. Numery (1-13) odpowiadają genom wymienionym w rozdziale 5.6.1, oraz tabeli . 1. *hpg27_rs06080* (*pnp*), 2. *acpS*, 3. *hpg27_rs05285*, 4. *hpg27_rs06930*, 5. *hpg27_rs07535*, 6. *hpg27_rs05140*, 7. *purD*, 8. *hpg27_rs02030*, 9. *hpg27_rs05420*, 10. *hpg27_rs08585*, 11. *hpg27_rs04385*, 12. *hpg27_rs00045*, 13. *hpg27_rs01665*

Tabela 10. Zestawienie genów o istotnie zmienionym poziomie ekspresji w szczepie *H. pylori* G27 Δpnp w porównaniu do szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT

Gen (locus)	Oficjalna/funkcjonalna nazwa	Identyfikatory (UniProt / NCBI)	Funkcja biologiczna (molekularna/proces)
<i>hpg27_rs00045</i>	tRNA-Val	RNA transferowy	Transport waliny do rybosomu podczas syntezy białek
<i>hpg27_rs01665</i>	tRNA-Arg	RNA transferowy	Transport argininy w procesie translacji
<i>hpg27_rs02030</i>	Metalofosfodiesteraza (białko błonowe)	UniProt: B5Z6F0	Enzym typu metalofosfodiesterazy - hydrolizuje wiązania fosfoestrowe w obecności jonu metalu (funkcja dokładna nieokreślona)

<i>hpg27_rs0</i> 4385	tRNA-Met	RNA transferowy	Transport metioniny do miejsca inicjacji translacji
<i>hpg27_rs0</i> 5140	tRNA-Arg	RNA transferowy	Transfer RNA dostarczający argininę do rybosomu podczas translacji białek
<i>hpg27_rs0</i> 5420	tRNA-Ala	RNA transferowy	Transport alaniny podczas syntezy łańcucha polipeptydowego na rybosomie
<i>hpg27_rs0</i> 7535	Białko z domeną DUF7149	- (hipotetyczne; WP_000617674.1)	Białko zawierające domenę DUF7149 o nieznannej funkcji; obecność motywów sugeruje wiązanie DNA i aktywność enzymatyczną związaną z modyfikacją DNA.
<i>hpg27_rs0</i> 8585	Białko hipotetyczne	- (niezident. w bazach)	Białko o nieznannej funkcji
<i>purD</i> (<i>hpg27_rs06100</i>)	Syntetaza GAR (PurD) - fosforibozylamina-glycyna ligaza	UniProt: B5Z6D7 / GeneID: 5859674	Enzym szlaku <i>de novo</i> syntezy puryn
<i>hpg27_rs0</i> 5285	Białko hipotetyczne (HPG27_1012)	- (brak)	Hipotetyczne białko bez przypisanej funkcji
<i>pnp</i> <i>hpg27_rs06080</i>	Foforylaza poliribonukleotydowa (PNPaza)	UniProt: B5Z8L0 / GeneID: 5859850	Egzorybonukleaza RNA degradacja mRNA, uczestniczy w rozkładzie i/lub stabilizacji RNA
<i>hpg27_rs0</i> 6930	Metylotransferaza DNA (specyficzna)	(WP_000921142.1)	Specyficzna metylotransferaza DNA (podjednostka modyfikacyjna systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego); metyluje sekwencje DNA chroniąc własny genom przed endonukleazą restrykcyjną.
<i>acps</i> (<i>hpg27_rs03945</i>)	Holo-ACP syntaza (AcpS)	UniProt: B5Z7Z7 / GeneID: 5859590	Enzym niezbędny do aktywacji białka przenośnika acylowego (ACP); przenosi 4'-fosfopanteteinę z CoA na apo-ACP, tworząc holo-ACP (reakcja kluczowa dla syntezy kwasów tłuszczowych, EC 2.7.8.7).

Źródła: adnotacje funkcjonalne genów oparto na genomie referencyjnym *Helicobacter pylori* G27 (NCBI RefSeq: NC_011333.1; GenBank CP001173.1). W przypadku braku jednoznacznych adnotacji korzystano również z homologicznych sekwencji opublikowanych dla szczepu 26695 (RefSeq: NC_000915.1). Analiza obejmowała wyszukiwanie informacji w bazach danych: UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>), NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) oraz KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), stosując jako zapytania nazwę gatunku (*Helicobacter pylori*), nazwę genu lub oznaczenie locus (np. HPG27_RS....). Analizy wzbogacenia funkcjonalnego wykonano z użyciem oprogramowania ShinyGO.

6.7.2 Analiza transkryptomyczna szczepu *H. pylori* G27 $\Delta rhpA$

W celu identyfikacji genów, których ekspresja ulega zmianie w warunkach braku produktu genu *rhpA*, przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów. Porównywano profil transkryptomiczny szczepu *H. pylori* G27 $\Delta rhpA$ z wzorcowym szczepem dzikim *H. pylori* G27 WT. Wyniki przedstawiono w postaci wykresu wulkanowego, zestawiającego wartości $\log_2$ zmiany poziomu ekspresji ($\log_2FC$) z istotnością statystyczną wyrażoną jako $-\log_{10}$ FDR. Analizę RNA-seq przeprowadzono w oparciu o adnotację genomową szczepu *H. pylori* G27, określając poziom ekspresji genów (ORF) na podstawie liczby przypisanych odczytów RNA. Zastosowanie kryteriów $|\log_2FC| \geq 1,583$ oraz $FDR \leq 0,05$ pozwoliło na wyodrębnienie łącznie 362 genów o istotnie zmienionej ekspresji. Spośród tych genów, 159 wykazywało podwyższony a 203 obniżony poziom transkryptów w porównaniu do *H. pylori* G27 WT.

Wśród genów o podwyższonym poziomie transkryptów znalazły się m.in. geny związane z naprawą DNA i odpowiedzią na stres, takie jak *recA* oraz *ung*. Zwiększoną ekspresję odnotowano również w obrębie genów uczestniczących w wybranych procesach metabolicznych, obejmujących m. in. biosyntezę menachinonu oraz glukoneogenezę. Do genów o podwyższonej ekspresji należały także jednostki kodujące enzymy zaangażowane w modyfikacje LPS oraz białka zawierające centra żelazowo-siarkowe (Fe-S), które pełnią funkcje oksydoredukcyjne i uczestniczą m.in. w biosyntezie izoprenoidów.

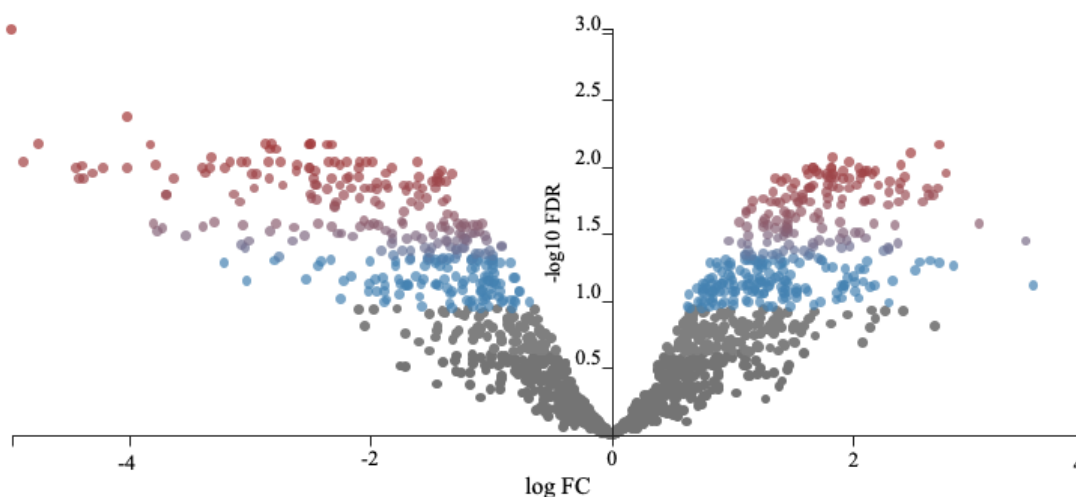
W przypadku szczepu *H. pylori* G27 $\Delta rhpA$ szczególnie liczną grupę stanowiły geny o obniżonym poziomie transkryptów, obejmujące ponad dwieście ORF. Najsilniej reprezentowaną kategorią funkcjonalną w tej grupie były geny związane z translacją, w tym geny kodujące białka rybosomalne (*rpsI*, *rpsM*, *rpsO*, *rplM*) oraz czynniki translacyjne (*tuf*, *infA*). Obniżeniu ekspresji uległy również geny odpowiedzialne za ruchliwość i chemotaksję, obejmujące elementy aparatu wici (*fli*, *flg*, *mot*, *che*), a także liczne transportery typu ABC. Zmniejszony poziom transkryptów odnotowano również dla wspomnianych wcześniej genów uczestniczących w biosyntezie izoprenoidów. Charakterystyczną cechą szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 $\Delta rhpA$ było również obniżenie ekspresji genów związanych z metabolizmem azotu oraz całego zestawu genów ureazowych (*ureA*, *ureB*, *ureI*).

Ze względu na dużą liczbę genów o zmienionej ekspresji w szczepie *H. pylori* G27 Δ *rhpA* (ponad 360 jednostek), w celu zwiększenia przejrzystości przedstawiono wybrane grupy funkcjonalne wraz z reprezentatywnymi genami ilustrującymi najistotniejsze zaburzenia procesów biologicznych w tabeli 11.

Tabela 11. Podsumowanie głównych grup genów różnicowanych w szczepie *H. pylori* G27 Δ *rhpA*

Grupa funkcjonalna/ proces	Przykładowe geny	Charakter zmian ekspresji	Opis/ powiązanie ze szlakiem
Translacja	<i>rpsI, rpsM, rpsO, rplM, tuf, infA</i>	Obniżona	Składniki rybosomu oraz czynniki elongacyjne i inicjacyjne; spadek ekspresji wskazuje na ograniczenie biosyntezy białek
Ruchliwość i chemotaksja (flagella)	<i>fli, flg, mot, che</i>	Obniżona	Elementy aparatu rzęskowego i warunkujące chemotaksję; zmiany sugerują osłabienie zdolności ruchowych
Transport przez błony	Wybrane geny kodujące transportery ABC	Obniżona	Transport metabolitów i jonów sprzężony z hydrolizą ATP; spadek ekspresji może ograniczać pobieranie i eksport komponentów
Szlak MEP/ biosynteza izoprenoidów	<i>ispG</i> i inne enzymy MEP	Obniżona	Biosynteza prekursorów izoprenoidów, ważnych dla składników błonowych
Metabolizm azotu i ureaza	<i>ureA, ureB, ureI</i>	Obniżona	Geny ureazowe i związane z wykorzystaniem azotu; obniżenie ekspresji może zaburzać neutralizację kwasu żołądkowego
Naprawa DNA i stres genotoksyczny	<i>recA, ung</i>	Podwyższona	Geny odpowiedzialne za rekombinację i wycinanie uracylu z DNA; wyższy poziom transkryptów związany z odpowiedzią na uszkodzenia
Metabolizm wtórny i adaptacyjny	Geny biosyntezy menachinonu, glukoneogenezy	Podwyższona	Szlaki adaptacyjne i alternatywne źródła energii; podwyższona ekspresja może odzwierciedlać przebudowę metabolizmu
Modyfikacje LPS	Geny kodujące enzymy modyfikujące LPS	Podwyższona	Białka uczestniczące w przebudowie struktury LPS; potencjalny wpływ na właściwości błony bakteryjnej i interakcje z gospodarzem

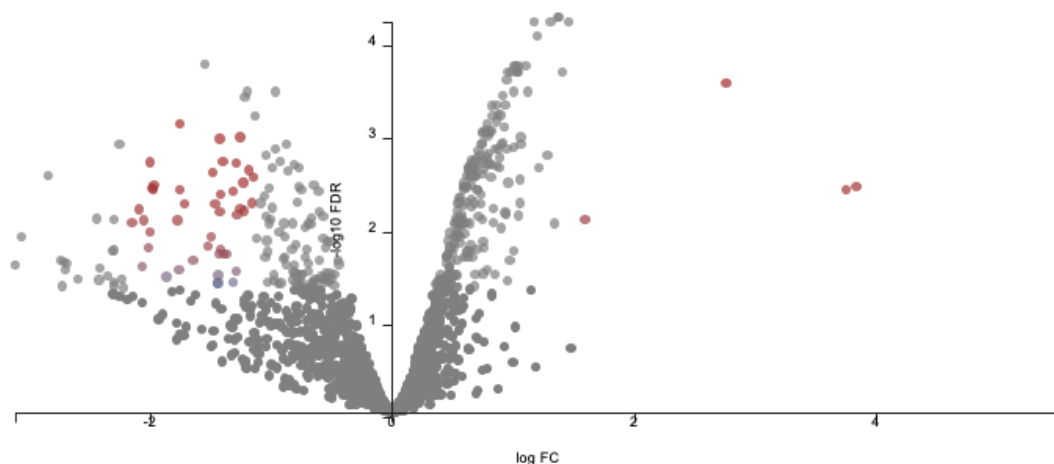
Tabela przedstawia wybrane grupy funkcjonalne genów, których ekspresja uległa istotnym zmianom w szczepie delecyjnym w porównaniu do szczepu dzikiego typu. Uwzględniono przykładowe geny reprezentujące najważniejsze procesy biologiczne. Adnotacje genów i produktów białkowych oparto na referencyjnym genomie *H. pylori* G27 (NCBI RefSeq, GCF_000021165.1).



Ryc. 36. Profil transkryptomiczny szczepu *H. pylori* G27 $\Delta rhpA$ w porównaniu do szczepu dzikiego *H. pylori* G27 WT przedstawiony w formie wykresu typu wulkanowego. Na osi X przedstawiono logarytm przy podstawie 2 zmiany poziomu ekspresji genów ($\log_2FC$), natomiast na osi Y istotność statystyczną wyrażoną jako ujemny logarytm dziesiętny współczynnika FDR ($-\log_{10} FDR$). Każdy punkt odpowiada pojedynczemu genowi. Kolorem czerwonym zaznaczono geny spełniające kryteria istotności biologicznej i statystycznej ($|\log_2FC| \geq 1,583$ oraz $FDR \leq 0,05$). Kolorem niebieskim oznaczono geny spełniające jedynie kryterium istotności statystycznej ($FDR \leq 0,05$) przy niższej wartości $|\log_2FC|$ ($<1,0$). Kolorem szarym przedstawiono geny niespełniające przyjętych kryteriów istotności. Analizy wzbogacenia funkcjonalnego wykonano z użyciem oprogramowania ShinyGO. Zastosowano model językowy (ChatGPT-5.0, OpenAI) w celu pomocniczego porządkowania opisów funkcji genów.

6.7.3 Analiza transkryptomiczna szczepu *H. pylori* G27 $\Delta papS$

W celu identyfikacji genów podlegających regulacji transkrypcyjnej przy bezpośrednim lub pośrednim udziale produktu genu *paps* przeprowadzono analizę ekspresji genów porównując profil transkryptomiczny szczepu *H. pylori* 26695 $\Delta papS$ do szczepu dzikiego *H. pylori* 26695 (WT). Dane przedstawiono w postaci wykresu wulkanowego (Ryc. 37). Przyjęte kryteria istotności biologicznej i statystycznej ($|\log_2FC| \geq 1,583$ oraz $FDR \leq 0,05$) pozwoliły na wyodrębnienie w szczepie delecyjnym łącznie 45 genów o ekspresji zmienionej względem szczepu referencyjnego *H. pylori* 26695, spośród których 5 charakteryzowało się podwyższoną ekspresją, a 40 obniżoną w porównaniu do szczepu WT. W Tabeli 12 przedstawiono zestawienie głównych grup genów różnicowanych w szczepie *H. pylori* 26695 $\Delta papS$. Uwzględniono jedynie najważniejsze kategorie i przykładowe geny w każdej z nich.



Ryc. 37. Profil transkryptomiczny szczepu *H. pylori* $\Delta papS$ względem *H. pylori* 26695 WT przedstawiony w formie wykresu typu wulkanowego przedstawiający zmiany poziomu ekspresji genów w szczepie *H. pylori* 26695 $\Delta papS$ w porównaniu do szczepu dzikiego typu (WT). Na osi X przedstawiono logarytm przy podstawie 2 ze zmiany poziomu ekspresji ($\log_2 FC$), natomiast na osi Y wartość istotności statystycznej wyrażoną jako ujemny logarytm dziesiętny współczynnika FDR ($-\log_{10} FDR$). Punkty odpowiadają pojedynczym genom. Kolorem czerwonym zaznaczono geny spełniające przyjęte kryteria istotności biologicznej i statystycznej ($|\log_2 FC| \geq 1,583$ oraz $FDR \leq 0,05$). Kolorem niebieskim wyróżniono geny spełniające kryterium istotności statystycznej ($FDR \leq 0,05$), lecz charakteryzujące się wartościami $\log_2 FC < 1,583$. Z kolei kolorem szarym oznaczono geny niespełniające kryteriów istotności ($FDR > 0,05$). Analizy wzbogacenia funkcjonalnego wykonano z użyciem oprogramowania ShinyGO.

Tabela 12. Zestawienie głównych grup genów różnicowanych w szczepie *H. pylori* 26695 $\Delta papS$

Grupa funkcjonalna/ proces	Przykładowe geny	Charakter zmian ekspresji	Opis/ powiązanie ze szlakiem
Metabolizm RNA i translacja (białka związane z dojrzewaniem RNA oraz zakończeniem translacji)	<i>rnc</i> , <i>rluA</i> , <i>rrfA</i>	Obniżenie	Zmiany obejmują enzymy uczestniczące w obróbce i modyfikacjach RNA oraz czynnik terminacji translacji, co wskazuje na przebudowę kontroli potranskrypcyjnej i potencjalne ograniczenie wydajności translacji w $\Delta papS$.
Transport przez błonę i gospodarka jonowa	transporter ABC (podjednostka błonowa)	Obniżenie	Obniżona ekspresja białek transportowych sugeruje zmiany w pobieraniu składników oraz utrzymaniu równowagi jonowej, co może towarzyszyć adaptacji fizjologicznej po delecji <i>papS</i> .
Otoczka komórkowa i przebudowa	<i>secE</i> , <i>mrda</i> , amidaza, białko	Obniżenie	Zmiany obejmują elementy transportu białek przez błonę oraz enzymy odpowiedzialne za syntezę

ściany komórkowej (z transportem białek na zewnątrz)	błony zewnętrznej		i przebudowę peptydoglikanu i innych składników otoczki.
Ruchliwość bakteryjna (elementy aparatu wici)	<i>flgK</i>	Obniżenie	Spadek ekspresji genu kodującego składnik wici sugeruje ograniczenie programu ruchliwości i potencjału kolonizacji.
Transformacja naturalna (pobieranie DNA) oraz metabolizm DNA	<i>ComEC/Rec2, ComF, xseA, dcm</i>	Obniżenie	Zmiany dotyczą białek uczestniczących w pobieraniu DNA ze środowiska oraz genów związanych z utrzymaniem i modyfikacją genomu (naprawa/obróbka i metylacja DNA), co może odzwierciedlać przebudowę odpowiedzi adaptacyjnych.
Metabolizm	<i>birA</i>	Podwyższenie	Podwyższona ekspresja <i>birA</i> sugeruje zmiany w procesach zależnych od biotyny (biotynylacja białek/enzymów), potencjalnie jako element kompensacji zmian fizjologicznych.

Zestawienie głównych grup genów różnicowanych w szczepie *H. pylori* 26695 $\Delta papS$. Tabela przedstawia wybrane grupy genów, których ekspresja uległa istotnym zmianom w szczepie delecyjnym w porównaniu do szczepu dzikiego typu. Uwzględniono przykładowe geny reprezentujące najważniejsze procesy biologiczne. Adnotacje genów i produktów białkowych oparto na referencyjnym genomie *H. pylori* 26695 (NCBI RefSeq, GCF_000008525.1).

W grupie genów o zwiększonej ekspresji wykazano podwyższony poziom ekspresji genu *birA*, którego indukcja sugeruje zmiany w procesach zależnych od biotyny np. biotynylacja białek. Zaobserwowano, że znacznie liczniejszą grupę stanowiły geny o obniżonej ekspresji. Najsilniej obniżona ekspresja występowała wśród genów związanych z procesami translacji i funkcjonowaniem aparatu translacyjnego, obejmujące m.in. *rnc*, *rluA*, *rffA*. Delecja genu *paps* prowadziła również do spadku ekspresji genów związanych z ruchliwością bakterii, transportem nukleozydów i aminokwasów, a także biosyntezą izoprenoidów w szlaku metylerytrozylofosforanowym (MEP/DOXP). Obniżony poziom transkryptów zaobserwowano również dla wielu transporterów ABC, co wskazuje na potencjalne zaburzenia procesów transportowych przez błony komórkowe oraz dla genów uczestniczących w metabolizmie mocznika i proteolizie.

6.8 Ocena stopnia zahamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP przez wybrane inhibitory

W celu identyfikacji związków chemicznych hamujących aktywność polimeryzacyjną oraz degradacyjną PNP *H. pylori* zastosowano czteroetapową strategię przesiewową opartą na testach enzymatycznych z wykorzystaniem Tioflawiny T, szczegółowo opisanych w podrozdziale 5.5.11.

Etap I - wstępne testy przesiewowe potencjalnych inhibitorów w stężeniu 100 μ M

W pierwszym etapie przetestowano pełną bibliotekę 8562 związków chemicznych MedChemExpress w stężeniu 100 μ M w kierunku hamowania aktywności polimeryzacyjnej PNP. Do etapu drugiego kwalifikowano jedynie te związki, które powodowały zahamowanie $\geq 50\%$ aktywności polimeryzacyjnej enzymu PNP. Na tym etapie wytypowano 272 związki o potencjalnym działaniu hamującym aktywność polimeryzacyjną.

Etap II -testy przesiewowe inhibitorów o stężeniu 1 μ M

W drugim etapie przeprowadzono ponowną ocenę aktywności 272 inhibitorów w obniżonym stężeniu do 1 μ M. Analiza obejmowała równocześnie: test zahamowania aktywności polimeryzacji białka PNP oraz test zahamowania aktywności degradacyjnej tego białka. Celem tego etapu było wybranie związków chemicznych które powodowały zahamowanie $\geq 50\%$ aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej w stężeniu 1 μ M. W wyniku tego etapu wyłoniono 26 związków, które hamowały $\geq 50\%$ aktywności polimeryzacyjnej oraz 38 związków hamujących $\geq 50\%$ aktywności degradacyjnej PNP. Wśród obu grup związków wyłoniono także 9 związków chemicznych, które hamowały zarówno aktywność polimeryzacyjną jak i degradacyjną PNP (6-FAM SE, 5-FAM, oranż akrydyny, YM-90709, (S)-Gossypol, CTX1, panobinostat, PK150, rodamina 110). Poniżej przedstawiono tabele zbiorcze związków o najwyższym potencjale hamowania obu aktywności enzymatycznych. Ze względu na dużą liczbę związków zidentyfikowanych w pierwszym etapie, w niniejszej pracy przedstawiono szczegółowe wyniki poczynając od etapu II, obejmujące ocenę działania inhibitorów przy stężeniu 1 μ M.

Tabela 13. Lista związków chemicznych wybranych po selekcji jakościowej do testów hamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP.

Związki chemiczne o potencjale hamującym $\geq 50\%$ aktywności polimeryzacyjnej białka PNP w testach <i>in vitro</i> (w stężeniu $1\mu\text{M}$)		Związki chemiczne o potencjale hamującym $\geq 50\%$ aktywności degradacyjnej białka PNP w testach <i>in vitro</i> (w stężeniu $1\mu\text{M}$)	
nr	Nazwa związku	nr	Nazwa związku
1	6-FAM SE	1	ISA-2011B
2	5-FAM	2	6-FAM SE
3	Ulixertinib	3	5-FAM
4	Fukoksantyna	4	NBQX
5	Oranż akrydyny	5	WS3
6	YM-90709	6	CX-6258
7	Niklozamid	7	Galusan epigallokatechiny
8	(S)-Gossypol	8	Mykofungina
9	Hederagenina	9	Gryzeofulwina
10	Inhibitor acetylotransferazy histonowej II	10	Kwas anakardowy
11	Hiperycyna	11	Beryllon II
12	CTX1	12	Roblitinib
13	Hematoporfiryna	13	Palmatyna
14	Panobinostat	14	CX-6258
15	Kwas salwianolowy C	15	Pentagalloiloglukoza
16	PK150	16	Diocan fluoresceiny
17	BIZ 114	17	Frentizol
18	Izokwercytyna	18	Szykonina
19	DMA	19	Ksylometazolina
20	HOE 32021	20	Błękit leukometylenowy
21	Koumine	21	3,4'-Dihydroksyflawon
22	Eleclazine	22	Oranż akrydyny
23	Eprotyrom	23	Fenebrutinib
24	Fadrozol	24	YM-90709
25	Rodamina 110	25	Tiazol pomarańczowy
26	MBX-4132	26	(S)-Gossypol
		27	Deoksyzsikonina
		28	Anacetrapib
		29	CTX1
		30	Panobinostat
		31	5(6)-TAMRA SE
		32	PK150
		33	Fiolet krystaliczny
		34	N-desmetyloenzalutamid
		35	Rodamina 101
		36	3,3'-digalusan teafławiny
		37	Rodamina 110
		38	L-NIO

Etap III - selekcja jakościowa wybranych inhibitorów

W trzecim etapie odrzucano związki, których MIC₉₀ wobec szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} wynosił powyżej $100\mu\text{M/ml}$. Przyjęto, że związki, które wykazywały wartości MIC₉₀ przekraczające $100\mu\text{M/ml}$.

Związki chemiczne używane w dawkach $>100 \mu\text{M/ml}$ mogą nie mieć potencjału rozwojowego ze względu na niską selektywność. Związki w stężeniach wyższych niż $100 \mu\text{M/ml}$ mogą wskazywać na bardzo niską siłę hamowania enzymu, co jest typowe dla nieswoistych lub słabych inhibitorów. Ponadto, do testów oceny MIC wykorzystywano związki o maksymalnym stężeniu $50 \mu\text{M/ml}$. Odrzucano również związki chemiczne mogące dawać fałszywie dodatnie wyniki, w tym: interkalatory kwasów nukleinowych; intensywne barwniki fluorescencyjne; związki o znanych właściwościach destabilizujących RNA oraz związki o potencjale hamującym sygnał fluorescencyjny testu. Celem tego etapu było zawężenie listy inhibitorów wpływających na samo oddziaływanie z PNP, a nie np. z substratem reakcji. W wyniku tego etapu wytypowano 23 związki chemiczne, które wykazały spójne i powtarzalne hamowanie aktywności PNP (Tabela 14).

Tabela 14. Lista związków chemicznych wybranych po selekcji jakościowej do testów hamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP.

Numer	Nazwa związku
1	Ulixertinib
2	Fukoksantyna
3	YM-90709
4	Niklozamid
5	(S)-Gossypol
6	Inhibitor acetylotransferazy histonowej II
7	Panobinostat
8	PK150
9	BIZ 114
10	Izokwercytyna
11	DMA
12	Eleclazine
13	Eprotyrom
14	Fadrozol
15	MBX-4132
16	WS3
17	Pentagalloiloglukoza
18	Frentizol
19	Szikonina
20	3,4'-Dihydroksyflawon
21	Deoksyszikonina
22	3,3'-digalusan teaflawiny
23	L-NIO

Etap IV - ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej

W kolejnym etapie testowano aktywność przeciwdrobnoustrojową pozostałych związków wobec szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} (metodyka opisana w podrozdziale 5.6.2; wyniki opisane w podrozdziale 6.9). Za najbardziej obiecujące uznawano te związki chemiczne, które wykazywały zróżnicowaną aktywność hamującą wzrost drobnoustrojów wobec poszczególnych genotypów, co wskazywało na możliwy związek ich działania na funkcję białka PNP.

6.9 Testy przesiewowe inhibitorów białka PNP - przesiewowy test na całych komórkach bakterii

Przeprowadzone testy aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazały zróżnicowaną skuteczność badanych związków wobec szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++} . Dla wszystkich analizowanych związków chemicznych określono wartości MIC₅₀ i MIC₉₀, które zestawiono w tabeli 15.

Wśród badanych związków najlepsze działanie bakteriobójcze wykazały związki: eleclazine, frentizol, niklozamid, PK150, pentagalloiloglukoza oraz YM-90709. Dla każdego związku wartości MIC₉₀ dla szczepów *H. pylori* G27 WT i Δpnp^{++} były niższe niż dla szczepu delecyjnego *H. pylori* G27 Δpnp , co sugeruje potencjalną zależność od obecności PNPazy i wskazuje na możliwość ich klasyfikacji jako kandydatów na inhibitory tego enzymu.

Dla związków DMA oraz deoksyzikonina odnotowano odwrotny efekt, określane jako fenotyp syntetycznego osłabienia wzrostu (ang. synthetic sick)- szczep *H. pylori* G27 Δpnp był bardziej wrażliwy na powyższe związki niż szczepy WT i Δpnp^{++} . Wynik ten sugeruje, że brak PNPazy może uwrażliwiać komórki bakteryjne na te związki, jednak mechanizm działania nie wskazuje na bezpośrednie zahamowanie aktywności PNPazy. Podobny efekt częściowo obserwowano dla związku WS3, w środowisku, którego wartość MIC₉₀ dla szczepu *H. pylori* G27 WT była niższa niż dla szczepów Δpnp i Δpnp^{++} , co również wpisuje się w profil fenotypu „syntetycznego osłabienia wzrostu”. W przypadku związku eprotyrome zaobserwowano rozbieżność pomiędzy wartościami MIC₅₀ i MIC₉₀ wobec szczepu *H. pylori* G27 WT: niska wartość MIC₅₀ wskazywała na zahamowanie wzrostu części populacji bakterii przy stosunkowo niskim stężeniu, natomiast wysoka wartość MIC₉₀ sugerowała, że do uzyskania silnego efektu hamującego wzrost bakterii konieczne było znacznie większe stężenie związku. Jednocześnie brak

porównywalnej wrażliwości szczepów *H. pylori* Δpnp i *H. pylori* Δpnp^{++} wskazuje, że obserwowany efekt nie spełnia kryteriów fenotypu „PNP-zależnego” ($WT \approx \Delta pnp^{++} < \Delta pnp$) i najprawdopodobniej wynika z działania niespecyficznego lub czynników niezwiązanych bezpośrednio z hamowaniem PNPaży (np. ograniczona dostępność związku w komórce lub heterogenność odpowiedzi populacji). Z tego względu eprotyrom nie został zaklasyfikowany jako kandydat na inhibitor PNPaży na podstawie przesiewowego testu na całych komórkach bakterii.

W odniesieniu do pozostałych testowanych związków, takich jak inhibitor acetylotransferazy histonowej II, panobinostat, (S)-Gossypol, fukoksantyna, ulixertinib, BIZ 114, fadrozole, L-NIO, szikonina, izokwercytyna, MBX-4132 oraz 3,3'-digalusan teaflawiny, nie wykazano znaczących różnic w zakresie ich aktywności przeciwbakteryjnej wobec poszczególnych szczepów. Wartości MIC₉₀ były dla nich zbliżone lub przekraczały najwyższe testowane stężenie, co może wskazywać na brak specyficznej aktywności wobec PNPaży.

Tabela 15. Wartości MIC₅₀ i MIC₉₀ dla wybranych, reprezentatywnych związków wobec szczepów *H. pylori* G27 WT, *H. pylori* G27 Δpnp oraz *H. pylori* G27 Δpnp^{++}

Nazwa związku chemicznego	Wartości MIC ₅₀ i MIC ₉₀ [μM/ml] dla badanych szczepów <i>H. pylori</i>					
	G27 WT	Δpnp	Δpnp^{++}	G27 WT	Δpnp	Δpnp^{++}
	MIC ₅₀	MIC ₅₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₉₀	MIC ₉₀
Eleclazine	10,0	25,0	10,0	10,0	>100	10,0
Frentizol	25,0	25,0	25,0	25,0	>100	50,0
Niklozamid	0,3	0,5	0,3	0,25	10	0,25
PK150	1,0	2,5	1,0	1,0	2,5	1,0
Pentagalloyloglukoza	25	5,0	10,0	25	100	25
YM-90709	10,0	10,0	25,0	10,0	50,0	50,0
DMA	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	2,5
Deoksyzikonina	25,0	>100	25,0	25	>100	25
3,4'-Dihydroksyflawon	50,0	50,0	50,0	50,0	>100	>100
Inh acetylotransferazy histonowej II	10,0	25,0	25,0	10,0	>100	>100
Eprotyrom	100	>100	>100	100,0	>100	>100
Panobinostat	100,0	>100	>100	100,0	>100	>100
(S)-Gossypol	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Fukoksantyna	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ulixertinib	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
BIZ 114	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Fadrozol	>100	>100	>100	>100	>100	>100
L-NIO	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Szikonina	25,0	25,0	25,0	25,0	>100	25,0
Izokwercytyna	>100	>100	>100	>100	>100	>100
MBX-4132	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
3,3'-digalusan teaflawiny	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
WS3	50,0	100,0	100,0	50,0	100,0	100,0

Wytypowane związki rozdzielano następnie elektroforetycznie metodą UREA-PAGE, w celu obserwacji efektu inhibitora na produktach reakcji polimeryzacji i degradacji PNP. Analiza pozwoliła potwierdzić bądź wykluczyć, rzeczywiste działanie hamujące enzym *in vitro* przez wyselekcjonowane związki, niezależnie od odczytu fluorescencyjnego w testach *in vitro*.

6.10 Ocena stopnia zahamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP przez wybrane inhibitory metodą UREA-PAGE

W pierwszym etapie badań przeprowadzono wstępny test przesiewowy *in vitro* dla 23, wcześniej wybranych związków chemicznych w stężeniu 10 μ M, przeprowadzając reakcję polimeryzacji i degradacji opisaną w podrozdziale 5.5.14, a następnie rozdział elektroforetyczny żeli techniką UREA-PAGE. Dla każdego związku określono procent zahamowania aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP w odniesieniu do reakcji kontrolnej zawierającej enzym i substrat, prowadzonej w identycznych warunkach, lecz bez dodatku inhibitora (kontrola dodatnia, 100% aktywności).

6.10.1 Hamowanie aktywności polimeryzacyjnej

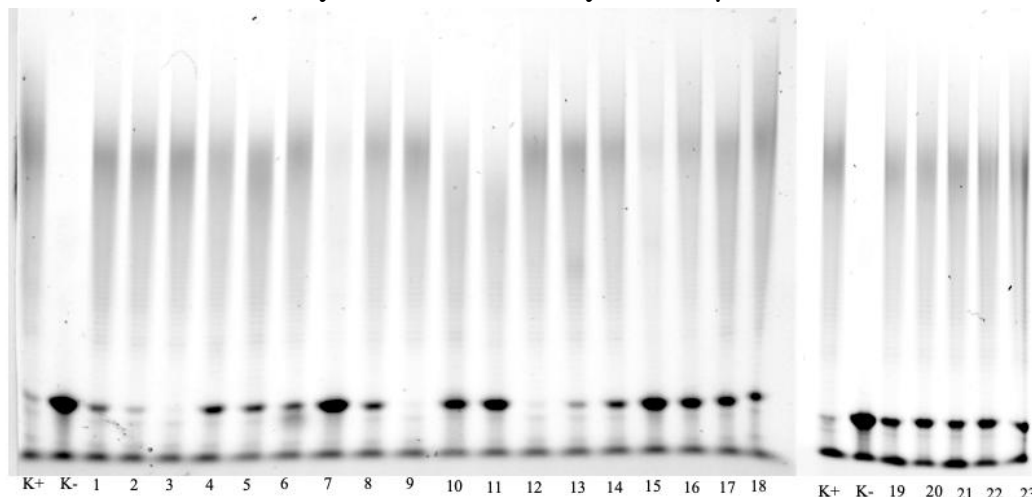
Aktywność polimeryzacyjna białka PNP *H. pylori* została oceniona na podstawie całkowitej intensywności smugi produktów powstałych w wyniku reakcji polimeryzacji. Kontrola dodatnia wykazywała wartość odniesienia równą 0% zahamowania, natomiast kontrola ujemna odpowiadała pełnemu (100%) zahamowaniu aktywności. Analiza ilościowa wykazała, że badane związki chemiczne w różnym stopniu zahamowały aktywność polimeryzacyjną PNP w stężeniu 10 μ M (Ryc. 38).

Najsilniejsze zahamowanie aktywności polimeryzacyjnej PNP obserwowano dla związków: panobinostat (77%), MBX-4132 (71%), izokwercetyna (58%), DMA (54%), szikonina (52%), WS3 (51%) oraz deoksyzikonina (50%). Dodatkowo, zauważalne - choć poniżej przyjętego progu selekcji $\geq 50\%$ - zahamowanie wykazały: 3,3'-digalusan teaflawiny (47%), 3,4'-dihydroksyflawon (45%) oraz pentagalloiloglukoza (41%).

Umiarkowany efekt hamowania (20-35%) odnotowano dla: ulixertinibu (28%), niklozamid (29%), inhibitora acetylotransferazy histonowej II (30%), PK150 (23%), (S)-gossypolu (23%), fadrozolu (26%) oraz frentizolu (29%). Związki o niskiej aktywności hamującej ($<20\%$) obejmowały: fukoksantynę (18%), YM-90709 (12%), eleclazine (11%), eprotyrom (16%) oraz BIZ 114 (10%). Do dalszych analiz wybrano związki spełniające kryterium $\geq 50\%$ zahamowania aktywności polimeryzacyjnej

względem kontroli: panobinostat, MBX-4132, izokwercetynę, DMA, szikoninę, WS3 oraz deoksyzikoninę.

Hamowanie aktywności polimeryzacyjnej białka PNP *H. pylori* przez wybrane związki chemiczne w stężeniu 10 μ M



Ryc. 38. Hamowanie aktywności polimeryzacyjnej białka PNP *H. pylori* przez wybrane związki chemiczne (10 μ M) analizowane metodą UREA-PAGE. K+ - kontrola dodatnia (reakcja z enzymem PNP), K- - kontrola ujemna (reakcja bez enzymu). Numery 1-23 odpowiadają badanym związkom: 1. ulixertinib, 2. fukoksantyna, 3. YM-90709, 4. niklozamid, 5. (S)-gossypol, 6. inhibitor acetylotransferazy histonowej II, 7. panobinostat, 8. PK150, 9. BIZ 114, 10. izokwercetyna, 11. DMA, 12. eleclazine, 13. eprotyrom, 14. fadrozol, 15. MBX-4132, 16. WS3, 17. pentagalloilglukoza, 18. frentizol, 19. szikonina, 20. 3,4'-dihydroksyflawon, 21. deoksyzikonina, 22. 3,3'-digalusan, 23. L-NIO.

6.10.2 Hamowanie aktywności degradacyjnej

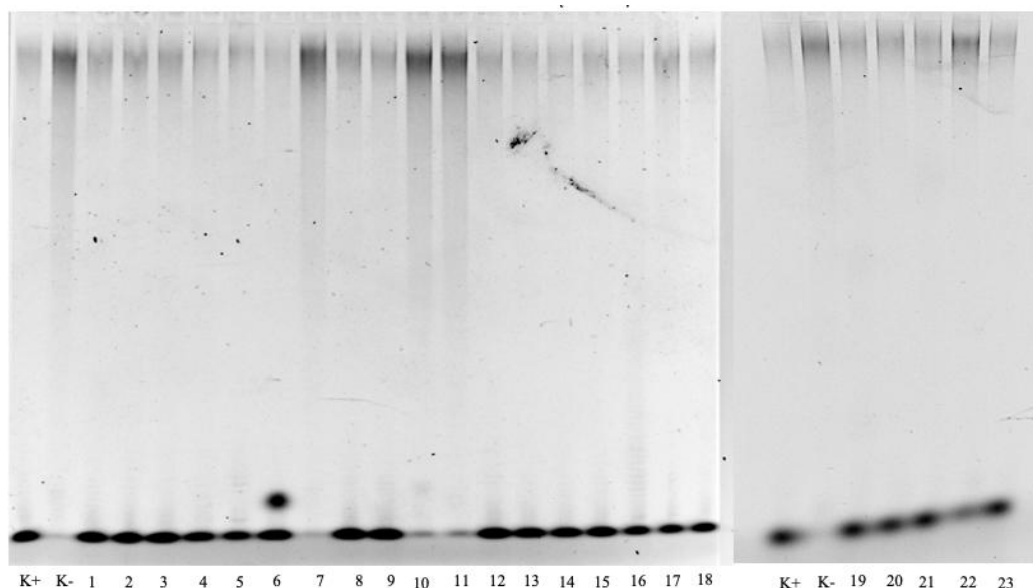
Zahamowanie aktywności degradacyjnej białka PNP oceniano na podstawie intensywności prążków wysokorozdzielczego żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących (UREA-PAGE), analizując sygnał fluorescencyjny odpowiadający produktom degradacji poliadenylowanego RNA. Kontrola dodatnia stanowiła punkt odniesienia (0% zahamowania), natomiast kontrola ujemna odpowiadała wartości 100% zahamowania aktywności degradacyjnej (Ryc. 39).

W ocenie ilościowej stopnia zahamowania aktywności degradacyjnej PNP, opartej na analizie intensywności prążków, wykazano, że część związków w stężeniu 10 μ M istotnie ograniczała degradację poliadenylowanych oligonukleotydów znakowanych fluorescencyjnie (5'-HEX). Najwyższy poziom hamowania aktywności degradacyjnej obserwowano w obecności: panobinostatu (85%), izokwercetyna (82%) oraz DMA (77%). Zahamowanie o pośredniej sile wykazała pentagalloilglukoza (51%). Słabszy efekt hamujący zaobserwowano dla: frentizolu (41%), WS3 (37%), (S)-gossypol (34%)

oraz 3,3'-digalusanu teaflawiny (25%). Związki o niskiej aktywności hamującej w tych warunkach obejmowały: niklozamid (16%), L-NIO (4%) oraz MBX-4132 (1%).

Pozostałe badane związki nie wykazywały hamowania aktywności degradacyjnej PNP w zastosowanych warunkach, a dla części z nich uzyskano wartości ujemne: ulixertinib (-16%), fukoksantyna (-25%), YM-90709 (-30%), inhibitor acetylotransferazy histonowej II (-18%), PK150 (-48%), BIZ 114 (-48%), eleclazine (-37%), eprotyrom (-6%), szikonina (-10%), 3,4'-dihydroksyflawon (-8%) oraz deoksyzikonina (-11%). Przyjęto, że wartości ujemne oznaczają wyższą zintegrowaną intensywność sygnału produktów degradacji w porównaniu z reakcją kontrolną (bez inhibitora), co może wskazywać na brak efektu hamującego i/lub pozorny wzrost degradacji w analizowanym zakresie żelu (np. w wyniku zmian rozkładu produktów, tła lub właściwości fluorescencji). Do dalszych analiz zakwalifikowano związki powodujące $\geq 50\%$ zahamowania aktywności degradacyjnej PNP względem wartości kontrolnych: panobinostat, izokwercetyna, DMA oraz pentagalloyloglukoza.

Hamowanie aktywności polimeryzacyjnej białka PNP *H. pylori* przez wybrane związki chemiczne w stężeniu 10 μM



Ryc. 39. Hamowanie aktywności degradacyjnej białka PNP *H. pylori* przez wybrane związki chemiczne (10 μM) analizowane metodą UREA-PAGE. K+ - kontrola dodatnia: kompletna mieszanina reakcyjna zawierająca poliadenylowany substrat RNA znakowany 5'-HEX oraz enzym PNP, bez inhibitora (referencja 0% zahamowania). K- - kontrola ujemna: mieszanina zawierająca substrat RNA, lecz bez enzymu PNP (referencja 100% zahamowania). Numery 1-23 odpowiadają tym samym związkom co w teście zahamowania polimeryzacji opisanym powyżej. Stopień degradacji oceniano ilościowo metodą densytometrii sygnału fluorescencyjnego poprzez pomiar zintegrowanej intensywności prążków niskocząsteczkowych produktów degradacji w zdefiniowanym zakresie migracji, po odjęciu tła i normalizacji do K+ oraz K-. Obniżenie intensywności prążków produktów degradacji względem K+ świadczy o hamowaniu aktywności PNP.

7. Dyskusja

Badania nad metabolizmem RNA u bakterii wykazały, że procesy dojrzewania i degradacji RNA stanowią nie tylko główny mechanizm regulacji ekspresji genów, ale także odgrywają kluczową rolę w m. in. adaptacji patogenów do zmian w obrębie niszy środowiskowej, kolonizacji gospodarza oraz biorą udział w procesach związanych z odpowiedzią na stres fizjologiczny komórki [138].

Ewolucja mechanizmów degradacji RNA doprowadziła do wykształcenia różnych wariantów degradosomu, których organizacja zależy od typu bakterii oraz zajmowanej przez nie niszy ekologicznej. U modelowych bakterii *E. coli* degradosom RNA to wieloskładnikowy kompleks, którego centralnym elementem jest RNaza E, oddziałująca z PNPazą, helikazą RhlB oraz enolazą [139]. U bakterii Gram-dodatnich, takich jak *B. subtilis*, kluczowym elementem degradosomu jest RNaza Y, która koordynuje współdziałanie PNPazy i helikazy CshA, pełniąc rolę funkcjonalnego odpowiednika RNazy E *E. coli* [140]. U *M. tuberculosis* rdzeń degradosomu RNA stanowią RNaza E, RNaza J, PNPaza i helikaza RhlE. Zidentyfikowany w badaniach proteomicznych i transkryptomicznych kompleks enzymów uznano za kluczowy dla metabolizmu RNA oraz regulacji stresu komórkowego [129]. W przypadku *C. jejuni*, choć pełna charakterystyka degradosomu tych bakterii nie została dotychczas opracowana, zidentyfikowano PNPazę o aktywności egzorybonukleazy, której działanie jest regulowane przez temperaturę oraz obecność jonów dwuwartościowych. Wskazuje to na udział PNPazy w degradacji mRNA i adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiskowych [108].

Szczególnym przypadkiem pod względem budowy i organizacji degradosomu jest degradosom minimalny *H. pylori*, którego skład jest znacznie uproszczony względem wspomnianych modeli bakteryjnych [141] [142]. W genomie *H. pylori* nie występuje gen kodujący RNazę E, natomiast jest gen *rny* kodujący RNazę Y (HP0760), błonową endorybonukleazę biorącą udział w potranskrypcyjnej regulacji małych RNA związanych z wirulencją bakterii. W genomie *H. pylori* nie zidentyfikowano genów kodujących białka opiekuńcze RNA, takie jak Hfq i ProQ, które u innych bakterii stabilizują mały niekodujący RNA i pośredniczą w ich interakcji z mRNA. Głównym enzymem o aktywności endo- i 5'→3' egzonukleolitycznej pozostaje RNaza J, uznawana

za niezbędną dla przeżywalności *H. pylori*. Dodatkowym elementem kompleksu degradosomu *H. pylori* jest jedyna helikaza, białko RhpA, należące do rodziny helikaz typu DEAD-box. Wykazano, że RhpA tworzy kompleks z RNazą J, tworząc dwuskładnikowy „minimalny” degradosom charakterystyczny dla tego gatunku. Kompleks RNazy J-RhpA pełni funkcję analogiczną do degradosomów opisywanych u *E. coli* czy *B. subtilis*. RNaza J odpowiada za inicjację degradacji RNA poprzez cięcie lub stopniowe trawienie transkryptów od końca 5', natomiast helikaza RhpA rozplata struktury drugorzędowe RNA, ułatwiając dostęp nukleazom [107], [142], [141].

Dopełnieniem funkcji degradosomu *H. pylori* jest białko PNP. Badanie jego aktywności enzymatycznej i określenie funkcjonalnego znaczenia stanowiły cele niniejszej pracy. Wyniki badań pozwalają sugerować, że białko to odgrywa prawdopodobnie rolę w regulacji degradacji RNA, choć nie tworzy stabilnych kompleksów z RhpA. Warto podkreślić, że *H. pylori* zachowuje w genomie gen *pnp*, mimo braku wielu innych elementów typowych dla degradosomu, co może świadczyć o znaczeniu PNPazy jako niezależnego białka regulującego degradację RNA, działającego w cytoplazmie.

Optymalizacja warunków ekspresji i procesu oczyszczania białek otrzymywanych w niniejszej pracy umożliwiła uzyskanie wielomiligramowych ilości aktywnych enzymatycznie preparatów białkowych PNP, RhpA i PapS, co pozwoliło na ich dalszą charakterystykę, ze szczególnym uwzględnieniem białka PNP. Analiza wyników uzyskanych metodą chromatografii wykluczania wielkości (SEC) wykazała, że PNPaza występuje głównie w formie trimerycznej (~230 kDa), co jest zgodne z danymi literaturowymi dla homologu tego białka u *E. coli* czy *M. tuberculosis* [143], [144]. W przypadku białka RhpA, badanie metodą chromatografii wykluczania (SEC) wskazywało na objętość elucji odpowiadającą pozornie wyższej masie cząsteczkowej, co mogłoby sugerować występowanie form oligomerycznych. Natomiast zgodnie z danymi literaturowymi, białko RhpA (podobnie jak inne helikazy z rodziny DEAD-box) jest monomerem. W badaniach zespołu Hilde de Reuse wykazano, że RhpA stanowi monomeryczny składnik minimalnego degradosomu *H. pylori*, tworząc funkcjonalny kompleks z RNazą J, bez dowodów na stabilną homo-oligomeryzację helikazy RNazą J [122], [142], [105]. W przypadku białka PapS *H. pylori* zostało ono zidentyfikowane jako enzym występujący w formie monomerycznej, z niewielkim udziałem form agregujących i produktów degradacji. Wynik ten jest zgodny z charakterystyką podobnych białek,

bakteryjnych poli(A)-polimeraz, które np. u *E. coli* (PAP I) zostały opisane jako enzymy w formie monomerycznej o wielkości ok. 55 kDa [145].

U wielu gatunków bakterii PNPaza wraz z helikazami RNA stanowi element kompleksu degradosomowego odpowiedzialnego za kontrolowaną degradację oraz dojrzewanie RNA. W klasycznym modelu degradosomu *E. coli* wykazano, że PNPaza oddziałuje z helikazą RhlB, tworząc stabilny kompleks funkcjonalny z RNazą E i enolazą, co umożliwia efektywną degradację i remodelowanie cząsteczek mRNA[146]. W toku prac własnych nie zaobserwowano wykrywalnej, bezpośredniej interakcji pomiędzy PNPazą *H. pylori* a helikazą RhpA w zastosowanych testach oddziaływań białko-białko prowadzonych w warunkach *in vitro*. Wyniki te wskazują, że w odróżnieniu od modelu *E. coli*, PNPaza *H. pylori* nie tworzy z RhpA stabilnego kompleksu analogicznego do interakcji białek PNP-RhlB. Otrzymane dane sugerują, że PNPaza może funkcjonować poza minimalnym kompleksem tj. RNaza J i RhpA, potencjalnie w sposób niezależny od bezpośredniego wiązania z helikazą. Obserwacje te pozostają zgodne z doniesieniami zespołu H. De Reuse, w których wykazano, że helikaza RhpA oddziałuje z RNazą J, tworząc degradosom minimalny *H. pylori* [142].

W trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej opublikowano pracę opisującą rolę białka RhpA *H. pylori*, w tym jego oddziaływanie z RNazą J [142]. Ponieważ wyniki te w znacznym stopniu odpowiadały na pytania badawcze dotyczące funkcji RhpA, zakres dalszych badań podjętych w niniejszej pracy doktorskiej został ukierunkowany na inne elementy metabolizmu RNA. Zasadnicza część badań eksperymentalnych niniejszej pracy koncentrowała się na białkach PNP oraz PapS, które w momencie planowania badań pozostawały znacznie słabiej scharakteryzowane. Uzyskane wyniki pozwoliły m. in. na eksperymentalną weryfikację aktywności tych białek. W przypadku głównego modelu, białka PNP, określono również wpływ delekcji genu kodującego to białko na fenotyp *H. pylori* tj. przeżywalność w warunkach stresowych i wrażliwość na antybiotyki co wydaje się kluczowe w dobie narastającej oporności tych bakterii na powszechnie stosowane antybiotyki.

W testach biochemicznych z wykorzystaniem białka PNP *H. pylori*, potwierdzono dwufunkcyjność tego enzymu. W obecności kofaktorów jakimi są jony metali Mn^{2+} oraz Fe^{3+} PNPaza katalizowała wydłużanie jednoniciowego oligonukleotydu poli(A)

co wskazuje na aktywność polimeryzacyjną tego białka. Z kolei w obecności jonów Mg^{2+} , Fe^{3+} oraz jonów fosforanowych, wydłużone oligonukleotydy poli(A), ulegały skróceniu, co potwierdziło aktywność degradacyjną PNP [141]. Ponadto, w toku badań zaobserwowano, że jony Fe^{3+} wspomagają zarówno reakcje polimeryzacji, jak i degradacji, co nie było dotychczas odnotowane w literaturze i może sugerować specyficzne właściwości katalityczne PNPazy *H. pylori* związane z jej środowiskiem biochemicznym.

Aktywności enzymu PNP były oznaczone z wykorzystaniem opracowanego testu fluorymetrycznego opartego na barwniku Thioflawinie T, wiążącym niespecyficznie jednoniciowe odcinki RNA/DNA. Optymalizacja parametrów reakcji w badaniach wstępnych, w tym stężenia PNPazy (5 μM), jonów metali, czasu inkubacji i temperatury - pozwoliła uzyskać wiarygodne i powtarzalne wyniki, które stały się podstawą testu przesiewowego dla inhibitorów PNPazy *in vitro*. Tego typu podejście, bazujące na fluorescencji, było wcześniej stosowane do analizy aktywności nukleaz i polimeraz RNA [147], jednak jego adaptacja dla białka *H. pylori* stanowi nowatorski aspekt niniejszej pracy.

Obiektem badań w niniejszej pracy było również białko PapS, którego funkcja w metabolizmie RNA *H. pylori* pozostaje dotychczas słabo poznana. Uzyskane wyniki wskazują, że PapS może wpływać na dynamikę i wydajność procesów kontrolowanych przez degradosom, co otwiera nowe perspektywy badawcze dotyczące regulacji procesów zależnych od RNA u *H. pylori*. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozwalają przyporządkować funkcję białka PapS w kontekście szlaków odpowiedzialnych za obróbkę RNA, w tym procesów związanych z dojrzewaniem tRNA.

Ocena roli białka PapS wymagała weryfikacji jego dotychczasowej adnotacji funkcjonalnej, zgodnie z którą w bazach danych klasyfikowane było jako poli(A) polimeraza. Wyniki bioinformatycznej analizy sekwencji aminokwasowej oraz przewidywanej struktury trzeciorzędowej wskazują, że PapS należy do nadrodziny nukleotydylotransferaz klasy II. Białko to posiada konserwowany motyw EDxLR, który jest charakterystyczny dla nukleotydylotransferaz klasy II m. in. CCA-tRNA nukleotydylotransferazy, jak i poli(A) polimerazy I *E. coli* co wskazuje na istnienie wspólnego rdzenia katalitycznego tych białek [147].

Jednocześnie porównawcza analiza sekwencji oraz budowy centrum aktywnego ujawnia istotne różnice pomiędzy PapS *H. pylori* a PAP I *E. coli* w zakresie elementów determinujących specyficzność substratową. W szczególności ułożenie motywu EDxLR, obecność krótkiej elastycznej pętli pomiędzy motywami A i B oraz dostępność centrum katalitycznego w PapS wykazują większe podobieństwo do enzymów CCA-dodających niż do poli(A) polimerazy I. Różnice te są zgodne z odmiennym mechanizmem rozpoznania końca tRNA oraz etapowej selekcji nukleotydów, prowadzącej do sekwencyjnej dobudowy reszt C, C i A, charakterystycznej dla enzymów CCA-tRNA nukleotydylotransferaz.

Istotne znaczenie dla określenia funkcji PapS mają uzyskane dane w niniejszej pracy. Brak aktywności poliadenylacyjnej bilka PapS w testach z wykorzystaniem ssRNA i ATP nie pokrywa się z funkcją klasycznej poli(A) polimerazy typu PAP I. Jednocześnie zaobserwowany proces dobudowy nukleotydów do substratów naśladujących niekompletny koniec CCA tRNA przez białko PapS, odpowiada mechanizmowi działania typowych CCA-tRNA nukleotydylotransferaz. Taki wzorzec aktywności odróżnia PapS od niespecyficznych poli(A) polimeraz i wskazuje, że białko to pełni funkcję wyspecjalizowanego enzymu typu CCA-NT [148].

Genom *H. pylori* charakteryzuje się ograniczonym zestawem komponentów metabolizmu RNA, przy jednoczesnym zachowaniu enzymów niezbędnych dla procesów krytycznych dla przeżycia komórki. Dobudowa końca 3'-CCA stanowi warunek konieczny aminoacylacji tRNA oraz prawidłowego przebiegu translacji, co uzasadnia obecność funkcjonalnego enzymu CCA-NT nawet w warunkach znacznej redukcji genomu. W tym kontekście PapS należy traktować jako funkcjonalny odpowiednik CCA-tRNA nukleotydylotransferazy, a nie jako bakteryjną poli(A) polimerazę typu PAP I, co uzasadnia korektę jego dotychczasowej adnotacji funkcjonalnej.

Interakcje helikaz RNA z innymi białkami stanowią istotny element funkcjonowania bakteryjnych kompleksów obróbki RNA. Helikazy z rodziny DEAD-box zwykle współdziałają z enzymami katalitycznymi dla metabolizmu RNA, ułatwiając im dostęp do struktur drugorzędowych RNA oraz regulując ich aktywność. W modelu *E. coli*, helikaza RhlB wchodzi w przejściową interakcję z RNazą E, a powstający kompleks zwiększa aktywność ATPazową i helikazową RhlB [149], [150]. Podobny mechanizm zaobserwowano u bakterii Gram-dodatnich *B. subtilis*, u których helikaza CshA tworzy

funkcjonalne kompleksy z RNazą Y lub RNazą J, modulując aktywność całego degradosomu [140].

Zaobserwowane w niniejszej pracy eksperymentalnej oddziaływanie białka PapS z helikazą RhpA *H. pylori* może wpisywać się w ogólny charakter przejściowych interakcji helikaz DEAD-box z enzymami odpowiedzialnymi za metabolizm RNA. Choć PapS *H. pylori* nie wykazuje cech nukleazy ani nie stanowi głównego składnika degradosomu RNA, wykazane wiązanie z białkiem RhpA może odzwierciedlać analogiczny do innych bakterii mechanizm regulacyjny, w którym helikaza nawiązuje krótkotrwałe interakcje z nukleotydylotransferazami z rodziny poli(A)-polimeraz lub enzymów dodających końce CCA, które są spokrewnione strukturalnie, mimo odmiennej specyficzności substratowej [151].

W literaturze dotyczącej bakterii nie opisano dotychczas bezpośrednich interakcji helikaz DEAD-box z enzymami tego typu w kontekście degradosomu. Analogiczne powiązanie procesów degradacji RNA i poliadenylacji zostało natomiast udokumentowane u eukaryota. W mitochondriach komórek zwierzęcych część kompleksu SUV3·PNPase, określanego jako mitochondrialny degradosom, tworzy przejściowy kompleks z mitochondrialną poli(A)-polimerazą mtPAP[152] Oddziaływanie to wiązano z modulacją procesu poliadenylacji mitochondrialnych transkryptów w zależności od warunków wewnątrzkomórkowych, w tym poziomu nieorganicznego fosforanu w macierzy mitochondrialnej [153]. Ponadto, w jądrze drożdży *Saccharomyces cerevisiae* opisano kompleks TRAMP, złożony m.in. z helikazy RNA Mtr4 oraz poli(A)-polimerazy Trf4, który pełni funkcję kofaktora egzozomu i promuje degradację RNA, zwłaszcza w przypadku substratów o złożonej strukturze drugorzędowej [154]. Również w modelu bakteryjnym *E. coli* poli(A)-polimeraza PAP I, pełniąca funkcje polimeryzacyjne wobec RNA, wykazuje zdolność do interakcji z komponentami maszynarii degradacyjnej. Opisano m.in. jej bezpośrednią interakcję z RNazą E w obrębie regionu rusztowania degradosomu [131], co wskazuje na funkcjonalne powiązanie procesów poliadenylacji i degradacji RNA także u bakterii, mimo odmiennej organizacji tych szlaków w porównaniu do eukaryota. Wykazano również, że aktywność PAP I może być dodatkowo modulowana przez białko Hfq, które wiąże ogony poli(A) i wpływa na elongację poli(A) oraz dostępność końca 3' RNA dla nukleaz [154], [155].

Bakteria *H. pylori* pozbawiona jest białek Hfq i ProQ [141], co może sugerować rozwój alternatywnych mechanizmów integracji funkcji enzymów zaangażowanych w metabolizm RNA, na przykład poprzez bezpośrednie interakcje białko-białko. Biorąc to pod uwagę oddziaływanie PapS-RhpA może stanowić element kompensacyjny, rozszerzający funkcjonalność minimalnego degradosomu o dodatkowy moduł regulacyjny, sprzyjający dynamicznemu dostosowywaniu aktywności kompleksu degradującego RNA do warunków środowiskowych i metabolicznych bakterii.

Uzyskanie trzech żywotnych mutantów delecyjnych *H. pylori* (Δpnp , $\Delta rhpA$ i $\Delta papS$) wskazuje, że geny kodujące białka PNP, RhpA i PapS nie są niezbędne do przeżycia bakterii w warunkach *in vitro*. Wynik ten jest zgodny z ogólną obserwacją, że u większości bakterii składniki degradosomu i kodujące je geny, które nie są niezbędne do przeżycia komórki, ale ich delecja wpływa m.in. na zaburzenia wzrostu, zmianę morfologii komórek lub ograniczenie procesów regulacji RNA [119]. U *E. coli* delecja genu *pnp* kodującego PNPazę, nie jest letalna, ale prowadzi do akumulacji nieprawidłowych transkryptów i wydłużenia czasu podziału komórkowego, co wiąże się z zaburzeniem procesów degradacji mRNA i przetwarzaniem np. rRNA [148]. Podobnie u *B. subtilis* geny kodujące RNazę Y, RNazę J1/J2 i PNPazę są uznawane za niezbędne dla efektywnej regulacji potranskrypcyjnej, natomiast ich delecja nie powoduje obumarcia komórek, ale sprzyja spowolnieniu wzrostu bakterii i zaburza ekspresję licznych genów związanych z metabolizmem [142]. Interesującym punktem odniesienia jest blisko spokrewniona z *H. pylori* pałeczka *C. jejuni*, u której delecja genu *pnp* również nie prowadzi do obumierania komórki, natomiast wpływa istotnie m. in. na ruchliwość, zdolność do kolonizacji i wydajność adaptacji do stresu oksydacyjnego [114]. Z kolei u *M. tuberculosis* PNPaza pełni kluczową rolę w regulacji metabolizmu RNA (m.in. jako główny składnik degradosomu) oraz w adaptacji do stresu poprzez kształtowanie stabilności mRNA i RNA niekodujących. PNPaza jest białkiem kluczowym dla utrzymania homeostazy RNA i funkcjonowania układu degradosomowego. W odróżnieniu od wielu bakterii, u prątków PNPaza jest niezbędna do przeżycia bakterii w warunkach *in vitro*, dlatego jej rolę ocenia się głównie w modelach warunkowego obniżenia poziomu PNPazy (nie na podstawie mutantów delecyjnych). Nawet niewielkie obniżenie poziomu lub aktywności PNPazy jest dla *M. tuberculosis* niekorzystne i wiąże się ze spadkiem żywotności oraz rozległymi

zmianami fizjologicznymi i transkryptomicznymi. Wykazano, że PNPaza jest obecna w komórkach prątków w znacznie większej ilości niż pozostałe składniki kompleksu degradosomu [99].

Podobnie jak w innych modelach bakteryjnych, delecja genu *rhpA* u *H. pylori* nie jest letalna w warunkach *in vitro*, co sugeruje, że funkcje tej jedynej helikazy DEAD-box mogą być w pewnym stopniu kompensowane przez inne enzymy uczestniczące w metabolizmie RNA (np. rybonukleazy endo- i egzorybonukleolityczne) lub przez obecność dodatkowych szlaków kontroli jakości RNA. Jednocześnie RhpA stanowi kluczowy element minimalnego degradosomu opartego na RNazie J, a jej brak skutkuje wyraźnymi defektami fizjologicznymi tj. spowolnienie namnażania komórek, zaburzenia dojrzewania 16S rRNA oraz nieprawidłowości w biogenezie rybosomów, mimo że zachowanej przeżywalności *in vitro*, mutant $\Delta rhpA$ wykazuje istotne fenotypy adaptacyjne, w tym ograniczenie zdolności do ruchu oraz fenotyp zwoązany z kolonizacją w modelu mysim, co wskazuje na znaczenie RhpA jako czynnika warunkowo niezbędnego do przeżycia w środowisku gospodarza [142], [107]. Wyniki te są zgodne z obserwacjami dotyczącymi homologicznych helikaz DEAD-box, takich jak CshA u *B. subtilis* oraz RhlB u *E. coli*, których brak zwykle nie prowadzi do śmierci komórki, ale wiąże się z defektami w metabolizmie RNA i obniżeniem wydajności działania degradosomu [140], [150]. Żywotność szczepów delecyjnych *H. pylori* Δpnp , $\Delta rhpA$ oraz $\Delta papS$ uzyskanych w niniejszej pracy wskazuje, że u tej bakterii badane białka metabolizmu RNA, nie są niezbędne do przeżycia komórki. Ich rola może być przede wszystkim związana z regulacją procesów degradacji i obróbki RNA, co wpływa na prawidłowy przebieg wzrostu oraz zdolność adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych.

Przeprowadzenie globalnych analiz ekspresji RNA-seq dostarczyło cennych informacji o roli poszczególnych enzymów w regulacji transkrypcji u *H. pylori*. Wspomniane wcześniej badanie Redko i wsp. (2016) wykazało, że obniżenie poziomu RNazy J u *H. pylori* powoduje wzrost stabilności ponad 20% całkowitego mRNA, prowadząc do jego akumulacji. Największy wzrost ilości transkryptów zaobserwowano dla produktów genów zaangażowanych w metabolizm podstawowy, biosyntezę kofaktorów oraz odpowiedź na stres, co sugeruje, że RNaza J normalnie utrzymuje mRNA dla tych transkryptów na niskim poziomie, zapobiegając ich nadmiernej ekspresji, co mogłyby

zaburzać fizjologię komórki bakteryjnej lub jej adaptację do środowiska [142]. Zaobserwowano, że część transkryptów stabilizowanych w warunkach osłabionej aktywności RNazy J zależy również od obecności helikazy RhpA, co wskazuje na ich współdziałanie w procesach degradacji RNA. [124]. W przypadku *B. subtilis* wykazano, że inaktywacja RNazy Y lub J1 skutkuje wyraźnym wydłużeniem czasu półtrwania znacznej części mRNA. Zauważono, że zmiany te obejmują nawet 30% transkryptów, prowadzi do globalnej przebudowy ekspresji genów i zakłócenia homeostazy RNA. [140]. W przypadku *C. jejuni* wykazano, że delecja genu kodującego PNPazę wpływa na regulację wielu procesów komórkowych. Analizy proteomiczne wykazały zmienioną ekspresję białek biorących udział w metabolizmie energetycznym, przetwarzaniu RNA oraz odpowiedzi na stres oksydacyjny [114]. Wyniki cytowanych analiz transkryptomicznych oraz inne dane literaturowe potwierdzają, że degradosom pełni rolę swoistego „strażnika” transkryptomu, odpowiadając za selektywne i szybkie usuwanie uszkodzonych lub nieprawidłowo przetworzonych cząstek RNA. Brak kluczowych komponentów kompleksu, takich jak RNaza J, helikaza RhpA czy PNPaza, prowadzi do akumulacji transkryptów, które w warunkach fizjologicznych ulegają szybkiej degradacji. W efekcie dochodzi do deregulacji na poziomie posttranskrypcyjnym, co może zaburzać delikatną równowagę między transkrypcją a degradacją RNA i wpływać na aktywność wielu szlaków regulacyjnych.

W odniesieniu do *H. pylori* wykazano, że delecja genu *pnp* prowadzi do istotnych zmian w profilu ekspresji niewielkiej liczby genów, co zostało przeanalizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Zaobserwowano podwyższony poziom transkryptów należących do wybranych szlaków adaptacyjnych, w tym szlaku syntezy puryn, a jednocześnie obniżenie ekspresji genów związanych z utrzymaniem integralności błony komórkowej, takich jak *acpS*. Uzyskane wyniki wskazują, że PNPaza, mimo braku tworzenia oddziaływań z pozostałymi składnikami degradosomu, pełni niezależną funkcję regulacyjną w kontrolowaniu stabilności określonych transkryptów. Potencjalnie jej brak prowadzi do rozregulowania mechanizmów adaptacyjnych oraz zaburzeń fizjologii komórki w warunkach środowiskowego stresu, co może istotnie wpływać na zdolność kolonizacji gospodarza. Jednocześnie należy podkreślić, że zakres zmian transkryptomicznych po delecji genu *pnp* może zależeć od warunków doświadczenia. Możliwe, że pełniejsza pula transkryptów kontrolowanych przez PNPazę ujawnia się

dopiero po indukcji określonych warunków stresowych, np. w szczególności stresu temperaturowego. Taki wniosek jest spójny z badaniami przeprowadzonymi nad pałeczką *C. jejuni*, u której obecność PNPazy jest kluczowa dla przeżycia w niskich temperaturach, a szczep pozbawiony funkcjonalnego genu *pnp* wykazuje obniżoną tolerancję na chłód [114].

Choć PNPaza nie jest niezbędna do przeżycia *H. pylori* w warunkach *in vitro*, jej brak zwiększa wrażliwość komórek na niekorzystne czynniki środowiskowe i wybrane antybiotyki. Uzyskane wyniki sugerują, że PNPaza może stanowić potencjalny cel molekularny, a zahamowanie jej aktywności mogłoby osłabiać mechanizmy adaptacyjne *H. pylori* poprzez zaburzenie stabilności mRNA i w konsekwencji zwiększać skuteczność terapii skojarzonej z istniejącymi już antybiotykami. Dotyczy to m.in. klarytromycyny, która hamuje translację poprzez oddziaływanie z podjednostką 50S rybosomu, oraz metronidazolu, który jest prolekiem wymagającym wewnątrzkomórkowej redukcyjnej bioaktywacji; proces ten jest wrażliwy na zaburzenia równowagi redoks i szlaków przenoszenia elektronów w komórce [156].

Bardziej rozległe zaburzenia w ekspresji genów w odniesieniu do szczepów delecyjnych *H. pylori* Δpnp i $\Delta papS$ zaobserwowano w przypadku szczepu delecyjnego $\Delta rhpA$, również szczegółowo przeanalizowanego w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Delecja genu kodującego jedyną helikazę DEAD-box *H. pylori* skutkowałą zmianą poziomu transkryptów kilkuset genów, których produkty warunkowały przebieg licznych procesów komórkowych istotnych dla przeżywalności i adaptacji bakterii. Deregulacji ulegają między innymi geny odpowiedzialne za naprawę DNA, biosyntezę kofaktorów oraz modyfikacje powierzchniowe błony komórkowej. Tak szeroki zakres obserwowanych zmian jest spójny z danymi literaturowymi zespołu Hilde de Ruse, które wskazują, że RhpA jest kluczowym komponentem minimalnego degradosomu *H. pylori* tworzonego wspólnie z RNazą J, a oba białka funkcjonalnie oddziałują ze sobą. W badaniach zespołu de Reuse wykazano, że RhpA nie warunkuje wzrostu *H. pylori* w 37°C, natomiast obecność tego białka jest kluczowa do namnażania się tych bakterii w niższej temperaturze niż temperatura żywiciela (33°C). Ponadto delecja genu *rhpA* spowodowała ograniczenie ruchliwości patogenu oraz zdolność do kolonizacji niszy żołądka u myszy. Autorzy połączyli występowanie tego fenotypu z zaburzeniami adaptacji stresowej i procesów biogenezy rybosomów, w tym dojrzewania cząstek rRNA.

W tym kontekście efekt transkryptomyczny $\Delta rhpA$ nie musi wynikać wyłącznie z utraty aktywności samej helikazy ale może też odzwierciedlać zaburzenie wspomnianego oddziaływania RNazy J z RhpA i wtórną deregulację degradacji RNA. Brak aktywności tego białka przesuwą równowagę pomiędzy procesami stabilizacji a degradacji RNA, co wtórnie uderza w wiele procesów fizjologicznych i ogranicza zdolność bakterii do adaptacji w warunkach panujących w niszy żołądkowej [107], [142]. Tak szeroki zakres zmian jednoznacznie wskazuje na centralną rolę RhpA w utrzymaniu homeostazy transkryptomowej oraz w funkcjonowaniu minimalnego degradosomu charakterystycznego dla *H. pylori*.

Enzymy bakteryjne biorące udział w obróbce RNA, są coraz częściej postrzegane jako atrakcyjne cele w rozwoju nowych rozwiązań terapeutycznych przeciw patogenom. Zakłada się, że niskocząsteczkowe związki chemiczne hamujące aktywność takich enzymów mogą działać bakteriostatycznie lub osłabiać czynniki wirulencji drobnoustroju. Pierwowzorem wspomnianych badań były prace nad inhibitorami RNazy E, kiedy to w 2015 roku zidentyfikowano pierwsze drobnocząsteczkowe związki zdolne do wiązania i hamowania aktywności kompleksu tej RNazy u *E. coli* [157]. W toku badań udało się także opracować kolejne inhibitory celujące w centrum aktywne RNazy E, które wykazały skuteczność także przeciw homologom tego białka u patogenów tj. *Francisella tularensis* i *Acinetobacter baumannii*, co dodatkowo potwierdza atrakcyjność tego enzymu jako celu molekularnego dla nowych leków [158]. W kontekście egzorybonukleaz szczególną uwagę zwrócono również na PNPazę, gdyż jej aktywność wpływa na globalną regulację transkryptomu, obejmującą również geny przypisywane w analizach funkcjonalnych do szlaków związanych z wirulencją [159]. W 2019 roku zespół Zhang i wsp. odkrył, że aktywna forma leku przeciwgruźliczego pyrazynamidu czyli kwas pirazynowego (POA), może hamować PNPazę *M. tuberculosis* (Rv2783c) poprzez współzawodnictwo o wiązanie specyficznego RNA (tmRNA) do centrum aktywnego enzymu [160]. Mutacja punktowa D67N w *M. tuberculosis* PNP wywołała oporność PNPazy na działanie POA, co było ściśle związane z opornością szczepu na pyrazynamid. Wspomniane badania potwierdziły, że PNPaza jest jednym z celów molekularnych działania tego leku [161]. To odkrycie ujawniło nowy mechanizm działania klinicznego antybiotyku, który wykazuje działanie destabilizujące metabolizm RNA prątka gruźlicy, poprzez zahamowanie aktywności białka PNP, co sugeruje,

że białko to może być skutecznym celem molekularnym i strategią terapeutyczną w walce z drobnoustrojami wielolekoopornymi [99], [162]. Równolegle, Matos i in. (2024) przeprowadzili przesiew *in silico* 58 tys. związków z biblioteki Maybridge pod kątem wiązania w centrum katalitycznym PNPazy *E. coli*, wykorzystując strukturę krystalograficzną enzymu jako model receptora (PDB: 3GCM). Następnie wytypowane związki zweryfikowano eksperymentalnie i wykazano, że trzy z nich (CD06144, SPB04215, SPB04462) hamują aktywność PNPazy *in vitro* [158]. Wyniki te stanowią dowód, że celowanie w bakteryjne egzonukleazy RNA i identyfikacja ich inhibitorów, może prowadzić do odkrycia związków o aktywności biologicznej.

W zakażeniach *H. pylori*, z uwagi na narastającą lekooporność np. na metronidazol i klarytromycynę, celowanie w komponenty degradosomu RNA tych bakterii tj. białko PNP wydaje się obiecującą alternatywą w kontekście eradykacji tego patogenu. Opracowanie selektywnych inhibitorów PNPazy wymaga uwzględnienia różnic między ludzkimi a bakteryjnymi enzymami RNA, jednakże wysoka konserwatywność w budowie PNPazy oraz jej rola w patogenności czynników zakaźnych, czynią z tego białka atrakcyjny cel molekularny. Podsumowując, dostępne prace pokazują, że niskocząsteczkowe związki chemiczne mogą hamować aktywność enzymów kluczowych dla bakteryjnych procesów degradacji RNA (w tym komponentów degradosomu oraz powiązanej z nim egzonukleazy), a wytypowane inhibitory poza efektem biochemicznym *in vitro*, wykazują również mierzalny wpływ na fenotyp komórkowy bakterii, jakkolwiek wpływ na niektóre cechy tj. zdolność tworzenia biofilmu wymaga dalszych badań. Wskazuje to, że farmakologiczna modulacja procesów degradacji RNA jest realnym kierunkiem badań o dużym potencjalnie aplikacyjnym w dobie narastającej antybiotykoodporności [158].

W niniejszej pracy zastosowano wieloetapowe podejście do identyfikacji inhibitorów PNPazy *H. pylori*, łącząc testy enzymatyczne *in vitro* z oceną aktywności przeciwdrobnoustrojowej na całych komórkach bakterii. Testy przesiewowe z wykorzystaniem biblioteki 8562 związków chemicznych pozwoliły wytypować w teście fluorometrycznym 23 związki hamujące aktywność polimeryzacyjną i degradacyjną PNPazy, co weryfikowano w analizach produktów reakcji w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (UREA-PAGE). Jednocześnie wyniki wskazują, że aktywność inhibitora wobec oczyszczonego enzymu nie przekłada się

automatycznie na efekt przeciwbakteryjny w warunkach *in vitro*, w tym na zahamowanie wzrostu lub przeżywalności bakterii. Skuteczność związku chemicznego w warunkach komórkowych zależy m.in. od przenikalności związku przez błonę zewnętrzną i błonę cytoplazmatyczną, jego stabilności chemicznej, aktywności systemów usuwania związków z komórki bakteryjnej oraz możliwego działania nieswoistego.

Kluczową wartość interpretacyjną miały wyniki uzyskane równolegle na trzech szczepach *H. pylori* G27 (WT, Δpnp , pnp^{++}). Zastosowanie szczepu dziękiemu, delecyjnego oraz komplementacyjnego, pozwala odróżnić związki, których efekt przeciwdrobnoustrojowy jest powiązany z obecnością PNPazy, od związków działających głównie na inne cele komórkowe. Najbardziej obiecujący profil działania wykazały związki tj. Niklozamid, Eleclazine oraz PK150, dla których efekt wobec bakterii był powtarzalny i zależny od obecności funkcjonalnego genu *pnp*. Wyniki te pomagają sformułować wniosek, że PNPaza *H. pylori* jest celem molekularnym, podatnym na modulację chemiczną. Natomiast wiarygodna selekcja związków chemicznych jako kandydatów na inhibitory, wymaga równoczesnej oceny ich działania na poziomie enzymu oraz fenotypu komórki bakteryjnej.

Z perspektywy dalszych prac przedstawione podejście stanowi użyteczne ramy do systematycznej identyfikacji i walidacji inhibitorów PNPazy oraz innych komponentów degradosomu *H. pylori*, a uzyskane wyniki wyznaczają kierunki kolejnych badań nad regulacją metabolizmu RNA u tego patogenu.

8. Wnioski szczegółowe

- Zoptymalizowano procedury ekspresji oraz wieloetapowego oczyszczania rekombinowanych białek PNP, RhpA i PapS z *H. pylori*, uzyskując preparaty o jakości i stężeniach umożliwiających badania strukturalno-funkcjonalne oraz testy oddziaływań (uzyskując stężenia rzędu 10-15 mg/ml dla każdego białka)
- Opracowano i zoptymalizowano warunki testów fluorymetrycznych, potwierdzając aktywność polimeryzacyjną i degradacyjną PNPazy (pozwalające na dalsze badania przesiewowe)
- Wykazano, że białko PNP ma formę trimery
- Białko PapS nie wykazywało aktywności poliadenylacyjnej wobec ssRNA, natomiast katalizowało sekwencyjną dobudowę końca 3' tRNA (C→C→A), co wskazuje na jego funkcję jako enzymu dobudowującego CCA- do tRNA, a nie klasycznej poli(A) polimerazy uczestniczącej w degradacji mRNA
- Badanie interakcji RhpA-PapS wykazało pojawienie się przejściowego, umiarkowanego oddziaływania między tymi białkami (zakres mikromolowy)
- Analiza transkryptomiczna szczepów pozbawionych badanych komponentów degradosomu RNA, wykazała nieliczne zmiany transkryptomiczne dla szczepów Δpnp i $\Delta papS$ oraz rozległe zmiany w profilu transkryptomicznym szczepu $\Delta rhpA$

Delecja genu *pnp* u *H. pylori* skutkuje:

- Obniżeniem tolerancji *H. pylori* na zmiany temperatury: wolniejszy wzrost w 39°C, słabsze przeżycie w 4°C.
- Zwiększeniem podatności na uszkodzenia DNA (UV-C) oraz na stres oksydacyjny
- Osłabieniem cech związanych z kolonizacją żołądka: ruchliwość ~30% poziomu WT (~70% redukcji) oraz aktywność ureazy ~50-55% poziomu WT
- Zwiększeniem zdolności tworzenia środowiska biofilmu
- Obniżeniem aktywności katalazy, co wskazuje na zaburzenia mechanizmów ochrony przed ROS i zmianę sposobu funkcjonowania komórek w warunkach stresu
- Zastosowano czteroetapową strategię przesiewową ukierunkowaną na identyfikację inhibitorów aktywności PNP, łączącą testy oceny aktywności

enzymatycznej PNP *in vitro*, jakościową selekcję związków na podstawie ich wpływu na reakcję poliadenylacji RNA oraz ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec szczepów *H. pylori* WTG27, Δpnp , Δpnp^{++}

- Z biblioteki 8562 związków stosowanych w stężeniu 100 μ M wyłoniono kolejno 272 związki ($\geq 90\%$ hamowania polimeryzacji ssDNA), następnie przy stężeniu 1 μ M wyłoniono: 26 inhibitorów polimeryzacji i 38 inhibitorów degradacji poli(A)-RNA ($\geq 50\%$), w tym 9 związków hamujących obie aktywności PNP; po selekcji jakościowej wytypowano 23 związki do dalszej weryfikacji
- W przesiewowym teście na całych komórkach bakterii jako najbardziej obiecujące w hamowaniu wzrostu wskazano związki o profilu $|WT \approx \Delta pnp^{++}| < \Delta pnp$: eleklazine, frentizol, niklozamid, PK150, pentagalloilglukoza, YM-90709, szikonina i deoksyszikonina
- Najbardziej obiecującym kandydatem do dalszych badań na podstawie testów komórkowych był niklozamid, który wykazywał najniższe wartości MIC wobec *H. pylori* oraz zróżnicowaną wrażliwość szczepów w zależności od obecności funkcjonalnego genu *pnp*, co wskazuje na fenotyp zależny od PNP.

9. Wniosek końcowy

PNPaza *H. pylori* nie jest niezbędna do przeżycia tego drobnoustroju w warunkach laboratoryjnych, jednak jej brak istotnie upośledza zdolności adaptacyjne i odpowiedź na stres, co wskazuje na ważną rolę tego enzymu w utrzymaniu homeostazy metabolizmu RNA. PNPaza stanowi zatem obiecujący cel molekularny dla potencjalnych inhibitorów, a uzyskane wyniki uzasadniają dalszą walidację tego białka jako celu terapeutycznego.

Jednocześnie należy podkreślić, że dalsze badania, prowadzone już niezależnie od niniejszego doktoratu, pozwoliłyby jednoznacznie ocenić, czy PNPaza jest enzymem warunkowo niezbędnym, np. w kontekście infekcji, kolonizacji niszy żołądkowej, transmisji między gospodarzami lub przeżycia w zmiennych warunkach środowiska gospodarza. Taka warunkowa niezbędność mogłaby tłumaczyć, dlaczego gen *pnp* jest utrzymywany w genomie *H. pylori*, mimo że jest to genom silnie zredukowany, w którym presja selekcyjna sprzyja eliminacji funkcji zbędnych. Wyniki niniejszej pracy stanowią również istotną przesłankę do rozwoju badań nad mechanizmami tolerancji i lekooporności *H. pylori* oraz do poszukiwania strategii ograniczających narastanie oporności i poprawiających skuteczność terapii zakażeń.

10. Streszczenia

Streszczenie w języku polskim

Narastająca lekooporność *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) na stosowane obecnie antybiotyki ogranicza skuteczność eradykacji, co wiąże się z koniecznością poszukiwania nowych celów molekularnych dla potencjalnych leków. W pracy scharakteryzowano wybrane komponenty degradosomu RNA *H. pylori*, biorąc pod uwagę ich strukturę i funkcję, a także wzajemne oddziaływania: fosforylaze polinukleotydową PNP (PNPaza), helikazę RhpA oraz białko PapS, ze szczególnym uwzględnieniem roli PNP jako potencjalnego celu terapeutycznego. Określono funkcję PapS w metabolizmie RNA i zbadano występowanie interakcji PapS-RhpA. Oczyszczono rekombinowane białka PNP, RhpA i PapS. Zoptymalizowano testy aktywności PNP (reakcje polimeryzacji i degradacji RNA). Wykazano, że PNPaza występuje w formie trimery i zachowuje aktywność enzymatyczną w warunkach umożliwiających dalsze badania przesiewowe. PapS nie wykazywało aktywności poliadenylacyjnej wobec jednoniciowego RNA, natomiast katalizowało sekwencyjną dobudowę końca 3' CCA do tRNA, co wskazuje na funkcję enzymu dobudowującego CCA. Stwierdzono przejściowe, umiarkowane oddziaływanie PapS-RhpA. Analiza transkryptomyczna ujawniła ograniczone zmiany ekspresji w szczepach delecyjnych *H. pylori* G27 Δpnp i $\Delta papS$ oraz rozległą przebudowę profilu transkryptomicznego w $\Delta rhpA$. Delecja *pnp* nie wiązała się z obumieraniem komórek, lecz powodowała istotne ograniczenie zdolności adaptacyjnych: obniżenie tolerancji na stres temperaturowy (wolniejszy wzrost w 39°C i słabsze przeżycie w 4°C), wzrost wrażliwości na UV-C i stres oksydacyjny, zahamowanie ruchliwości i aktywności ureazy oraz katalazy. Jakkolwiek delecja *pnp* wiązała się z nasileniem tworzenia obszaru biofilmu, czego wyjaśnienie wymaga dalszych badań. Zastosowano czteroetapową strategię przesiewową użytych w badaniach inhibitorów PNP łączącą testy *in vitro*, selekcję jakościową i ocenę działania wobec komórek bakteryjnych. Z biblioteki 8562 związków wyłoniono 23 kandydatów do dalszej weryfikacji, a najbardziej obiecujący profil działania zależny od obecności PNP wykazał niklozamid. Uzyskane wyniki wskazują, że PNPaza *H. pylori*, mimo że nie jest niezbędna do przeżycia bakterii stanowi kluczowy węzeł regulacji metabolizmu RNA determinujący odpowiedź stresową i fenotypy adaptacyjne bakterii oraz racjonalny cel dla poszukiwania inhibitorów PNP w celach terapeutycznych.

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*, degradosom RNA, PNPaza, RhpA, PapS

Streszczenie w języku angielskim

The increasing antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) significantly reduces the effectiveness of eradication therapies and highlights the urgent need to identify novel molecular targets for potential therapeutic substances. This study aimed to characterize selected components of the *H. pylori* RNA degradosome - polynucleotide phosphorylase (PNPase), the RNA helicase RhpA, and the protein PapS with particular emphasis on evaluating PNPase as a potential therapeutic target. Additionally, the function of PapS in RNA metabolism and its interaction with RhpA were investigated.

Recombinant PNPase, RhpA, and PapS were successfully purified. Enzymatic assays for PNPase activity, including RNA polymerization and degradation reactions, were optimized to enable downstream inhibitor screening. The spatial structure of PNPase was resolved, followed by structural-functional analyses and interaction studies of the RhpA-PapS complex. PNPase was shown to form a homotrimeric assembly and to retain enzymatic activity under conditions compatible with high-throughput screening applications. PapS did not exhibit polyadenylation activity toward single-stranded RNA; however, it catalyzed the sequential addition of the 3'-terminal CCA sequence to tRNA, consistent with its role as a CCA-adding enzyme. A transient and moderate interaction between PapS and RhpA was detected.

Transcriptomic analysis revealed limited changes in gene expression in the *H. pylori* G27 Δpnp and $\Delta papS$ strains, whereas deletion of *rhpA* resulted in extensive transcriptomic remodeling. Although *pnp* deletion did not abolish bacterial viability, it markedly impaired adaptive capacity. The Δpnp strain displayed reduced tolerance to temperature stress (slower growth at 39°C and decreased survival at 4°C), increased sensitivity to UV-C radiation and oxidative stress, reduced motility and urease as well as catalase activity, while enhanced ability to biofilm complex formation, which needs further study to elucidate the potential mechanism.

A four-stage screening strategy for PNPase inhibitors was implemented, integrating *in vitro* enzymatic assays, qualitative selection steps, and evaluation using bacterial cells. From a library of 8,562 compounds, 23 candidates were selected for further validation. Among them, niclosamide exhibited the most pronounced PNP-dependent activity profile.

Collectively, these findings indicate that although *H. pylori* PNPase is not essential for viability, it represents a central regulatory node in RNA metabolism that governs stress response and adaptive phenotypes. Therefore, PNPase constitutes a rational and promising target for the development of novel antibacterial strategies.

Keywords: *Helicobacter pylori*, RNA degradosome, PNPase, RhpA, PapS

11. Bibliografia

- [1] B. J. Marshall i J. R. Warren, „UNIDENTIFIED CURVED BACILLI IN THE STOMACH OF PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCERATION”, *The Lancet*, t. 323, nr 8390, s. 1311–1315, cze. 1984, doi: 10.1016/S0140-6736(84)91816-6.
- [2] K. E. L. McColl, „Clinical practice. *H. pylori* infection”, *N. Engl. J. Med.*, t. 362, nr 17, s. 1597–604, kwi. 2010, doi: 10.1056/NEJMCP1001110.
- [3] J. Baj i in., „*H. pylori* Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment”, *Cells* 2021, Vol. 10, Page 27, t. 10, nr 1, s. 27, grudz. 2020, doi: 10.3390/CELLS10010027.
- [4] S. Ansari i Y. Yamaoka, „*H. pylori* Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity”, *Toxins (Basel)*, t. 11, nr 11, lis. 2019, doi: 10.3390/TOXINS11110677.
- [5] W. L. Chang, Y. C. Yeh, i B. S. Sheu, „The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases”, *J. Biomed. Sci.*, t. 25, nr 1, s. 1–9, wrz. 2018, doi: 10.1186/S12929-018-0466-9/TABLES/3.
- [6] N. R. Salama, M. L. Hartung, i A. Müller, „Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *H. pylori*”, *Nat. Rev. Microbiol.*, t. 11, nr 6, s. 385, cze. 2013, doi: 10.1038/NRMICRO3016.
- [7] K. Rudnicka, S. Backert, i M. Chmiela, „Genetic Polymorphisms in Inflammatory and Other Regulators in Gastric Cancer: Risks and Clinical Consequences”, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, t. 421, s. 53–76, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-15138-6_3.
- [8] J. Butt i M. Epplein, „*H. pylori* and colorectal cancer - A bacterium going abroad?”, *PLoS Pathog.*, t. 15, nr 8, 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1007861.
- [9] M. Plummer, S. Franceschi, J. Vignat, D. Forman, i C. De Martel, „Global burden of gastric cancer attributable to *H. pylori*”, *Int. J. Cancer*, t. 136, nr 2, s. 487–490, sty. 2015, doi: 10.1002/IJC.28999.
- [10] P. Rawla i A. Barsouk, „Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention”, *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, t. 14, nr 1, s. 26–38, 2018, doi: 10.5114/PG.2018.80001.
- [11] S. E. Crowe, „*H. pylori* Infection”, *N. Engl. J. Med.*, t. 380, nr 12, s. 1158–1165, mar. 2019, doi: 10.1056/NEJMCP1710945.
- [12] Y. Sato i in., „The Relationship Between Iron Deficiency in Patients with *H. pylori*-Infected Nodular Gastritis and the Serum Prohepcidin Level”, *Helicobacter*, t. 20, nr 1, s. 11–18, luty 2015, doi: 10.1111/HEL.12170.
- [13] X. J. Yu, X. Yang, L. Feng, L. L. Wang, i Q. J. Dong, „Association between *H. pylori* infection and angiographically demonstrated coronary artery disease: A meta-analysis”, *Exp. Ther. Med.*, t. 13, nr 2, s. 787–793, luty 2017, doi: 10.3892/ETM.2017.4028.
- [14] T. P. Chen i in., „*H. pylori* Infection is Positively Associated with Metabolic Syndrome in Taiwanese Adults: a Cross-Sectional Study”, *Helicobacter*, t. 20, nr 3, s. 184–191, cze. 2015, doi: 10.1111/HEL.12190.
- [15] A. Gajewski i in., „Accumulation of Deleterious Effects in Gastric Epithelial Cells and Vascular Endothelial Cells In Vitro in the Milieu of *H. pylori* Components, 7-Ketocholesterol and Acetylsalicylic Acid”, *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 6355, t. 23, nr 11, s. 6355, cze. 2022, doi: 10.3390/IJMS23116355.
- [16] W. Gonciarz i in., „The effect of *H. pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts”, *PLoS One*, t. 14, nr 8, s. e0220636, sie. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0220636.
- [17] T. Recheński i in., „Polymorphism of Interleukin-1 Gene Cluster in Polish Patients with Acute Coronary Syndrome”, *Journal of Clinical Medicine* 2021, Vol. 10, Page 990, t. 10, nr 5, s. 990, mar. 2021, doi: 10.3390/JCM10050990.
- [18] A. Krupa i in., „*H. pylori* Infection Acts Synergistically with a High-Fat Diet in the Development of a Proinflammatory and Potentially Proatherogenic Endothelial Cell Environment in an

- Experimental Model”, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3394, t. 22, nr 7, s. 3394, mar. 2021, doi: 10.3390/IJMS22073394.
- [19] A. Tomaszewska, W. Gonciarz, T. Rechcinski, M. Chmiela, A. K. Kurdowska, i A. Krupa, „*H. pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet”, *Scientific Reports* 2024 14:1, t. 14, nr 1, s. 1–15, mar. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-56308-7.
- [20] W. Gonciarz, A. Krupa, A. P. Moran, A. Tomaszewska, i M. Chmiela, „Interference of LPS *H. pylori* with IL-33-Driven Regeneration of *Caviae porcellus* Primary Gastric Epithelial Cells and Fibroblasts”, *Cells*, t. 10, nr 6, cze. 2021, doi: 10.3390/CELLS10061385.
- [21] K. Rudnicka i in., „Putative consequences of exposure to *H. pylori* infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation”, *Archives of Medical Science*, t. 12, nr 1, s. 45–54, luty 2016, doi: 10.5114/AOMS.2015.50772.
- [22] W. Gonciarz i in., „Antibodies towards TVLLPVIFF Amino Acid Sequence of TNF Receptor Induced by *H. pylori* in Patients with Coronary Heart Disease”, *J. Clin. Med.*, t. 11, nr 9, maj 2022, doi: 10.3390/JCM11092545.
- [23] P. Krzyżek i R. Grande, „Transformation of *H. pylori* into Coccoid Forms as a Challenge for Research Determining Activity of Antimicrobial Substances”, *Pathogens*, t. 9, nr 3, mar. 2020, doi: 10.3390/PATHOGENS9030184.
- [24] „[The determination of *C. pylori* in patients with gastroduodenal diseases] - PubMed”. Dostęp: 21 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1704468/>
- [25] J. O’Rourke i G. Bode, „Morphology and Ultrastructure”, *H. pylori*, s. 53–67, kwi. 2001, doi: 10.1128/9781555818005.ch6.
- [26] K. Rudnicka, M. Graczykowski, M. Tenderenda, i M. Chmiela, „*H. pylori* morphological forms and their potential role in the transmission of infection”, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, t. 68, s. 227–237, 2014, doi: 10.5604/17322693.1092705.
- [27] A. Muotiala, I. M. Helander, L. Pyhala, T. U. Kosunen, i A. P. Moran, „Low biological activity of *H. pylori* lipopolysaccharide”, *Infect. Immun.*, t. 60, nr 4, s. 1714–1716, 1992, doi: 10.1128/IAI.60.4.1714-1716.1992.
- [28] A. P. Moran, „The role of endotoxin in infection: *H. pylori* and *C. jejuni*”, *Subcell. Biochem.*, t. 53, s. 209–240, 2010, doi: 10.1007/978-90-481-9078-2_10.
- [29] M. Bie i in., „Phylogenetic analysis of clinical strains of *H. pylori* isolated from patients with gastric diseases in Tibet”, *Ann. Transl. Med.*, t. 7, nr 14, s. 320–320, lip. 2019, doi: 10.21037/ATM.2019.05.80.
- [30] A. Olofsson i in., „Biochemical and functional characterization of *H. pylori* vesicles”, *Mol. Microbiol.*, t. 77, nr 6, s. 1539, wrz. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2958.2010.07307.X.
- [31] G. R. Van Den Brink i in., „*H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach”, *Gut*, t. 46, nr 5, s. 601–607, maj 2000, doi: 10.1136/GUT.46.5.601.
- [32] S. Odenbreit, „Adherence properties of *H. pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host”, *Int. J. Med. Microbiol.*, t. 295, nr 5, s. 317–324, wrz. 2005, doi: 10.1016/J.IJMM.2005.06.003.
- [33] D. Doohan, Y. A. A. Rezkitha, L. A. Waskito, Y. Yamaoka, i M. Miftahussurur, „*H. pylori* BabA–SabA Key Roles in the Adherence Phase: The Synergic Mechanism for Successful Colonization and Disease Development”, *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 485, t. 13, nr 7, s. 485, lip. 2021, doi: 10.3390/TOXINS13070485.
- [34] N. Ishijima i in., „BabA-mediated adherence is a potentiator of the *H. pylori* type IV secretion system activity”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 286, nr 28, s. 25256–25264, lip. 2011, doi: 10.1074/JBC.M111.233601/ATTACHMENT/C19817C4-EA8B-40FD-8643-A23474415520/MMC1.PDF.
- [35] J. Mahdavi i in., „*H. pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation”, *Science*, t. 297, nr 5581, s. 573–578, lip. 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1069076.
- [36] S. Lindén i in., „Role of ABO Secretor Status in Mucosal Innate Immunity and *H. pylori* Infection”, *PLoS Pathog.*, t. 4, nr 1, s. e2, sty. 2008, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.0040002.

- [37] W. Gonciarz, M. Chyb, i M. Chmiela, „Diminishing of *H. pylori* adhesion to Cavia porcellus gastric epithelial cells by BCG vaccine mycobacteria”, *Scientific Reports* 2023 13:1, t. 13, nr 1, s. 1–11, wrz. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-43571-3.
- [38] T. L. Cover, P. Cao, C. D. Lind, K. T. Tham, i M. J. Blaser, „Correlation between vacuolating cytotoxin production by *H. pylori* isolates in vitro and in vivo”, *Infect. Immun.*, t. 61, nr 12, s. 5008–5012, 1993, doi: 10.1128/iai.61.12.5008-5012.1993.
- [39] Y. Huang, Q. L. Wang, D. D. Cheng, W. T. Xu, i N. H. Lu, „Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *H. pylori*”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 6, nr NOV, lis. 2016, doi: 10.3389/FCIMB.2016.00159.
- [40] J. C. Atherton, P. Cao, R. M. Peek, M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser, i T. L. Cover, „Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *H. pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration”, *J. Biol. Chem.*, t. 270, nr 30, s. 17771–17777, lip. 1995, doi: 10.1074/JBC.270.30.17771.
- [41] A. Covacci i in., „Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *H. pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 90, nr 12, s. 5791–5795, cze. 1993, doi: 10.1073/PNAS.90.12.5791.
- [42] B. Paziak-Domańska, M. Chmiela, A. Jarońska, i W. Rudnicka, „Potential Role of CagA in the Inhibition of T Cell Reactivity in *H. pylori* Infections”, *Cell. Immunol.*, t. 202, nr 2, s. 136–139, cze. 2000, doi: 10.1006/CIMM.2000.1654.
- [43] „*H. pylori* lipopolysaccharide activity in human peripheral blood mononuclear leukocyte cultures - PubMed”. Dostęp: 21 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20814071/>
- [44] M. M. D’Elios, A. Amedei, A. Cappon, G. Del Prete, i M. De Bernard, „The neutrophil-activating protein of *H. pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, t. 50, nr 2, s. 157–164, lip. 2007, doi: 10.1111/J.1574-695X.2007.00258.X.
- [45] Y. Huang, Q. L. Wang, D. D. Cheng, W. T. Xu, i N. H. Lu, „Adhesion and invasion of gastric mucosa epithelial cells by *H. pylori*”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 6, nr NOV, s. 227385, lis. 2016, doi: 10.3389/FCIMB.2016.00159/BIBTEX.
- [46] E. Mnich i in., „Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *H. pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion”, *Acta Biochim. Pol.*, t. 62, nr 4, s. 641–650, 2015, doi: 10.18388/ABP.2015_1045.
- [47] M. Hatakeyama, „Structure and function of *H. pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer”, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, t. 93, nr 4, s. 196–219, 2017, doi: 10.2183/PJAB.93.013.
- [48] J. Zabaleta i in., „*H. pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta)”, *J. Immunol.*, t. 173, nr 1, s. 586–593, lip. 2004, doi: 10.4049/JIMMUNOL.173.1.586.
- [49] M. Chmiela, E. Czkwianianc, T. Wadstrom, i W. Rudnicka, „Role of *H. pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages.”, *Gut*, t. 40, nr 1, s. 20–24, sty. 1997, doi: 10.1136/GUT.40.1.20.
- [50] Grebowska A i Moran AP, „Anti-phagocytic activity of *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS)--possible modulation of the innate immune response to these bacteria - PubMed”, *J Microbiol.*, nr 57, s. 185–192, 2008, Dostęp: 21 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19004238/>
- [51] L. A. H. Allen, L. S. Schlesinger, i B. Kang, „Virulent strains of *H. pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages”, *J. Exp. Med.*, t. 191, nr 1, s. 115–127, sty. 2000, doi: 10.1084/JEM.191.1.115.
- [52] K. Rudnicka i in., „*H. pylori* antigens as potential modulators of lymphocytes’ cytotoxic activity”, *Microbiol. Immunol.*, t. 56, nr 1, s. 62–75, sty. 2012, doi: 10.1111/J.1348-0421.2011.00399.X.
- [53] M. Chmiela i in., „Anti-Lewis X antibody and Lewis X–anti-Lewis X immune complexes in *H. pylori* infection”, *Immunol. Lett.*, t. 61, nr 2–3, s. 119–125, kwi. 1998, doi: 10.1016/S0165-2478(98)00004-2.

- [54] A. Matusiak *i in.*, „Putative consequences of exposure to *H. pylori* infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation”, *Arch. Med. Sci.*, t. 12, nr 1, s. 45, luty 2016, doi: 10.5114/AOMS.2015.50772.
- [55] B. Linz *i in.*, „A mutation burst during the acute phase of *H. pylori* infection in humans and rhesus macaques”, *Nature Communications* 2014 5:1, t. 5, nr 1, s. 1–8, cze. 2014, doi: 10.1038/ncomms5165.
- [56] L. Kennemann *i in.*, „*H. pylori* genome evolution during human infection”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 108, nr 12, s. 5033–5038, mar. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1018444108/SUPPL_FILE/SAPP.PDF.
- [57] B. J. Appelmek *i in.*, „Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *H. pylori* lipopolysaccharide”, *Infect. Immun.*, t. 68, nr 10, s. 5928–5932, 2000, doi: 10.1128/IAI.68.10.5928-5932.2000/ASSET/0EF3425D-AB28-404D-BD0D-9E1E21C48FA3/ASSETS/GRAPHIC/II1000574001.JPEG.
- [58] M. El Khadir *i in.*, „VacA genotypes and cagA-EPIYA-C motifs of *H. pylori* and gastric histopathological lesions”, *Int. J. Cancer*, t. 147, nr 11, s. 3206–3214, grudz. 2020, doi: 10.1002/IJC.33158.
- [59] C. A. Fallone *i in.*, „The Toronto Consensus for the Treatment of *H. pylori* Infection in Adults”, *Gastroenterology*, t. 151, nr 1, s. 51-69.e14, lip. 2016, doi: 10.1053/J.GASTRO.2016.04.006.
- [60] A. K. Kamboj, T. G. Cotter, i A. S. Oxentenko, „*H. pylori*: The Past, Present, and Future in Management.”, *Mayo Clin. Proc.*, t. 92, nr 4, s. 599–604, luty 2017, doi: 10.1016/J.MAYOCP.2016.11.017.
- [61] W. Fischbach i P. Malfertheiner, „*H. pylori* Infection”, *Dtsch. Arztebl. Int.*, t. 115, nr 25, s. 429–436, cze. 2018, doi: 10.3238/ARZTEBL.2018.0429.
- [62] Y. C. Lee, M. P. Dore, i D. Y. Graham, „Diagnosis and Treatment of *H. pylori* Infection”, *Annu. Rev. Med.*, t. 73, nr Volume 73, 2022, s. 183–195, sty. 2022, doi: 10.1146/ANNUREV-MED-042220-020814/CITE/REFWORKS.
- [63] L. Charach *i in.*, „Comparison of Four Tests for the Diagnosis of *H. pylori* Infection”, *Healthcare*, t. 12, nr 15, s. 1479, sie. 2024, doi: 10.3390/HEALTHCARE12151479.
- [64] M. B. M. L. Reynders *i in.*, „Performance of individual *H. pylori* antigens in the immunoblot-based detection of *H. pylori* infection”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, t. 64, nr 3, s. 352–363, kwi. 2012, doi: 10.1111/J.1574-695X.2011.00920.X.
- [65] „Przewodnik antybiotykoterapii 2025”. Dostęp: 11 luty 2025. [Online]. Dostępne na: <https://alfamedica.pl/przewodnik-antybiotykoterapii-2025-p-138.html>
- [66] „Sanford Guide | Antimicrobial Stewardship”. Dostęp: 7 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://www.sanfordguide.com/>
- [67] D. Y. Graham i M. P. Dore, „*H. pylori* therapy: a paradigm shift”, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, t. 14, nr 6, s. 577–585, cze. 2016, doi: 10.1080/14787210.2016.1178065.
- [68] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, D. Kattula, i F. Burkert, „GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS”, Dostęp: 11 luty 2025. [Online]. Dostępne na: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- [69] D. Y. Graham, „Transitioning of *H. pylori* Therapy from Trial and Error to Antimicrobial Stewardship”, *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 671, t. 9, nr 10, s. 671, paź. 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9100671.
- [70] R. Horie *i in.*, „*H. pylori* eradication therapy outcome according to clarithromycin susceptibility testing in Japan”, *Helicobacter*, t. 25, nr 4, s. e12698, sie. 2020, doi: 10.1111/HEL.12698.
- [71] T. Rokkas *i in.*, „Comparative Effectiveness of Multiple Different First-Line Treatment Regimens for *H. pylori* Infection: A Network Meta-analysis”, *Gastroenterology*, t. 161, nr 2, s. 495-507.e4, sie. 2021, doi: 10.1053/J.GASTRO.2021.04.012/ASSET/961E5726-03E9-4BD4-908E-CEFE536D3849/MAIN.ASSETS/FX2.JPG.

- [72] S. G. Lim i in., „The relationship between the failure to eradicate *H. pylori* and previous antibiotics use”, *Digestive and Liver Disease*, t. 48, nr 4, s. 385–390, kwi. 2016, doi: 10.1016/j.dld.2015.12.001.
- [73] D. Boltin i in., „Impact of Previous Exposure to Macrolide Antibiotics on *H. pylori* Infection Treatment Outcomes”, *American Journal of Gastroenterology*, t. 114, nr 6, s. 900–906, cze. 2019, doi: 10.14309/AJG.0000000000000223.
- [74] S. Suzuki, M. Esaki, C. Kusano, H. Ikehara, i T. Gotoda, „Development of *H. pylori* treatment: How do we manage antimicrobial resistance?”, <http://www.wjgnet.com/>, t. 25, nr 16, s. 1907–1912, 2019, doi: 10.3748/WJG.V25.I16.1907.
- [75] W. Gonciarz, E. Piątczak, P. Płoszaj, G. Gościński, i M. Chmiela, „Salvia cadmica extracts rich in polyphenols neutralize a deleterious effects of oxidative stress driven by *H. pylori* lipopolysaccharide in cell cultures of gastric epithelial cells or fibroblasts”, *Ind. Crops Prod.*, t. 178, s. 114633, kwi. 2022, doi: 10.1016/J.INDCROP.2022.114633.
- [76] X. Bai, M. Zhu, Y. He, T. Wang, D. Tian, i J. Shu, „The impacts of probiotics in eradication therapy of *H. pylori*”, *Arch. Microbiol.*, t. 204, nr 12, grudz. 2022, doi: 10.1007/S00203-022-03314-W.
- [77] M. M. Urbaniak, M. Gazińska, K. Rudnicka, P. Płociński, M. Nowak, i M. Chmiela, „In Vitro and In Vivo Biocompatibility of Natural and Synthetic Pseudomonas aeruginosa Pyomelanin for Potential Biomedical Applications”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 24, nr 9, maj 2023, doi: 10.3390/IJMS24097846.
- [78] W. Gonciarz, M. Chyb, i M. Chmiela, „Mycobacterium bovis BCG increase the selected determinants of monocyte/macrophage activity, which were diminished in response to gastric pathogen *H. pylori*”, *Sci. Rep.*, t. 13, nr 1, grudz. 2023, doi: 10.1038/S41598-023-30250-6.
- [79] J.-F. Tomb i in., „The complete genome sequence of the gastric pathogen *H. pylori*”, *Natur*, t. 388, nr 6642, s. 539–547, 1997, doi: 10.1038/41483.
- [80] R. A. Alm i in., „Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *H. pylori*”, *Nature* 1999 397:6715, t. 397, nr 6715, s. 176–180, sty. 1999, doi: 10.1038/16495.
- [81] „Announcing the re-annotation of RefSeq genome assemblies for *E. coli* and four other species! - NCBI Insights”. Dostęp: 5 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/06/23/re-annotation-refseq-genome-assemblies/>
- [82] X. Didelot, S. Nell, I. Yang, S. Woltemate, S. Van Der Merwe, i S. Suerbaum, „Genomic evolution and transmission of *H. pylori* in two South African families”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 110, nr 34, s. 13880–13885, sie. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1304681110/SUPPL_FILE/ST05.DOC.
- [83] Q. Cao i in., „Progressive genomic convergence of two *H. pylori* strains during mixed infection of a patient with chronic gastritis”, *Gut*, t. 64, nr 4, s. 554–561, kwi. 2015, doi: 10.1136/GUTJNL-2014-307345.
- [84] X. Didelot, R. Bowden, D. J. Wilson, T. E. A. Peto, i D. W. Crook, „Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing”, *Nat. Rev. Genet.*, t. 13, nr 9, s. 601, wrz. 2012, doi: 10.1038/NRG3226.
- [85] W. Fischer, U. Breithaupt, B. Kern, S. I. Smith, C. Spicher, i R. Haas, „A comprehensive analysis of *H. pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity”, *BMC Genomics*, t. 15, nr 1, s. 1–17, kwi. 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-310/FIGURES/6.
- [86] B. Linz i S. C. Schuster, „Genomic diversity in Helicobacter and related organisms”, *Res. Microbiol.*, t. 158, nr 10, s. 737–744, grudz. 2007, doi: 10.1016/J.RESMIC.2007.09.006.
- [87] M. Slatkin, „Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future”, *Nature Reviews Genetics* 2008 9:6, t. 9, nr 6, s. 477–485, cze. 2008, doi: 10.1038/nrg2361.
- [88] C. Yang, Y. Cui, X. Didelot, R. Yang, i D. Falush, „Why panmictic bacteria are rare”, *bioRxiv*, sie. 2018, doi: 10.1101/385336.

- [89] A. Burger, C. Whiteley, i A. Boshoff, „Current perspectives of the *E. coli* RNA degradosome”, *Biotechnol. Lett.*, t. 33, nr 12, s. 2337–2350, grudz. 2011, doi: 10.1007/S10529-011-0713-6/FIGURES/3.
- [90] T. Dendooven i in., „Multi-scale ensemble properties of the *E. coli* RNA degradosome”, *Mol. Microbiol.*, t. 117, nr 1, s. 102–120, sty. 2022, doi: 10.1111/MMI.14800.
- [91] M. P. Deutscher, „Regulation of Bacterial Ribonucleases”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 75, s. 71–86, 2021, doi: 10.1146/ANNUREV-MICRO-020121-011201.
- [92] P. Mitchell, E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, i D. Tollervey, „The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases”, *Cell*, t. 91, nr 4, s. 457–466, lis. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80432-8.
- [93] S. Ait-Bara i A. J. Carpousis, „RNA degradosomes in bacteria and chloroplasts: classification, distribution and evolution of RNase E homologs”, *Mol. Microbiol.*, t. 97, nr 6, s. 1021–1135, wrz. 2015, doi: 10.1111/MMI.13095.
- [94] K. J. Bandyra i B. F. Luisi, „RNase E and the High-Fidelity Orchestration of RNA Metabolism”, *Microbiol. Spectr.*, t. 6, nr 2, kwi. 2018, doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.RWR-0008-2017.
- [95] T. Dendooven, B. F. Luisi, i K. J. Bandyra, „RNA lifetime control, from stereochemistry to gene expression”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, t. 61, s. 59–70, kwi. 2020, doi: 10.1016/J.SBI.2019.10.002.
- [96] B. Felden i L. Paillard, „When eukaryotes and prokaryotes look alike: the case of regulatory RNAs”, *FEMS Microbiol. Rev.*, t. 41, nr 5, s. 624–639, wrz. 2017, doi: 10.1093/FEMSRE/FUX038.
- [97] C. M. Roux, J. P. DeMuth, i P. M. Dunman, „Characterization of components of the *Staphylococcus aureus* mRNA degradosome holoenzyme-like complex”, *J. Bacteriol.*, t. 193, nr 19, s. 5520–5526, paź. 2011, doi: 10.1128/JB.05485-11.
- [98] A. Van den Bossche i in., „Structural elucidation of a novel mechanism for the bacteriophage-based inhibition of the RNA degradosome”, *Elife*, t. 5, nr JULY, lip. 2016, doi: 10.7554/ELIFE.16413.
- [99] P. Płociński i in., „Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of *M. tuberculosis*”, *Nucleic Acids Res.*, t. 47, nr 11, s. 5892–5905, cze. 2019, doi: 10.1093/NAR/GKZ251.
- [100] Y. Redko i in., „A minimal bacterial RNase J-based degradosome is associated with translating ribosomes”, *Nucleic Acids Res.*, t. 41, nr 1, s. 288–301, sty. 2013, doi: 10.1093/NAR/GKS945.
- [101] A. J. Carpousis, „The RNA degradosome of *E. coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 61, nr Volume 61, 2007, s. 71–87, paź. 2007, doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093440/CITE/REFWORKS.
- [102] M. Y. Tsao, T. L. Lin, P. F. Hsieh, i J. T. Wang, „The 3'-to-5' Exoribonuclease (Encoded by HP1248) of *H. pylori* Regulates Motility and Apoptosis-Inducing Genes”, *J. Bacteriol.*, t. 191, nr 8, s. 2691, kwi. 2009, doi: 10.1128/JB.01182-08.
- [103] Y. Redko i in., „A minimal bacterial RNase J-based degradosome is associated with translating ribosomes”, *Nucleic Acids Res.*, t. 41, nr 1, s. 288–301, sty. 2013, doi: 10.1093/NAR/GKS945.
- [104] L. El Mortaji i in., „The Sole DEAD-Box RNA helicase of the gastric pathogen *H. pylori* Is essential for colonization”, *mBio*, t. 9, nr 2, mar. 2018, doi: 10.1128/MBIO.02071-17.
- [105] A. Tejada-Arranz i in., „Acetylation regulates the oligomerization state and activity of RNase J, the *H. pylori* major ribonuclease”, *Nature Communications* 2023 14:1, t. 14, nr 1, s. 1–15, grudz. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-43825-8.
- [106] G. W. Owttrim, „RNA helicases: Diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress”, *RNA Biol.*, t. 10, nr 1, s. 96, 2013, doi: 10.4161/RNA.22638.
- [107] L. El Mortaji i in., „The Sole DEAD-Box RNA Helicase of the Gastric Pathogen *H. pylori* Is Essential for Colonization”, *mBio*, t. 9, nr 2, s. e02071-17, mar. 2018, doi: 10.1128/MBIO.02071-17.
- [108] N. Haddad i in., „The RNase R from *C. jejuni* has unique features and is involved in the first steps of infection”, *J. Biol. Chem.*, t. 289, nr 40, s. 27814–27824, paź. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.561795.

- [109] F. D'Agostino, E. Pinatel, A. Meynhardt, V. Scarlato, A. Vannini, i D. Roncarati, „RNase Y mediates posttranscriptional control of the virulence-associated CncR1 small-RNA in *H. pylori*”, *iScience*, t. 28, nr 2, s. 111815, luty 2025, doi: 10.1016/J.ISCI.2025.111815.
- [110] F. Combes, T. H. Bui, F. J. Pettersson, i S. Hak, „Rapid and scalable detection of synthetic mRNA byproducts using polynucleotide phosphorylase and polythymidine oligonucleotides”, *RNA Biol.*, t. 21, nr 1, s. 1, 2024, doi: 10.1080/15476286.2024.2363029.
- [111] Z. Shi, W. Z. Yang, S. Lin-Chao, K. F. Chak, i H. S. Yuan, „Crystal structure of *E. coli* PNPase: Central channel residues are involved in processive RNA degradation”, *RNA*, t. 14, nr 11, s. 2361–2371, lis. 2008, doi: 10.1261/RNA.1244308.
- [112] J. A. Rosenzweig i A. K. Chopra, „The exoribonuclease polynucleotide phosphorylase influences the virulence and stress responses of yersiniae and many other pathogens”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 4, nr NOV, s. 61745, lis. 2013, doi: 10.3389/FCIMB.2013.00081/BIBTEX.
- [113] J. Wu i in., „Polynucleotide Phosphorylase Protects *E. coli* against Oxidative Stress”, *Biochemistry*, t. 48, nr 9, s. 2012, mar. 2009, doi: 10.1021/BI801752P.
- [114] N. Haddad i in., „Polynucleotide phosphorylase has an impact on cell biology of *C. jejuni*”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 2, s. 30, 2012, doi: 10.3389/FCIMB.2012.00030.
- [115] F. D'Agostino, E. Pinatel, A. Meynhardt, V. Scarlato, A. Vannini, i D. Roncarati, „RNase Y mediates posttranscriptional control of the virulence-associated CncR1 small-RNA in *H. pylori*”, *iScience*, t. 28, nr 2, luty 2025, doi: 10.1016/J.ISCI.2025.111815.
- [116] A. Tejada-Arranz i in., „RNase R is associated in a functional complex with the RhpA DEAD-box RNA helicase in *H. pylori*”, *Nucleic Acids Res.*, t. 49, nr 9, s. 5249, maj 2021, doi: 10.1093/NAR/GKAB283.
- [117] Y. Redko i in., „A minimal bacterial RNase J-based degradosome is associated with translating ribosomes”, *Nucleic Acids Res.*, t. 41, nr 1, s. 288, sty. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKS945.
- [118] A. J. Carpousis, „The RNA degradosome of *E. coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 61, s. 71–87, 2007, doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093440.
- [119] K. H. Cho, „The structure and function of the gram-positive bacterial RNA degradosome”, *Front. Microbiol.*, t. 8, nr FEB, s. 249687, luty 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.00154/BIBTEX.
- [120] A. Trinquier, S. Durand, F. Braun, i C. Condon, „Regulation of RNA processing and degradation in bacteria”, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, t. 1863, nr 5, maj 2020, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2020.194505.
- [121] E. Lorentzen, J. Basquin, i E. Conti, „Structural organization of the RNA-degrading exosome”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, t. 18, nr 6, s. 709–713, grudz. 2008, doi: 10.1016/J.SBI.2008.10.004.
- [122] A. Tejada-Arranz, E. Galtier, L. El Mortaji, E. Turlin, D. Ershov, i H. De Reuse, „The RNase J-Based RNA Degradosome Is Compartmentalized in the Gastric Pathogen *H. pylori*”, *mBio*, t. 11, nr 5, paź. 2020, doi: 10.1128/MBIO.01173-20.
- [123] C. Bárria i in., „Structure and function of *C. jejuni* polynucleotide phosphorylase (PNPase): Insights into the role of this RNase in pathogenicity”, *Biochimie*, t. 216, s. 56–70, sty. 2024, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2023.10.006.
- [124] A. Tejada-Arranz i in., „RNase R is associated in a functional complex with the RhpA DEAD-box RNA helicase in *H. pylori*”, *Nucleic Acids Res.*, t. 49, nr 9, s. 5249–5264, maj 2021, doi: 10.1093/NAR/GKAB283.
- [125] M. P. Deutscher, „Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA”, *Nucleic Acids Res.*, t. 34, nr 2, s. 659–666, sty. 2006, doi: 10.1093/NAR/GKJ472.
- [126] K. Tomita i S. Yamashita, „Molecular mechanisms of template-independent RNA polymerization by tRNA nucleotidyltransferases”, *Front. Genet.*, t. 5, nr FEB, s. 81062, luty 2014, doi: 10.3389/FGENE.2014.00036/BIBTEX.
- [127] P.-Y. Shi, N. Maizels, i A. M. Weiner, „CCA addition by tRNA nucleotidyltransferase: polymerization without translocation?”, *EMBO J.*, t. 17, nr 11, s. 3197–3206, 1998.

- [128] L. C. Raynal, H. M. Krisch, i A. J. Carpousis, „The *B. subtilis* Nucleotidyltransferase Is a tRNA CCA-Adding Enzyme”, *J. Bacteriol.*, t. 180, nr 23, s. 6276, grudz. 1998, doi: 10.1128/JB.180.23.6276-6282.1998.
- [129] E. Błaszczyk i in., „Depletion of tRNA CCA-adding enzyme in *M. tuberculosis* leads to polyadenylation of transcripts and precursor tRNAs”, *Scientific Reports* 2023 13:1, t. 13, nr 1, s. 1–12, lis. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-47944-6.
- [130] P. Régnier i P. E. Marujo, „Polyadenylation and Degradation of RNA in Prokaryotes”, 2013, Dostęp: 12 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6253/>
- [131] L. C. Raynal i A. J. Carpousis, „Poly(A) polymerase I of *E. coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation”, *Mol. Microbiol.*, t. 32, nr 4, s. 765–775, 1999, doi: 10.1046/J.1365-2958.1999.01394.X.
- [132] N. Sharma, M. Anleu Gil, i D. Wengier, „A Quick and Easy Method for Making Competent *E. coli* Cells for Transformation Using Rubidium Chloride”, *Bio. Protoc.*, t. 7, nr 21, 2017, doi: 10.21769/BIOPROTOCOL.2590.
- [133] F. Sanger, S. Nicklen, i A. R. Coulson, „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 74, nr 12, s. 5463–5467, 1977, doi: 10.1073/PNAS.74.12.5463.
- [134] E. Gavrish i in., „In vitro and in vivo activities of hpi1, a selective antimicrobial against *H. pylori*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, t. 58, nr 6, s. 3255–3260, 2014, doi: 10.1128/AAC.02573-13/ASSET/F3718179-B31D-41E2-A2AE-D34EB3D9642F/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0061429330004.JPEG.
- [135] M. G. Rudolph i D. Klostermeier, „When core competence is not enough: Functional interplay of the DEAD-box helicase core with ancillary domains and auxiliary factors in RNA binding and unwinding”, *Biol. Chem.*, t. 396, nr 8, s. 849–865, sie. 2015, doi: 10.1515/HSZ-2014-0277/PDF.
- [136] A. R. De, L. Faverie, A. Guédin, A. Bedrat, L. A. Yatsunyk, i J.-L. Mergny, „Thioflavin T As A Fluorescence Light-Up Probe For G4 Formation”, 2014, doi: 10.1093/nar/gku111.
- [137] A. Neuenfeldt, A. Just, H. Betat, i M. Mörl, „Evolution of tRNA nucleotidyltransferases: a small deletion generated CC-adding enzymes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 105, nr 23, s. 7953–7958, cze. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0801971105.
- [138] D. A. Vargas-Blanco i S. S. Shell, „Regulation of mRNA Stability During Bacterial Stress Responses”, *Front. Microbiol.*, t. 11, s. 566724, wrz. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2020.02111/FULL.
- [139] A. J. Carpousis, „The RNA degradosome of *E. coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 61, s. 71–87, 2007, doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093440.
- [140] M. Lehnik-Habrink i in., „RNase Y in *B. subtilis*: a Natively disordered protein that is the functional equivalent of RNase E from *E. coli*”, *J. Bacteriol.*, t. 193, nr 19, s. 5431–5441, paź. 2011, doi: 10.1128/JB.05500-11.
- [141] A. Tejada-Arranz i H. De Reuse, „Riboregulation in the Major Gastric Pathogen *H. pylori*”, *Front. Microbiol.*, t. 12, s. 712804, lip. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.712804/BIBTEX.
- [142] Y. Redko i in., „A minimal bacterial RNase J-based degradosome is associated with translating ribosomes”, *Nucleic Acids Res.*, t. 41, nr 1, s. 288–301, sty. 2013, doi: 10.1093/NAR/GKS945.
- [143] N. Wang, Y. Sheng, Y. Liu, Y. Guo, J. He, i J. Liu, „Cryo-EM structures of *M. tuberculosis* polynucleotide phosphorylase suggest a potential mechanism for its RNA substrate degradation”, *Arch. Biochem. Biophys.*, t. 754, kwi. 2024, doi: 10.1016/J.ABB.2024.109917.
- [144] Z. Shi, W. Z. Yang, S. Lin-Chao, K. F. Chak, i H. S. Yuan, „Crystal structure of *E. coli* PNPase: Central channel residues are involved in processive RNA degradation”, *RNA*, t. 14, nr 11, s. 2361–2371, lis. 2008, doi: 10.1261/RNA.1244308.
- [145] S. Yehudai-Resheff i G. Schuster, „Characterization of the *E. coli* poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence”, *Nucleic Acids Res.*, t. 28, nr 5, s. 1139–1144, mar. 2000, doi: 10.1093/NAR/28.5.1139.

- [146] Y. T. Tseng, N. T. Chiou, R. Gogiraju, i S. Lin-Chao, „The Protein Interaction of RNA Helicase B (RhlB) and Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) Contributes to the Homeostatic Control of Cysteine in *E. coli*.”, *J. Biol. Chem.*, t. 290, nr 50, s. 29953–29963, paź. 2015, doi: 10.1074/JBC.M115.691881.
- [147] G. Martin i W. Keller, „RNA-specific ribonucleotidyl transferases”, *RNA*, t. 13, nr 11, s. 1834–1849, lis. 2007, doi: 10.1261/RNA.652807.
- [148] B. K. Mohanty i S. R. Kushner, „Bacterial/archaeal/organellar polyadenylation”, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, t. 2, nr 2, s. 256–276, mar. 2011, doi: 10.1002/WRNA.51.
- [149] J. A. R. Worrall, F. S. Howe, A. R. McKay, C. V. Robinson, i B. F. Luisi, „Allosteric activation of the ATPase activity of the *E. coli* RhlB RNA helicase”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 283, nr 9, s. 5567–5576, luty 2008, doi: 10.1074/jbc.M708620200.
- [150] A. J. Carpousis, „The RNA degradosome of *E. coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 61, nr Volume 61, 2007, s. 71–87, paź. 2007, doi: 10.1146/ANNUREV.MICRO.61.080706.093440/CITE/REFWORKS.
- [151] A. Just, F. Butter, M. Trenkmann, T. Heitkam, M. Mörl, i H. Betat, „A comparative analysis of two conserved motifs in bacterial poly(A) polymerase and CCA-adding enzyme”, *Nucleic Acids Res.*, t. 36, nr 16, s. 5212–5220, wrz. 2008, doi: 10.1093/NAR/GKN494.
- [152] D. D. H. Wang, X. E. Guo, A. S. Modrek, C. F. Chen, P. L. Chen, i W. H. Lee, „Helicase SUV3, polynucleotide phosphorylase, and mitochondrial polyadenylation polymerase form a transient complex to modulate mitochondrial mRNA polyadenylated tail lengths in response to energetic changes”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 289, nr 24, s. 16727–16735, cze. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.536540.
- [153] G. Santonoceto, A. Jurkiewicz, i R. J. Szczesny, „RNA degradation in human mitochondria: the journey is not finished”, *Hum. Mol. Genet.*, t. 33, nr R1, s. R26–R33, maj 2024, doi: 10.1093/HMG/DDAE043.
- [154] J. LaCava i in., „RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex”, *Cell*, t. 121, nr 5, s. 713–724, cze. 2005, doi: 10.1016/J.CELL.2005.04.029.
- [155] M. Folichon, F. Allemand, P. Régnier, i E. Hajnsdorf, „Stimulation of poly(A) synthesis by *E. coli* poly(A)polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails.”, *FEBS J.*, t. 272, nr 2, s. 454–463, sty. 2005, doi: 10.1111/J.1742-4658.2004.04485.X.
- [156] „Goodman & Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 14th Edition | AccessMedicine | McGraw Hill Medical”. Dostęp: 26 styczeń 2026. [Online]. Dostępne na: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=3191>
- [157] L. ; Kime i in., „The first small-molecule inhibitors of members of the ribonuclease E family”, doi: 10.1038/srep08028.
- [158] R. G. Matos, K. J. Simmons, C. W. G. Fishwick, K. J. McDowall, i C. M. Arraiano, „Identification of Ribonuclease Inhibitors for the Control of Pathogenic Bacteria”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 25, nr 15, s. 8048, sie. 2024, doi: 10.3390/IJMS25158048/S1.
- [159] N. Wu i in., „Polynucleotide Phosphorylase Mediates a New Mechanism of Persister Formation in *E. coli*”, *Microbiol. Spectr.*, t. 11, nr 1, luty 2023, doi: 10.1128/SPECTRUM.01546-22;CTYPE:STRING:JOURNAL.
- [160] L. He i in., „Pyrazinoic Acid Inhibits the Bifunctional Enzyme (Rv2783) in *M. tuberculosis* by Competing with tmRNA”, *Pathogens*, t. 8, nr 4, grudz. 2019, doi: 10.3390/PATHOGENS8040230.
- [161] N. Wang, Y. Sheng, Y. Liu, Y. Guo, J. He, i J. Liu, „Cryo-EM structures of *M. tuberculosis* polynucleotide phosphorylase suggest a potential mechanism for its RNA substrate degradation”, *Arch. Biochem. Biophys.*, t. 754, kwi. 2024, doi: 10.1016/J.ABB.2024.109917.
- [162] L. K. Jaiswal i in., „A comparative analysis of mycobacterial ribonucleases: Towards a therapeutic novel drug target”, *Infection, Genetics and Evolution*, t. 123, s. 105645, wrz. 2024, doi: 10.1016/J.MEEGID.2024.105645.