

Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

Katedra Mikrobiologii



Rozprawa doktorska

**Charakterystyka molekularna białek SSB mikroorganizmów psychrofilnych**

mgr inż. Marta Nowak

Promotor: prof. dr hab. Józef Kur

Promotor pomocniczy: dr inż. Marcin Olszewski

Gdańsk 2013

*Składam serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. Józefowi Kur  
za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie oraz przekazaną wiedzę.*

*Serdecznie dziękuję Panu dr inż. Marcinowi Olszewskiemu  
za życzliwość, nieocenioną pomoc i poświęcony czas.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom oraz Koleżankom i Kolegom  
z Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej  
za niezwykłą atmosferę i uśmiech.*

*Dziękuję mojej Rodzinie za wsparcie i wiarę we mnie.*

## SPIS TREŚCI

1. Cel pracy .....	6
2. Streszczenie .....	7
3. Abstract .....	9
4. Wstęp .....	11
4.1 Charakterystyka bakterii psychrofilnych .....	11
4.1.1 Charakterystyka <i>Desulfotalea psychrophila</i> .....	13
4.1.2 Charakterystyka <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	14
4.1.3 Charakterystyka <i>Psychrobacter arcticus</i> i <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> .....	15
4.1.4 Charakterystyka <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> .....	15
4.1.5 Charakterystyka <i>Psychromonas ingrahamii</i> .....	16
4.1.6 Charakterystyka <i>Photobacterium profundum</i> .....	17
4.1.7 Charakterystyka <i>Psychroflexus torquis</i> .....	17
4.2 Adaptacje drobnoustrojów psychrofilnych do niskich temperatur .....	18
4.2.1 Modyfikacje lipidów błonowych.....	18
4.2.2 Specyficzne białka wytwarzane przez drobnoustroje psychrofilne.....	19
4.2.3 Adaptacje białek i enzymów do działania w niskiej temperaturze .....	20
4.3 Białka SSB .....	25
4.4 Budowa białek SSB .....	26
4.4.1 Homotetrameryczne białka SSB .....	26
4.4.2 Homodimeryczne białka SSB .....	28
4.4.3 Heterotrimeryczne białka SSB .....	30
4.5 Mechanizm wiązania białek SSB do ssDNA .....	31
4.6 Funkcje białek SSB .....	34
4.6.1 Rola białek SSB w replikacji DNA .....	34
4.6.2 Rola białek SSB w rekombinacji DNA.....	38
4.6.3 Rola białek SSB w naprawie DNA.....	42
4.7 Lokalizacja genów kodujących białka SSB .....	45
4.8 Zastosowanie białek SSB .....	47
5. Materiały .....	51
5.1 Materiały podstawowe i aparatura.....	51
5.2 Szczepy bakteryjne .....	52
5.3 Podłoża bakteriologiczne i dodatkowe składniki podłoż .....	52
5.4 Podstawowe odczynniki chemiczne.....	53
5.5 DNA plazmidowe .....	54
5.6 Odczynniki do reakcji PCR .....	54
5.7 Enzymy restrykcyjne i bufory do trawienia .....	55
5.8 Odczynniki do reakcji ligacji .....	56
5.9 Odczynniki, bufory i roztwory do rozdziału DNA za pomocą elektroforezy agarozowej	56
5.10 Odczynniki, bufory i roztwory do rozdziału białek za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz barwienia .....	56
5.11 Markery wielkości .....	57
5.12 Roztwory i bufory stosowane do oczyszczania białek i regeneracji żłóż.....	58
5.13 Odczynniki do ultrawirowania.....	58

5.14	Odczynniki do sieciowania białek.....	58
5.15	Bufory i odczynniki stosowane do badania opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA i spektrofluorymetrycznego badania aktywności białek SSB .....	59
5.16	Odczynniki do badania zdolności białek SSB do destabilizacji dsDNA .....	59
6.	Metody .....	60
6.1	Hodowle bakteryjne .....	60
6.1.1	Hodowle płynne.....	60
6.1.2	Hodowle na podłożu stałym .....	60
6.2	Izolacja DNA genomowego z hodowli bakteryjnej.....	60
6.3	Izolacja DNA plazmidowego .....	60
6.4	Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego .....	60
6.5	Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych.....	61
6.6	Elektroforeza agarozowa.....	61
6.7	Amplifikacja genów <i>ssb</i> bakterii psychrofilnych <i>D. psychrophila</i> , <i>F. psychrophilum</i> , <i>P. profundum</i> , <i>P. haloplanktis</i> , <i>P. arcticus</i> , <i>P. cryohalolentis</i> , <i>P. ingrahamii</i> i <i>P. torquis</i> ....	61
6.8	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi .....	62
6.9	Ligacja fragmentów DNA.....	62
6.10	Analiza wyników klonowania .....	63
6.10.1	Sprawdzanie obecności DNA insertu za pomocą testu opóźnienia migracji plazmidowego DNA w żelu agarozowym .....	63
6.10.2	Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą reakcji PCR.....	63
6.10.3	Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą analizy restrykcyjnej.....	63
6.10.4	Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą sekwencjonowania DNA .....	63
6.11	Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE .....	64
6.11.1	Przygotowanie żelu poliakrylamidowego.....	64
6.11.2	Przygotowanie próbek do białkowej elektroforezy poliakrylamidowej.....	64
6.11.3	Barwienie i odbarwienie żeli poliakrylamidowych .....	65
6.12	Oczyszczanie białek za pomocą chromatografii jonowymiennej.....	65
6.13	Oczyszczanie białek za pomocą chromatografii powinowactwa .....	65
6.14	Badanie opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA (test retardacji).....	66
6.15	Określenie masy cząsteczkowej i budowy białek SSB .....	67
6.15.1	Określenie masy cząsteczkowej białek metodą ultrawierowania .....	67
6.15.2	Określenie budowy i oszacowanie masy cząsteczkowej metodą sieciowania chemicznego.....	67
6.16	Spektrofluorymetryczne badanie aktywności białek SSB .....	67
6.17	Badanie aktywności białek SSB w wysokich temperaturach.....	68
6.18	Określenie temperatury denaturacji białek SSB z wykorzystaniem skaningowej mikrokalometrii różnicowej (DSC) .....	68
6.19	Badanie zdolności do obniżania temperatury topnienia dsDNA.....	68
7.	Wyniki.....	70
7.1	Klonowanie genów <i>ssb</i> bakterii psychrofilnych do wektora ekspresyjnego pBAD.....	70
7.1.1	Amplifikacja genów <i>ssb</i> bakterii psychrofilnych.....	70
7.1.2	Konstrukcja plazmidów rekombinantowych .....	70
7.1.3	Potwierdzenie obecności DNA insertów w plazmidach rekombinantowych.....	71

7.2	Produkcja rekombinantowych białek SSB .....	74
7.3	Oczyszczanie rekombinantowych białek SSB .....	76
7.4	Charakterystyka molekularna psychrofilnych białek SSB.....	77
7.4.1	Badanie opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA ...	77
7.4.2	Określenie masy cząsteczkowej i budowy białek SSB .....	79
7.4.3	Spektrofluorymetryczne badanie aktywności białek SSB.....	83
7.4.4	Badanie aktywności białek SSB w wysokich temperaturach.....	89
7.4.5	Określenie temperatury denaturacji białek SSB.....	93
7.4.6	Badanie zdolności białek SSB do obniżania temperatury topnienia dsDNA .....	97
8.	Dyskusja.....	99
8.1	Charakterystyka molekularna psychrofilnych białek SSB.....	99
8.2	Analiza sekwencji białek SSB .....	103
9.	Podsumowanie .....	113
10.	Skróty nazw stosowanych w pracy.....	114
11.	Literatura .....	117

## 1. Cel pracy

Celem pracy była identyfikacja, izolacja, otrzymanie oraz zbadanie właściwości biochemicznych i biofizycznych białek SSB gatunków bakterii zaadaptowanych do zimna takich jak *Desulfotalea psychrophila*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium profundum*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Psychrobacter arcticus*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychromonas ingrahamii* i *Psychroflexus torquis*.

## 2. Streszczenie

Białka SSB to białka wiążące się z jednoniciowym DNA i RNA, występujące we wszystkich organizmach żywych oraz wirusach. Ze względu na swoje właściwości, a szczególnie stabilizujący wpływ na pojedynczą nić kwasu nukleinowego, są niezbędne w procesach replikacji, rekombinacji i naprawy DNA. Białka SSB znalazły zastosowanie w biologii molekularnej i analityce, m. in. jako wzmacniacze reakcji PCR, narzędzia do ilościowej analizy DNA, RNA i białek w elektroforezie kapilarnej oraz w pirosekwencjonowaniu, jednak stale poszukuje się dla nich nowych zastosowań.

Środowiska o zimnym klimacie stanowią około 85% powierzchni kuli ziemskiej i charakteryzują się ogromnym zróżnicowaniem zaadaptowanych do zimna organizmów. Są to w większości psychrofile bytujące m.in. w zimnych wodach słodkich i morskich, w osadach dennych mórz i oceanów, w polarnych i wysokogórskich glebach, w lodzie lodowców i w lodzie morskim. Ponad 99% bakterii środowiskowych nie można hodować z wykorzystaniem konwencjonalnych metod laboratoryjnych, dlatego identyfikacja nowych, aktywnych w niskiej temperaturze białek z tych bakterii jest znacznie ograniczona.

Zasób informacji na temat białek organizmów zaadaptowanych do zimna jest wyjątkowo ograniczony, zwłaszcza jeśli weźmie się pod uwagę rozprzestrzenienie organizmów psychrofilnych w środowisku (około 85% biosfery ziemskiej to psychrosfera o temperaturach poniżej 5°C) oraz istniejące trudności w ich pozyskiwaniu. W literaturze naukowej nie ma żadnych informacji dotyczących charakterystyki białek SSB mikroorganizmów zaadaptowanych do zimna. W związku z tym zostały podjęte badania nad białkami SSB pochodzącymi z bakterii obligatoryjnie i fakultatywnie psychrofilnych.

Celem badań było otrzymanie oraz przeprowadzenie charakterystyki molekularnej białek SSB *Desulfotalea psychrophila* (*DpsSSB*), *Flavobacterium psychrophilum* (*FpsSSB*), *Photobacterium profundum* (*PprSSB*), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*PhaSSB*), *Psychrobacter arcticus* (*ParSSB*), *Psychrobacter cryohalolentis* (*PcrSSB*), *Psychromonas ingrahamii* (*PinSSB*) i *Psychroflexus torquus* (*PtoSSB*). W trakcie badań wyizolowano genomowe DNA wymienionych bakterii, które stanowiło matrycę do amplifikacji poszczególnych genów *ssb* z zastosowaniem specyficznych dla danego gatunku starterów. Skonstruowano plazmidy ekspresyjne zawierające badane geny *ssb*. Przeprowadzono optymalizację ekspresji poszczególnych genów kodujących białka SSB, w wyniku której uzyskano wydajną ich produkcję. Uzyskano oczyszczone preparaty tych białek i wykazano ich aktywność wiązania krótkich i długich fragmentów jednoniciowego DNA. Przeprowadzono porównawczą analizę sekwencji aminokwasowej białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB*

i PtoSSB z białkami wiążącymi jednoniciowy DNA bakterii mezofilnych i termofilnych, która w pierwszorzędowej strukturze tych białek wykazała pewne charakterystyczne cechy dla enzymów zaadaptowanych do zimna. Określono masę cząsteczkową i wykazano tetrameryczną budowę u wszystkich badanych natywnych białek z wykorzystaniem dwóch niezależnych metod: sieciowania aldehydem glutarowym oraz ultrawierowania. Określono długość miejsca wiązania kwasu nukleinowego przez badane białka SSB i stwierdzono, że jest ono niezależne od stężenia soli, z wyjątkiem białek *F. psychrophilum* i *P. haloplanktis*. Wykazano również zdolność badanych białek SSB do destabilizacji dwuniciowego DNA, która jest jedną z podstawowych właściwości białek SSB-podobnych. Określono temperaturę denaturacji badanych białek SSB, której wartość jest zbliżona, a w dwóch przypadkach wyższa niż dla białka SSB *Escherichia coli*. Ponadto, badając termostabilność tych białek wykazano, że są one bardzo stabilne w wysokiej temperaturze, stabilniejsze nawet od białek termofilnych bakterii *Thermus thermophilus* czy *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

Białka wiążące jednoniciowy DNA pochodzące z bakterii psychrofilnych stanowią atrakcyjny materiał do dalszych badań strukturalnych, w wyniku których możliwe będzie wyjaśnienie ich stabilności w wysokich temperaturach oraz badań ich zastosowania w technikach biologii molekularnej, a w szczególności w reakcjach wysokotemperaturowych, np. opartych o amplifikację DNA *in vitro*.



### 3. Abstract

SSB proteins are proteins that bind to single-stranded DNA and RNA, and are present in all living organisms and viruses. Due to its properties, especially a stabilizing effect on a single strand of nucleic acid, they are essential in such processes as replication, recombination and DNA repair. SSB proteins are used in molecular biology and analytics: as enhancers of the PCR reaction and pyrosequencing and as a tool for quantitative analysis of DNA, RNA and proteins in capillary electrophoresis. However, it is constantly looking for their new applications.

Environment of cold climates represent about 85% of the Earth's surface and are characterized by a great diversity of organisms adapted to cold. Psychrophiles are found among other in cold freshwater and seawater, sediments in the seas and oceans, in polar and alpine soils, in the ice of glaciers and sea ice. The identification of new, active at low temperature, proteins of these bacteria is considerably limited, because more than 99% of the environmental bacteria cannot be cultured by conventional laboratory methods.

The resource information about proteins of cold-adapted organisms is very limited, especially when taking into account the spread of psychrophilic organisms in the environment (about 85% of the Earth's biosphere is the psychrosphere with temperatures below 5°C) and the difficulties in obtaining them. In the scientific literature, there is no information about the characterization of SSB proteins from cold-adapted microorganisms. Therefore, studies on SSB proteins derived from obligatory and facultative psychrophilic bacteria have been undertaken.

The aim of this study was to obtain and carry out molecular characterization of SSB proteins from *Desulfotalea psychrophila* (*DpsSSB*), *Flavobacterium psychrophilum* (*FpsSSB*), *Photobacterium profundum* (*PprSSB*), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*PhaSSB*), *Psychrobacter arcticus* (*ParSSB*), *Psychrobacter cryohalolentis* (*PcrSSB*), *Psychromonas ingrahamii* (*PinSSB*) and *Psychroflexus torquis* (*PtoSSB*). During the tests, the genomic DNA was isolated from above mentioned bacteria and was the template to amplify each *ssb* gene by using primers specific for respective species. Expression plasmids containing examined *ssb* genes were constructed. Optimization of the expression of individual genes encoding SSB proteins were performed, which has resulted in efficient production of these molecules. Preparations of purified proteins were obtained and their binding activity has been demonstrated for both short and long fragments of single-stranded DNA. A comparative analysis of the amino acid sequence of the *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* and *PtoSSB* proteins with single-stranded DNA binding proteins from mesophilic and thermophilic bacteria was performed and showed some features that are characteristic for cold-adapted enzymes. Molecular weight and tetrameric structure of studied SSB proteins

were determined by using two independent methods: glutaraldehyde cross-linking and ultracentrifugation. The length of nucleic acid binding by psychrophilic SSB proteins was specified and found as salt independent, with the exception of SSB proteins of *F. psychrophilum* and *P. haloplanktis*. It was also demonstrated that SSB proteins derived from cold-adapted organisms possess the ability to destabilize the double-stranded DNA, which is one of the basic properties of SSB-like proteins. Denaturation temperatures of examined SSB proteins were also specified, the obtained values of which are similar, and in two cases higher than for *Escherichia coli* SSB protein. In addition, the thermal stability of psychrophilic SSB proteins was examined and demonstrated that these proteins are very stable at high temperature, even more stable than proteins from thermophilic bacteria from *Thermus thermophilus* or *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

Single-stranded DNA-binding proteins from psychrophilic bacteria are an attractive topic for further structural studies, as a result of which it will be possible to explain their stability at high temperatures and for application research of these proteins in molecular biology, particularly in high-temperature reactions based on *in vitro* DNA amplification.

## 4. Wstęp

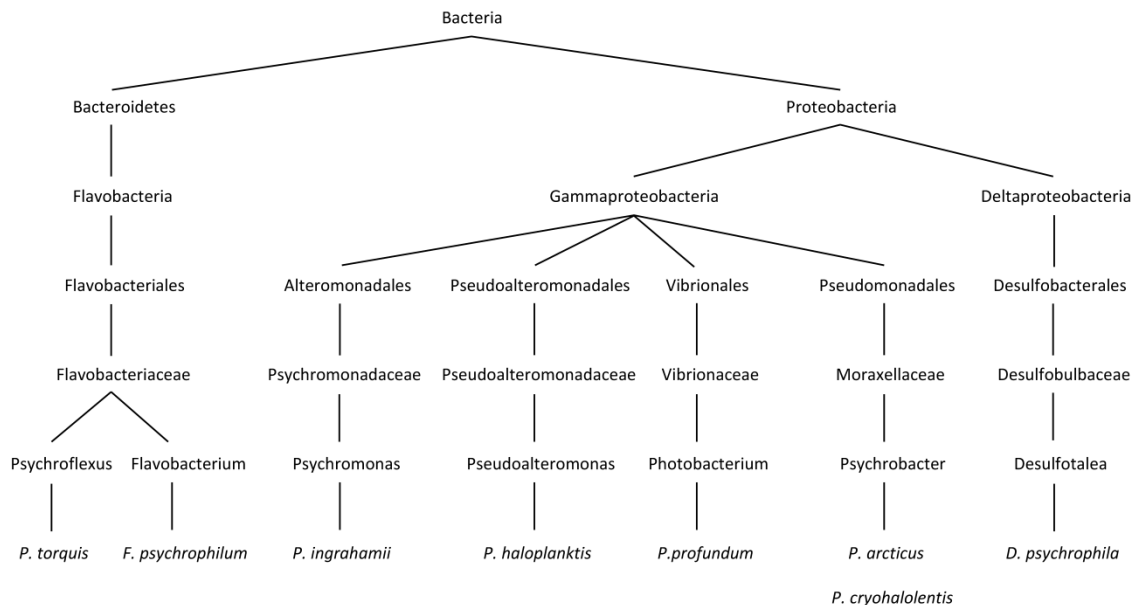
### 4.1 Charakterystyka bakterii psychrofilnych

Przeważającą część ziemskiej biosfery (85%) stanowi psychrosfera o temperaturach poniżej 5°C. Obejmuje ona ponad 90% objętości wód oceanicznych (które stanowią 71% powierzchni globu ziemskiego) i 70% powierzchni lądów. Stale zamrożona kriosfera (20% powierzchni Ziemi) obejmuje obszary wiecznej zmarzliny (permafrost), lód lodowców oraz lód mórz polarnych. Ta zimna strefa kuli ziemskiej jest zdominowana przez drobnoustroje psychrofilne. Mikroorganizmy psychrofilne zasiedlają rozmaite ekosystemy i to nie tylko te, które są zlokalizowane na obszarach o ustalonym zimnym klimacie, ale i takie, w których temperatura obniża się tylko lokalnie lub okresowo. Występują w zimnych wodach słodkich i morskich, w osadach dennych mórz i oceanów, w polarnych i wysokogórskich glebach, w lodzie morskim i lodzie lodowców. Rozwijają się na dnie rowów oceanicznych, a nawet w stratosferze i mezosferze, gdzie temperatury spadają do -100°C [1, 2, 3].

Pierwsze doniesienie o zimnolubnym mikroorganizmie pochodzi z 1887 roku, w którym Forster opisał fluoryzującą bakterię, wyizolowaną z przechowywanej w chłodzie ryby, dobrze rosnącą w temperaturze 0°C. Kilkanaście lat później Schmidt-Neelsen wprowadził termin psychrofile dla mikroorganizmów posiadających zdolność do wzrostu w niskich temperaturach [4]. Obecnie wśród mikroorganizmów zimnolubnych wyróżnia się psychrofile obligatoryjne charakteryzujące się optymalną temperaturą wzrostu ( $T_{opt}$ ) nie przekraczającą 15°C i maksymalną 20°C oraz psychrofile fakultatywne (psychrotrofy), których temperatura optymalna mieści się w zakresie 20-25°C, a maksymalna nie przekracza 30°C [5, 6]. W ostatnich latach zwrócono uwagę, że termin psychrotrofy opisujący fakultatywne psychrofile jest wewnątrznie niespójny, ponieważ końcówka „-trofy” odnosi się raczej do statusu żywieniowego organizmów, a nie łączy się z temperaturą wzrostu [1].

Różnorodność ekosystemów skolonizowanych przez drobnoustroje psychrofilne sprawia, że ich liczba i zróżnicowanie są ogromne. Scharakteryzowano liczne gatunki zaadaptowanych do zimna sinic, należących do rodzajów *Calothrix*, *Oscillatoria*, *Rivularia* czy *Nostoc*. Poznano również mikroorganizmy psychrofilne należące do drożdży (*Torulopsis*, *Candida*, *Mrakia*, *Leukosporidium*, *Cryptococcus*), pleśni (*Penicillium*, *Cladosporium*), jednokomórkowych glonów (*Chloromonas*) i archeonów (*Methanogenium*, *Methanococcoides*, *Methanosarcinia*, *Halorubrum*). Najliczniejszą jednak grupą są bakterie, wśród których opisano dotąd gatunki należące do rodzajów: *Alcaligenes*, *Antarctobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Brevibacterium*, *Colwellia*, *Cryobacterium*, *Gelidibacter*, *Glacieola*, *Hymenobacter*,

*Kocuria*, *Methylosphaera*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Moritella* (rodzaj obejmujący prawdopodobnie wyłącznie gatunki psychrofilne), *Octadecabacter*, *Oleispira*, *Phormidium*, *Photobacterium*, *Planococcus*, *Polaribacter*, *Polaromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus*, *Psychromonas*, *Psychroserpens*, *Rhodoglobus*, *Sphingomonas*, *Shewanella* i *Vibrio* [1, 7].



Rys. 1 Analiza filogenetyczna badanych w tej pracy organizmów psychrofilnych *Desulfotalea psychrophila*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium profundum*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Psychrobacter arcticus*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Psychromonas ingrahamii* i *Psychroflexus torquis*.

Spośród licznej puli bakterii psychrofilnych wybrano osiem szczepów bakteryjnych, których genomy stanowiły źródło genów kodujących białka wiążące jednoniciowy DNA. Szczepy te wykazują zróżnicowanie pod względem stopnia pokrewieństwa (Rys. 1) oraz warunków bytowania. Wybrane gatunki to: *Desulfotalea psychrophila*, *Photobacterium profundum*, *Psychroflexus torquis* i *Psychromonas ingrahamii* należące do psychrofilii obligatoryjnych oraz *Flavobacterium psychrophilum*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Psychrobacter arcticus* i *Psychrobacter cryohalolentis* będące psychrofilami fakultatywnymi (Tab. 1).

Nazwa bakterii	Pochodzenie bakterii	Temperatura optymalna wzrostu [°C]	Typ ze względu na T <sub>opt</sub>
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	Osady morskie (Svalbard)	10	psychrofil obligatoryjny
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Wody morskie, zainfekowane komórki łososia	18-20	psychrofil fakultatywny
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Wody Atlantyku i Pacyfiku	15	psychrofil fakultatywny
<i>Psychrobacter arcticus</i>	40 000 letni permafrost (Syberia)	22	psychrofil fakultatywny
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	40 000 letni permafrost (Syberia)	22	psychrofil fakultatywny
<i>Psychromonas ingrahamii</i>	Lód morski (Alaska)	5	psychrofil obligatoryjny
<i>Photobacterium profundum</i>	Dno morza >2 500 m (Morze Sulu)	<15	psychrofil obligatoryjny
<i>Psychroflexus torquis</i>	Lód morski (Antarktyka)	10-15	psychrofil obligatoryjny

Tab. 1. Optymalne temperatury wzrostu i pochodzenie wybranych do badań bakterii psychrofilnych.

#### 4.1.1 Charakterystyka *Desulfotalea psychrophila*

*Desulfotalea psychrophila* Lsv54 jest Gram-ujemną, redukującą siarczany pałeczką, należącą do deltaproteobakterii (Rys. 1). Środowiskiem życia tego organizmu są permanentnie zimne osady morskie, a po raz pierwszy został odkryty w arktycznym osadzie morskim u wybrzeży Svalbardu (Norwegia). Bakterie *D. psychrophila* rosną w zakresie temperatur od -1,8°C do 19°C, z optymalną temperaturą wzrostu wynoszącą 10°C (czas generacji 27 godzin). Te nie wytwarzające spor pałeczki są bezwzględnie beztlenowcami wykazującymi fermentacyjny typ metabolizmu. Bakterie wykorzystują kwasy karboksylowe, mrówczany, alkohole i aminokwasy jako źródła węgla i donory elektronów. Z kolei siarczany, siarczyny, tiosiarczany oraz cytrynian żelaza (III) są głównymi akceptorami elektronów w przemianach metabolicznych tych bakterii oraz są redukowane do siarczków i cytrynianu żelaza (II). Ponadto, *D. psychrophila* wymaga chlorku sodu (1%) i chlorku magnezu do optymalnego

wzrostu, natomiast obecność witamin nie jest konieczna [8]. *D. psychrophila*, ze względu na swoje obfite występowanie w arktycznych osadach morskich, odgrywa istotną rolę w cyklu energii w tym środowisku oraz bierze udział w globalnym obiegu węgla i siarki. Genom *Desulfotalea psychrophila* Lsv54 stanowi pojedynczy chromosom wielkości 3523 kpz oraz dwa plazmidy o wielkości 121,5 kpz i 14,6 kpz. Co ciekawe, wykazano, że bakteria *D. psychrophila* nie posiada kilku homologów chromosomów typu c (c553, c3, ncc), które są obecne u większości redukujących siarczany deltaproteobakterii [9]. Siarkowodór, główny produkt metabolizmu bakterii redukujących siarczany (w tym szczepów rodzaju *Desulfotalea*), odgrywa ważną rolę w wiązaniu jonów metali w wodach morskich. Z tego względu wspomniana grupa bakterii może być stosowana w procesach bioremediacji metali ciężkich w środowiskach wodnych [10].

#### **4.1.2 Charakterystyka *Flavobacterium psychrophilum***

Większość przedstawicieli rodziny *Flavobacteriaceae* to wolno żyjące organizmy, jednak część z nich to poważne patogeny ludzi i zwierząt. *Flavobacterium psychrophilum* jest szeroko rozpowszechnionym patogenem dzikich i hodowlanych ryb łososiowatych i uważany jest za jeden z najgroźniejszych czynników chorobotwórczych ryb [11]. Jednostki chorobowe wywoływane przez te patogeny to np. „rainbow trout fry syndrome” (RTFS) i „cold water disease” (CWD). *F. psychrophilum* to Gram-ujemne prątki o średnicy 0,2 – 0,75 µm i długości 1,5 – 1,75 µm, których morfologia jest zależna od warunków prowadzenia hodowli. Bakterie są fakultatywnymi psychrofilami o optymalnej temperaturze wzrostu 18-20°C, nie wykazujące wzrostu w temperaturze 30°C i wyższej. To bezwzględne tlenowce wykazujące wysoką aktywność proteolityczną [12]. Komórki tych bakterii produkują szereg proteaz, które mogą brać udział w procesie chorobowym [13]. W 2001 roku scharakteryzowano wytwarzaną zewnątrzkomórkowo metaloproteazę *Fpp1*, która ma zdolność rozszczepiania m.in. kilku typów kolagenu, żelatyny oraz aktyny i miozyny – podstawowych elementów układu mięśniowego ryb [14]. Mechanizmy patogenności *F. psychrophilum* nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Ostatnie doniesienia zespołu naukowców z Chile wskazują, że wyizolowane przez nich bakteriofagi z łososi znacznie obniżają śmiertelność osobników zainfekowanych bakteriami *F. psychrophilum*. Wyniki te uzyskano w warunkach laboratoryjnych, jednak stanowią one dowód na to, że fagi mogą być zastosowane w celu ochrony ryb łososiowatych przed RTFS lub CWD [15]. Genom *F. psychrophilum* składa się z pojedynczego chromosomu zawierającego 2861 kpz i plazmidu pCP1. Zawiera on 2432 geny kodujące białka, wśród których znajdują się białka odpowiedzialne za ruch ślizgowy i tworzenie biofilmu oraz liczne adhezyny i proteazy, prawdopodobnie zaangażowane w kolonizację, inwazję i degradację komórek gospodarza [11].

#### 4.1.3 Charakterystyka *Psychrobacter arcticus* i *Psychrobacter cryohalolentis*

Szczepy *Psychrobacter arcticus* i *Psychrobacter cryohalolentis* wyizolowano z mającego około 40 000 lat syberyjskiego permafrostu z Niziny Kołymskiej. Są to Gram-ujemne, ściśle tlenowe, nieruchliwe i nie wytwarzające spor pałeczki. Bakterie rosną w zakresie temperatur od -10°C do 28°C (*P. arcticus*) lub do 30°C (*P. cryohalolentis*), przy czym optymalna temperatura wzrostu wynosi 22°C. W przeciwieństwie do *P. cryohalolentis*, *P. arcticus* wymaga obecności NaCl do swego wzrostu i redukuje azotany do azotynów. Genom *P. arcticus* oraz *P. cryohalolentis* stanowi jeden chromosom wielkości odpowiednio 2650 kbp i 3100 kbp [16]. *P. arcticus* jest jednym z modelowych organizmów w badaniach mechanizmów adaptacji do życia bakterii w niskich temperaturach. Wyniki analizy genomu sugerują, że do strategii adaptacyjnych należą m.in. zmiany składu błon i synteza białek szoku zimna. Analiza porównawcza proteomu *P. arcticus* wskazuje na mniejszą zawartość kwasowych reszt aminokwasowych oraz proliny i argininy, co w konsekwencji wpływa na zwiększoną elastyczność białek działających w niskich temperaturach. Różnica w zawartości reszt aminokwasowych dotyczyła w znacznej mierze białek istotnych dla wzrostu komórek i reprodukcji tego organizmu [17]. W 2012 roku scharakteryzowano esterazę, pochodzący z *P. cryohalolentis* enzym hydrolizujący tłuszcze. Enzym ten wykazuje największą termostabilność w porównaniu do opisanych dotąd esteraz bakterii psychrofilnych, zachowując ponad 60% aktywności po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 80°C [18].

#### 4.1.4 Charakterystyka *Pseudoalteromonas haloplanktis*

*Pseudoalteromonas haloplanktis* to Gram-ujemne, ściśle tlenowe, nie wytwarzające spor pałeczki należące do gammaproteobakterii (Rys. 1) [19]. Bakterie te kolonizują zarówno przybrzeżne, jak i otwarte wody Atlantyku i Pacyfiku. Po raz pierwszy zostały wyizolowane z próbek pochodzących z przybrzeżnych wód oceanicznych zebranych przez zespół francuskiej stacji badawczej na Antarktydzie. Genom *P. haloplanktis* składa się z dwóch niezależnie replikujących się chromosomów o wielkości 2700 kbp i 800 kbp [20, 21]. Przedstawiciele tego gatunku to fakultatywne psychrofile żyjące w zakresie temperatur od 4°C do 25°C [22] i optymalnej temperaturze wzrostu 15°C [23], preferujące stężenie NaCl w zakresie 1,5 - 3,5%, zdolne do wzrostu poniżej normalnego ciśnienia atmosferycznego [24]. *P. haloplanktis* wraz z innymi morskimi bakteriami uważany jest za istotne źródło biologicznie aktywnych substancji (np. substancji przeciwbakteryjnych), w tym enzymów. Stwierdzono, że bakteria ta wytwarza pozakomórkowo substancje antybakteryjne, np. kwas izowalerianowy, który jest również inhibitorem ludzkich limfocytów [25].

Rekombinantowy szczep *P. haloplanktis* TAC 125, produkujący monoooksygenazę toluenu/o-ksylenu, jest obiecującym mikroorganizmem dla bioremediacji związków aromatycznych stanowiących zanieczyszczenia środowisk morskich i ścieków [22]. Na przełomie XX i XXI wieku znacznie wzrosło zainteresowanie enzymami pochodzenia psychrofilnego ze względu na ich biotechnologiczny potencjał i możliwości zastosowania w różnych gałęziach przemysłu. Enzymy pochodzące z mikroorganizmów zaadaptowanych do zimna były wytwarzane przez transformowane ich genami drobnoustroje mezofilne, jednak nie zawsze było możliwe uzyskanie wydajnej ekspresji tych genów bądź otrzymanie aktywnych białek w mezofilnym gospodarzu. Z tego względu intensywnie poszukiwano nowych systemów do ekspresji genów, opartych na drobnoustrojach psychrofilnych. W 2006 roku *P. haloplanktis* TAC 125 został wykorzystany jako gospodarz ekspresyjny do zewnątrzkomórkowej produkcji rekombinantowych białek w niskiej temperaturze (nawet 4°C) [26]. Ekspresja w tym systemie zachodziła z niską wydajnością, ponieważ jednocześnie wydzielane były egzoproteazy gospodarza, które powodowały częściową degradację produkowanego białka. Skonstruowany dwa lata później rekombinantowy szczep *P. haloplanktis*, ze zinaktywowanym systemem sekrecji, jest gospodarzem ekspresyjnym obecnie stosowanym w produkcji „trudnych” białek, ulegających nieprawidłowemu złożeniu, powstających jako nierozpuszczalne agregaty lub degradowalnych w mezofilnych gospodarzach ekspresyjnych [27]. Do tej pory uzyskano pięć struktur krystalograficznych białek *P. haloplanktis* [28, 29, 30, 31, 32]. Wyniki analiz porównawczych tych struktur odegrały istotną rolę w badaniach mechanizmów adaptacji bakterii psychrofilnych do zimnego środowiska.

#### **4.1.5 Charakterystyka *Psychromonas ingrahamii***

*Psychromonas ingrahamii* został wyizolowany z lodu morskiego pochodzącego z przylądka Barrow u wybrzeży Alaski. To niezdolne do ruchu, występujące pojedynczo lub parami, duże Gram-ujemne pałeczki. Posiadają wakuole gazowe o dwóch niespotykanych typach morfologicznych, opisanych dotąd jedynie u halofilnych archeonów *Halobacterium halobium*. Wakuole gazowe, zawierające małe białkowe pęcherzyki przepuszczalne dla gazów, obniżając gęstość komórek wpływają na zachowanie ich płynności. Jednak ich dokładna funkcja nie została jeszcze poznana [33]. Bakterie *P. ingrahamii* to obligatoryjne psychrofile rosnące w zakresie temperatur od -12°C do 10°C, a ich optymalna temperatura wzrostu wynosi 5°C. Są to jedyne znane bakterie rosnące w tak niskiej temperaturze. Ponadto temperatura -12°C jest najniższą temperaturą, w jakiej możliwa jest hodowla psychrofilii w warunkach laboratoryjnych. Głównym problemem jest utrzymanie pożywek w stanie płynnym podczas hodowli oraz utrzymanie stałej niskiej temperatury podczas długiej, często kilkutygodniowej, inkubacji [34].



Bakterie *P. ingrahamii* należą do fakultatywnych beztlenowców, wykazujących tlenowy i fermentacyjny metabolizm. Rosną w umiarkowanych stężeniach soli (1-10% NaCl) i neutralnym środowisku o pH w zakresie 6,5 – 7,4. Bakteria wykorzystuje szeroką gamę źródeł węgla (np. cukry, fumaran, mleczany, glicerol) oraz ma zdolność fermentacji glukozy (bez wytwarzania pęcherzyków gazu), laktozy i trehalozy [33]. W 2013 roku rozwiązano strukturę krystalograficzną białka regulatorowego, frataksyny, z *P. ingrahamii* [35]. Zsekwencjonowany w 2006 roku genom *P. ingrahamii* stanowi pojedynczy chromosom wielkości 4560 kbp o zawartości zasad G+C wynoszącej 40,1% [36].

#### **4.1.6 Charakterystyka *Photobacterium profundum***

*Photobacterium profundum* SS9 został wyizolowany ze skorupiaków rzędu *Amphipoda* z Morza Sulu, z głębokości 2551 m. To Gram-ujemne pałeczki należące do rzędu *Vibrionales* gammaproteobakterii (Rys. 1), mające zdolność produkcji katalazy i oksydazy oraz redukcji azotanów. Są bakteriami psychro- i bazofilnymi, wykazującymi optimum wzrostu w temperaturze 15°C i ciśnieniu 28 MPa. Bakterie *P. profundum* wymagają obecności soli do wzrostu oraz są zdolne do metabolizowania szerokiego zakresu węglowodanów prostych i złożonych. Komórki tych bakterii posiadają zdolność do przemieszczania się dzięki obecności pojedynczej nieosłoniętej flagelli [37]. *P. profundum* stanowi genetyczny model w badaniach nad adaptacją mikroorganizmów do życia w warunkach niskich temperatur i wysokiego ciśnienia [38]. Wykazano na przykład, że wiele genów odpowiedzi na stres, takich jak: *htpG*, *dnaK*, *dnaJ* i *groEL*, jest aktywowanych przez wzrost ciśnienia [39]. Ponadto, ilość i typ łańcuchów kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej zależy od zmian ciśnienia i temperatury. W niskiej temperaturze i przy wysokim ciśnieniu zaobserwowano zwiększoną produkcję jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przez szczep SS9. W efekcie dochodzi do zmniejszenia upakowania łańcuchów kwasów tłuszczowych, a błona komórkowa nabiera struktury ciekłego kryształu [40]. W 2005 roku zsekwencjonowano genom *P. profundum* SS9. Genom ten składa się z dwóch kolistych chromosomów wielkości: 4100 kbp i 2200 kbp oraz plazmidu wielkości 80 kbp [39].

#### **4.1.7 Charakterystyka *Psychroflexus torquus***

*Psychroflexus torquus* to wyizolowane z lodu morskiego Antarktyki Gram-ujemne bakterie należące do rodziny *Flavobacteriaceae* (Rys. 1) i wytwarzające barwnik nadający jasno pomarańczowe zabarwienie ich koloniom. Komórki mają różną morfologię: od przypominających pałeczki przez spiralne filamenty po filamenty o zróżnicowanej długości w zależności od wieku hodowli. Kolisty kolonie występują w starszych hodowlach. *P. torquus* to

ściśle tlenowe chemoheterotrofy, posiadające zdolność syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: głównie kwasu eikozapentaenowego oraz kwasu arachidonowego. Bakterie te są obligatoryjnymi psychrofilami, których optymalna temperatura wzrostu mieści się w zakresie od 10 do 15°C, natomiast w temperaturze 20°C i powyżej nie są zdolne do wzrostu [41]. W 2001 roku odkryto, że *P. torquis* wytwarza 2-feniloetyloaminę w bardzo dużej ilości [42]. Jest to drugi przypadek zdolności do dużej produkcji tej aromatycznej aminy przez bakterie. Pierwszym było odkrycie tego zjawiska u alkalofilnych bakterii *Bacillus cohnii*, które produkowały 2-feniloetyloaminę z L-feniloalaniny i wydzielają ją do pożywki [43]. Wykazano, że mechanizm wytwarzania tej aromatycznej aminy przez *P. torquis* jest analogiczny jak u *B. cohnii*, jednak rola tego związku w rozwoju obu bakterii nie jest znana [42].

## **4.2 Adaptacje drobnoustrojów psychrofilnych do niskich temperatur**

Mikroorganizmy, aby przetrwać i rozwijać się w zimnych środowiskach, wykształciły specjalne mechanizmy adaptacyjne umożliwiające im prawidłowy rozwój i aktywny metabolizm komórek. Niska temperatura powoduje m.in. spadek aktywności enzymów, obniżenie płynności błon cytoplazmatycznych, zakłócenie transportu składników odżywczych i metabolitów, spadek poziomu transkrypcji, translacji i podziałów komórek, denaturację lub nieprawidłowe zwijanie białek i tworzenie się kryształków lodu wewnątrz komórek [44]. Przystosowanie do zimna odbywa się zarówno na poziomie molekularnym, jak i komórkowym, a także obejmuje cechy fenotypowe mikroorganizmów, zależne od zasiedlanego ekosystemu. Wśród adaptacji drobnoustrojów psychrofilnych do niskich temperatur wyróżnić można: modyfikacje składu kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych, dostosowanie właściwości kinetycznych, termodynamicznych i strukturalnych białek (szczególnie enzymów) do pracy w niskiej temperaturze oraz wytwarzanie specyficznych białek w odpowiedzi na niską temperaturę i ograniczoną dostępność wody ciekłej.

### **4.2.1 Modyfikacje lipidów błonowych**

Modyfikacja składu kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych w celu utrzymania płynności membran komórkowych jest jedną z najistotniejszych adaptacji u drobnoustrojów zimnolubnych. Obniżenie temperatury wywiera negatywny wpływ na fizyczne właściwości i funkcje membran komórkowych powodując przejście dwuwarstwy lipidowej z fazy ciekłokrystalicznej do fazy stałego żelu, co prowadzi do zmniejszenia płynności błony i ostatecznie, utraty jej funkcji [7]. Normalna aktywność metaboliczna, zależna od prawidłowego transportu elektronów w procesach oddychania, efektywnego pobierania

składników odżywczych i odbierania bodźców z otoczenia, niezakłóconego przebiegu transportu aktywnego i biernego, jest możliwa tylko wtedy, gdy dwuwarstwa lipidowa znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej [1]. Właściwości fizyczne błon regulowane są przez skład lipidów, który zmienia się w zależności od warunków termicznych siedliska mikroorganizmów [45]. U organizmów psychrofilnych płynność błon komórkowych jest zapewniana poprzez jedną bądź kombinację następujących modyfikacji: zwiększenie udziału nienasyconych reszt kwasów tłuszczowych (szczególnie *cis*-nienasyconych), zmniejszenie udziału reszt kwasów tłuszczowych o długim łańcuchu węglowym oraz zwiększenie udziału reszt kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu węglowym (w tym większego udziału form *anteiso*- w stosunku do form *iso*-) [46]. Zwiększoną zawartość mono- i wielonienasyconych reszt kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych stwierdzono m.in. u gammaproteobakterii rodzaju *Shewanella*, *Moritella* i *Colwellia*. Natomiast wzrost liczby reszt o rozgałęzionym i krótszym łańcuchu węglowym jest charakterystyczny dla budowy lipidów błonowych antarktycznych bakterii morskich i glebowych [1]. Taki skład kwasów tłuszczowych odgrywa kluczową rolę w zwiększaniu płynności błony powodując, że staje się ona bardziej giętka i luźno upakowana, ułatwiając tym samym procesy transportu w warunkach niskiej temperatury.

#### **4.2.2 Specyficzne białka wytwarzane przez drobnoustroje psychrofilne**

Dostępność wody w stanie ciekłym jest ograniczona w środowiskach zasiedlanych przez drobnoustroje psychrofilne. W niskich temperaturach, dominującym procesem pozwalającym na utrzymanie wody w postaci płynnej jest obniżenie jej temperatury krzepnięcia. Do zainicjowania procesu krzepnięcia niezbędna jest obecność zarodków krystalizacji. W przypadku braku inicjatorów tego procesu, możliwe jest utrzymanie wody w fazie ciekłej w temperaturach poniżej 0°C. Zjawisko to jest powszechnie wykorzystywane przez zaadaptowane do zimna mikroorganizmy w celu ochrony przed tworzeniem się wewnątrzkomórkowego lodu. W niskich temperaturach drobnoustroje psychrofilne wytwarzają unikatowe białka zapobiegające zamarzaniu (ang. anti-freeze proteins, AFP) oraz białka termicznej histerezy (ang. thermal hysteresis proteins, THP). Białka te obniżają punkt krzepnięcia wody, ale nie jej punkt topnienia, czyli powodują termiczną histerezę [1]. Dzięki swoim amfipatycznym właściwościom, białka AFP i THP są zdolne do adsorpcji na zarodkach kryształów lodu, które tworzą się w komórce lub przenikają do jej wnętrza przy spadku temperatury. Obecność białek AFP u bakterii stwierdzono po raz pierwszy w 1993 roku [47]. W kolejnych latach opisano wiele bakterii zdolnych do syntezy białek AFP. Szczególną uwagę zwrócono na szczepy rodzaju *Moraxella*, u których białka te występują w dużej ilości oraz na

*Marinomonas primoryensis*, który wytwarza zależne od jonów wapnia niezwykle aktywne białka AFP [44, 48].

Zaadaptowane do zimna mikroorganizmy wytwarzają ponadto, niespotykane u innych drobnoustrojów, unikatowe białka nukleocyjne lodu (ang. ice nucleic proteins, INP) [49]. Te małe białka zlokalizowane są w zewnętrznej błonie bakterii psychrofilnych i w niskich temperaturach działają jako zarodki kryształów lodu wiążąc na swojej powierzchni cząsteczki wody. Rdzeń cząsteczki INP pokrywany jest przez powstające kryształy, prowadząc do powstania struktury, która ze względu na zbyt duże rozmiary nie może wnikać do wnętrza komórki i doprowadzić do jej destrukcji.

Transkrypcja i translacja są procesami wrażliwymi na zmiany temperatury. Skutkiem działania niskiej temperatury jest wzmocnienie oddziaływań między niemi podwójnej helisy DNA (także formy superskręconej), które prowadzi do zaburzenia relaksacji i utrudnienia dostępu polimerazy RNA do kwasu deoksyrybonukleinowego. Ponadto wzrasta ilość niekorzystnych drugorzędowych struktur RNA, które mogą zakłócać proces ekspresji informacji genetycznej [7]. Białka szoku zimna (ang. cold-shock proteins, CSP) są niezbędne do uruchomienia i prawidłowego przebiegu transkrypcji i translacji w warunkach niskiej temperatury. Białka te są odpowiedzialne za tworzenie się funkcjonalnych rybosomów przeprowadzających syntezę łańcucha polipeptydowego oraz za usuwanie niewłaściwych struktur drugorzędowych w mRNA [1]. Białka CSP występują nie tylko u organizmów psychrofilnych, ale także u mezo- i termofilnych. Psychrofile produkują białka CSP w sposób ciągły, natomiast inne mikroorganizmy wytwarzają je tylko w odpowiedzi na stres zimna. U drobnoustrojów zaadaptowanych do zimna nie dochodzi do hamowania ekspresji genów podstawowego metabolizmu (ang. housekeeping genes), która towarzyszy odpowiedzi na stres zimna u organizmów mezofilnych. Ponadto liczba białek CSP jest znacznie wyższa niż u mezofili i proporcjonalna do natężenia zimna [2]. Podobną do CSP i równie ważną grupą białek, umożliwiającą mikroorganizmom psychrofilnym niezakłócony rozwój w środowiskach o niskiej temperaturze, są białka aklimatyzacji do zimna (ang. cold-acclimation proteins, CAP). Niektóre z białek CAP są białkami szoku zimna u mikroorganizmów mezofilnych, jak np. opiekuńcze białko CspA [7].

#### **4.2.3 Adaptacje białek i enzymów do działania w niskiej temperaturze**

Większość reakcji metabolicznych, umożliwiających przeżycie i rozwój każdego organizmu, to reakcje zachodzące z udziałem enzymów, zależne od temperatury. Niska temperatura powoduje spadek szybkości reakcji, zmiany w oddziaływaniach enzym-substrat, wzrost lepkości rozpuszczalnika (np. lepkość wody w 0°C jest prawie dwukrotnie wyższa niż

w 20°C) oraz zmniejszenie rozpuszczalności białek, czego rezultatem może być ich denaturacja. Wpływ temperatury na reakcje chemiczne, w tym reakcje enzymatyczne, opisuje równanie Arrheniusa:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

gdzie  $k$  to stała szybkości reakcji,  $A$  to czynnik przedwykładniczy charakterystyczny dla danej reakcji,  $E_a$  to energia aktywacji,  $R$  to stała gazowa i  $T$  to temperatura. Z równania wynika, że obniżenie temperatury prowadzi do gwałtownego spadku stałej szybkości reakcji, którego skala zależy od wartości energii aktywacji [50]. Dla reakcji o dużej energii aktywacji szybkość reakcji silnie zależy od temperatury. Natomiast im mniejsza jest energia aktywacji reakcji, tym jej szybkość w mniejszym stopniu zależy od temperatury. Bytujące w permanentnie zimnym środowisku drobnoustroje psychrofilne musiały kinetycznie, termodynamicznie i przede wszystkim strukturalnie przystosować swoje enzymy do działania w niskiej temperaturze. Zaadaptowane do zimna enzymy charakteryzują się wyższą aktywnością katalityczną w niskich i umiarkowanych temperaturach w stosunku do homologicznych enzymów mikroorganizmów mezofilnych i termofilnych, dzięki obniżonej energii swobodnej i entalpii aktywacji reakcji. Obniżenie  $E_a$  powoduje mniejszą wrażliwość enzymów psychrofilnych na zmiany temperatury w porównaniu do ich mezofilnych odpowiedników i jest to ich podstawowa kinetyczna adaptacja do niskiej temperatury [7]. Niższa energia aktywacji osiągana jest dzięki zwiększonej elastyczności struktury w obrębie domeny funkcyjnej lub w całej cząsteczce białka, która sprawia, że centrum aktywne staje się większe i bardziej dostępne dla substratów reakcji katalitycznej [51]. Większa giętkość białek organizmów psychrofilnych jest niezwykle istotna dla ich prawidłowego funkcjonowania w temperaturach doświadczanych w warunkach bytowania. Adaptacja ta umożliwia efektywne działanie enzymów w lepkim i ubogim energetycznie środowisku, w którym ruchy termiczne cząsteczek są ograniczone.

Do tej pory rozwiązano struktury ponad 30 białek drobnoustrojów zaadaptowanych do zimna [52]. Poznanie struktury psychrofilnych białek z użyciem metod krystalograficznych jest znacznie utrudnione ze względu na elastyczność tych molekuł wynikającą z ich adaptacji do funkcjonowania w niskich temperaturach. W związku z tym, w celu przewidywania struktur i konformacji zaadaptowanych do zimna białek, stosuje się metody bioinformatyczne. Taka analiza jest możliwa, gdy struktury homologicznych enzymów są poznane i dostępne w bazach danych. Dzięki zastosowaniu analiz rentgenograficznych i bioinformatycznych możliwe było porównanie homologicznych enzymów psychrofilnych i mezofilnych [53]. Z tych badań wynika, że enzymy te wykazują bardzo podobną architekturę cząsteczki, zbliżoną konformację domen oraz struktur trzecio- i czwartorzędowych. Ponadto ich kieszenie katalityczne zawierają te

same reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie substratu i katalizujące przeprowadzaną reakcję enzymatyczną [51]. Analogia strukturalnych właściwości sprawia, że molekularny mechanizm reakcji z udziałem homologicznych białek psychrofilnych i mezofilnych jest właściwie identyczny. Zaobserwowano jednak szereg subtelnych zmian w strukturze białek zaadaptowanych do zimna, które wpływają na elastyczność konieczną do prawidłowego funkcjonowania w niskich temperaturach. Należą do nich:

- zwiększona ilość polarnych i mniej hydrofobowych reszt aminokwasowych,
- obecność dodatkowych reszt glicyny,
- obniżona zawartość reszt argininy i niski stosunek argininy do lizyny,
- redukcja oddziaływań wodorowych i jonowych,
- redukcja oddziaływań między aromatycznymi łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych,
- brak lub obniżenie ilości mostków solnych,
- obecność dodatkowych pętli o większej zawartości polarnych reszt aminokwasowych,
- obniżona zawartość proliny,
- podstawienia alifatycznych i naładowanych reszt aminokwasowych małymi lub nienaładowanymi resztami aminokwasowymi,
- redukcja oddziaływań hydrofobowych między podjednostkami,
- zmniejszone upakowanie rdzenia hydrofobowego,
- modyfikacje w oddziaływaniach dipolowych  $\alpha$ -helis [53, 54, 55].

Negatywnym skutkiem zmian strukturalnych, związanych z adaptacją enzymów do zimna, jest osłabienie ich stabilności kosztem zwiększonej gibkości molekuł [56]. Jednym z warunków stabilności termicznej białek jest ich zwarta struktura, dlatego enzymy posiadające bardziej elastyczną budowę są mniej stabilne. Istnieją jednak termostabilne białka pochodzące z psychrofilnych organizmów. Przykładowo dwa enzymy (NADP-zależna dehydrogenaza aldehydowa i aspartaza) wyizolowane z antarktycznej bakterii *Cytophaga* sp. KUC-1 wykazują najwyższą aktywność w temperaturze 55°C i są bardziej stabilne termicznie niż ich mezofilne odpowiedniki [57]. Z kolei dehydrogenaza alkoholowa szczepu *Flavobacterium frigidimaris* jest aktywna w zakresie temperatur od 0°C do 85°C, a najwyższą jej aktywność zaobserwowano w 70°C [58]. Natomiast dehydrogenaza izocytrynianowa *Desulfotalea psychrophila* ma wyższą temperaturę denaturacji (66,9°C) niż jej mezofilny homolog (59°C) [59].

Białka drobnoustrojów psychrofilnych nigdy nie wykazują wszystkich wyżej wymienionych cech adaptacyjnych jednocześnie. Każdy enzym/białko posiada unikalny zestaw właściwości, które nadają mu niezbędną w niskich temperaturach elastyczność [7].

#### 4.2.3.1 Pary jonowe i zawartość argininy

Wśród słabych oddziaływań elektrostatycznych, pary jonowe powstałe między dwoma przeciwnie naładowanymi łańcuchami polipeptydowymi są najsilniejszymi czynnikami stabilizującymi konformację białek. Ich obecność korzystnie wpływa na stabilność termiczną białek. W porównaniu do homologów mezofilnego pochodzenia, w strukturze enzymów organizmów psychrofilnych obserwuje się brak par jonowych wiążących struktury drugorzędowe i podjednostki białkowe [60]. Przykładowo, w psychrofilnej  $\alpha$ -amylazie z *Alteromonas haloplanktis* zanotowano brak 12 mostków solnych w porównaniu do  $\alpha$ -amylazy wyizolowanej ze świńskiej trzustki. Różnica była efektem podstawienia zasadowego aminokwasu z pary jonowej resztami glutaminy lub asparaginy [61].

Arginina bierze udział w stabilizacji termicznej białek, dzięki obecnemu w jej strukturze łańcuchowi guanidynowemu, który umożliwia tworzenie więcej niż jednej pary jonowej oraz zdolności do tworzenia kilku wiązań wodorowych [61]. Zawartość reszt argininy oraz stosunek Arg/(Arg+Lys) są niższe u enzymów psychrofilnych w porównaniu do ich mezofilnych i termofilnych odpowiedników, co zostało udokumentowane m.in. na przykładzie zaadaptowanej do zimna  $\alpha$ -amylazy,  $\beta$ -laktamazy czy lipazy [60].

#### 4.2.3.2 Wiązania wodorowe

Wpływ pojedynczego wiązania wodorowego na stabilność białka jest znikomy, jednak duża liczba takich oddziaływań w strukturze tych molekuł sprawia, że są one dominującym czynnikiem stabilizującym zwinięcie łańcuchów polipeptydowych. Badania nad strukturą krystalograficzną dwóch trypsyn, bydlęcej i wyizolowanej z łososia, dowiodły, że utrata kilku wiązań wodorowych w zaadaptowanym do zimna enzymie jest odpowiedzialna za słabsze oddziaływania między drugorzędnymi strukturami zlokalizowanymi w pobliżu miejsca katalicznego. Ponadto całkowita liczba polarnych, zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych reszt aminokwasowych (Ser, Thr, Asn i Gln) jest o 20% mniejsza w proteolitycznym enzymie pochodzącym z ryby niż w bydlęcej proteazie [61].

#### 4.2.3.3 Oddziaływania między aromatycznymi pierścieniami

Słabe, polarne oddziaływania pomiędzy aromatycznymi pierścieniami reszt tyrozyny, fenyloalaniny i tryptofanu mają porównywalne do wiązań wodorowych znaczenie w stabilizacji struktury, lecz występują w białkach w mniejszej ilości. Wykazano, że część aromatycznych interakcji między silnie zakonserwowanymi w subtylizynach i  $\beta$ -laktamazach pochodzenia mezofilnego resztami aromatycznymi nie występuje w ich homologach z organizmów

psychrofilnych. Brak tych oddziaływań destabilizuje strukturę białek jednocześnie nadając im giętkość niezbędną w warunkach niskiej temperatury [60, 61].

#### **4.2.3.4 Mostki disiarczkowe i zawartość proliny**

Reszty proliny oraz mostki disiarczkowe mają znaczący wpływ na stabilizację i usztywnienie przestrzennej struktury białek [61]. Wykazano, że oligo-1,6-glukozydaza z termofilnego szczepu *Bacillus thermoglucosidasius* posiada aż 14 dodatkowych reszt proliny w swojej sekwencji aminokwasowej, które prawdopodobnie są przyczyną niezwyklej stabilności tego białka. Zawartość proliny w przypadku enzymów bakterii psychrofilnych, np. izomeryzy triozofosforanowej,  $\alpha$ -amylazy i  $\beta$ -laktamazy, jest na ogół niższa w porównaniu do homologicznych enzymów pochodzenia mezofilnego i termofilnego. W zaadaptowanej do zimna  $\alpha$ -amylazie reszty proliny są usunięte lub zastąpione małymi resztami aminokwasowymi, głównie alaniny. Te podstawienia i delecje występują głównie w pętlach i skrętach łańcucha łączącego sąsiednie struktury drugorzędowe nadając mu istotną elastyczność [60]. Ponadto,  $\alpha$ -amylaza z *Alteromonas haloplanktis* zawiera mniej mostków disiarczkowych niż jej mezofilny odpowiednik [51].

#### **4.2.3.5 Zawartość glicyny**

Glicyna, najmniejszy aminokwas, nie posiada łańcucha bocznego i może przyjmować wiele konformacji sterycznie zakazanych w przypadku innych reszt aminokwasowych. Z reguły zawartość glicyny w sekwencji aminokwasowej enzymów z mikroorganizmów psychrofilnych nie różni się znacząco od innych białek. Jednakże znaczną ilość reszt tego aminokwasu obserwuje się w pobliżu miejsc aktywnych enzymów psychrofilnego pochodzenia, np. lipazy z *Moraxella* TA144 czy  $\alpha$ -amylazy z *Alteromonas haloplanktis*, co nadaje tym domenom lokalną giętkość [60].

#### **4.2.3.6 Efekt hydrofobowy**

Efekt hydrofobowy, wynikający z silnej tendencji niepolarnych aminokwasów do wzajemnego oddziaływania, jest siłą napędową procesu zwijania białek [62]. Grupowanie hydrofobowych łańcuchów bocznych aminokwasów w obrębie rdzenia białkowego stabilizuje strukturę tych molekuł. Oddziaływania te są endotermiczne i nasilają się ze wzrostem temperatury [60]. W enzymach zaadaptowanych do zimna zaobserwowano liczne substytucje niepolarnych aminokwasów, które powodują gwałtowny spadek indeksu hydrofobowości, w porównaniu do ich mezofilnych analogów [61]. Przykładowo, spośród 84 reszt



aminokwasowych zaangażowanych w tworzenie klasterów hydrofobowych  $\alpha$ -amylazy świńskiej trzustki aż 25 zostało zastąpionych innymi resztami aminokwasowymi w  $\alpha$ -amylazie psychrofilnej bakterii. 80% tych podstawień spowodowało znaczny spadek indeksu hydrofobowości, a 72% - wzrost elastyczności tego enzymu [60].

### 4.3 Białka SSB

W latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku prowadzono badania nad techniką chromatografii powinowactwa na złożu ssDNA-celuloza, podczas których odkryto produkt genu 32 bakteriofaga T4. Białko silnie, selektywnie i kooperatywnie wiązało się do jednoniciowego DNA (ssDNA) i było pierwszym poznany białkiem o takich właściwościach [63, 64, 65]. W niedługim czasie analogiczne białko odkryto w bakteriach *Escherichia coli* i ze względu na zaobserwowaną zdolność do rozplatania podwójnej helisy nadano mu nazwę białko rozwijające DNA (ang. DNA-unwinding protein) [66, 67]. W kolejnych latach stosowano inne terminy, takie jak: białko wiążące DNA (ang. DNA-binding protein) [68, 69, 70], białko topiące DNA (ang. DNA-melting protein) [71, 72, 73] oraz białko destabilizujące helisę (ang. helix destabilizing protein) [73]. W 1979 roku poznano gen *ssb* *E. coli*, a jego produktowi nadano ostateczną, stosowaną dziś nazwę białko wiążące jednoniciowy DNA (ang. single-stranded DNA-binding protein, SSB) [74]. Białko wykazuje również zdolność wiązania RNA, jednak siła tego oddziaływania jest znacznie słabsza w porównaniu do wiązania z ssDNA [70, 75]. Nazwa SSB właściwie dotyczy jedynie białka wiążącego ssDNA z *E. coli*. Dla białek pochodzących z innych organizmów stosuje się określenie białka SSB-podobne. Jednak, w celu uproszczenia, termin SSB stosowany jest dla wszystkich białek z rodziny SSB.

Białka SSB występują we wszystkich organizmach żywych i wirusach, biorąc udział w procesach metabolizmu DNA. Do tej pory zbadano wiele białek SSB wirusów, np. faga T7 [76], faga P1 [77], wirusa Epsteina-Barra (EBV) [78], wirusa *Herpes simplex* [79], mezofilnych bakterii, np. *Streptococcus pneumoniae* [80, 81], *Pseudomonas aeruginosa* [82], *Mycobacterium tuberculosis* [83], oraz termofilnych bakterii, np. *Thermus aquaticus* i *Thermus thermophilus* [84, 85], *Deinococcus radiodurans* [86], *Thermotoga maritima* [87]. Poznano także eukariotyczne białka SSB, nazywane białkami RPA (ang. replication protein A), w tym u człowieka (*hsRPA*) [88], muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [89] i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [90]. Białka wiążące jednoniciowy DNA występują także w mitochondriach, np. ludzkie mitochondrialne białko SSB (*HsmtSSB*) [91]. Ich obecność stwierdzono również u archeonów, np. *Pyrococcus furiosus* [92], *Sulfolobus solfataricus* [93] i *Methanococcus jannaschii* [94].

## 4.4 Budowa białek SSB

Poznane dotychczas białka SSB, mimo różnorodnego pochodzenia (prokariotyczne i eukariotyczne organizmy oraz wirusy), charakteryzują się dwoma wspólnymi cechami strukturalnymi. Pierwszą stanowi obecność silnie zakonserwowanej ewolucyjnie domeny OB (ang. oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold, OB-fold), która jest odpowiedzialna za wiązanie do jednoniciowego DNA, natomiast druga to oligomeryzacja białka, w wyniku której cztery domeny OB tworzą aktywną formę białka SSB. Wśród opublikowanych dotąd białek SSB organizmów prokariotycznych i eukariotycznych występują homotetramery, homodimery oraz heterotrimery [95].

### 4.4.1 Homotetrameryczne białka SSB

U zdecydowanej większości bakterii monomery białek SSB zawierają jedną domenę wiążącą ssDNA. Funkcjonalne białko składa się z czterech takich podjednostek, tworząc homotetramer. Białka o budowie tetrameru występują także u niektórych archeonów, np. białko *SsoSSB*.

Najlepiej poznanym białkiem o budowie homotetramerycznej jest białko SSB *Escherichia coli* (*EcoSSB*) (Rys. 2) o masie cząsteczkowej monomeru wynoszącej 18,98 kDa zawierającego 178 reszt aminokwasowych [96]. W każdej podjednostce białka znajduje się bogata w struktury  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -kartki N-terminalna domena oraz mniej uporządkowana strukturalnie domena C-terminalna. W N-terminalnym fragmencie znajduje się domena wiążąca ssDNA (OB-fold), natomiast fragment C-terminalny, o charakterze kwaśnym, zawiera na swoim końcu ewolucyjnie zakonserwowaną sekwencję sześciu reszt aminokwasowych [97, 98].



Rys. 2 Struktura krystalograficzna *EcoSSB* [PDB 1EQQ].

Zawarte w domenie N-terminalnej reszty aminokwasowe His55, Gln76 oraz Gln110 biorą udział w tetrameryzacji białka *EcoSSB*. W zmutowanych formach białka, w których His55 zastępowano innymi resztami aminokwasowymi, np. tyrozyny czy argininy obserwowano znaczny spadek zdolności ich monomerów do tworzenia struktury tetramerycznej. W mutantach SSB zawierających reszty Arg55 i Lys76 lub Arg55 i Lys110 obserwowano tylko częściową dysocjację do monomerów. Natomiast podstawienia reszt Gln76 i Gln110 resztami lizyny lub tyrozyny wpływało stabilizująco na formę tetrameryczną [99, 100].

Funkcja domeny C-terminalnej nie została jeszcze dokładnie poznana [98]. Stwierdzono, że nie jest ona ani konieczna do formowania tetrameru, ani do wiązania kwasów nukleinowych. Odcinek ostatnich dziesięciu reszt aminokwasowych ma wypadkowy ujemny ładunek, co sprawia, że fragment ten jest oddalony od domeny wiążącej kwas nukleinowy w tetramerze białka związanego z ssDNA. Ponadto, badania zmutowanych białek SSB nie zawierających kwasowego fragmentu C-końcowego wykazały, że nie są one funkcjonalne w komórkach *E. coli* [97]. Mutanty białka *EcoSSB*, pozbawione domeny C-terminalnej lub jej fragmentów, nie są zdolne do wiązania holoenzymu DNA polimerazy III [101], egzonukleazy I [102], glikozylazy uracylowej [103], DNA polimerazy V [104] oraz białek RecQ [105], RecG [106], RecO [107] i PriA [108]. Region ten odgrywa więc ważną rolę w działaniu białek SSB *in vivo* i jest odpowiedzialny za oddziaływania z innymi białkami biorącymi udział w metabolizmie DNA [95]. Sekwencja aminokwasowa między domeną N-terminalną a końcowymi resztami aminokwasowymi domeny C-terminalnej stanowi jedynie łącznik, który oddziela oba te fragmenty [97].

Do białek homotetramerycznych należą również białka SSB wyizolowane z termofilnych bakterii *Thermotoga maritima* (*TmaSSB*) i *Thermotoga neapolitana* (*TneSSB*). Należą one do najmniejszych dotychczas scharakteryzowanych białek wiążących ssDNA, a masa molekularna ich monomerów wynosi odpowiednio 16,3 kDa (*TmaSSB*) i 16,6 kDa (*TneSSB*). Homologia między tymi białkami jest wysoka (90% identyczności), natomiast podobieństwo do *EcoSSB* jest nieco niższe (55% i 56%). Analogicznie do większości bakteryjnych SSB *TmaSSB* i *TneSSB* tworzą homotetramery, zawierające jedną domenę OB w każdym monomerze [87].

Mitochondrialne białka SSB, podobnie jak bakteryjne białka wiążące jednoniciowy DNA, mają budowę homotetrameryczną. Obecne w mitochondriach komórek ludzkich białko SSB (*HsmtSSB*) wykazuje względnie niskie podobieństwo sekwencji aminokwasowej (36%) do bakteryjnego *EcoSSB*. Mimo znacznych różnic w strukturze pierwszorzędowej, *HsmtSSB* posiada bardzo podobną strukturę krystalograficzną i właściwości biofizyczne w porównaniu do SSB *Escherichia coli*. W 1997 roku uzyskano kryształy obu białek i stwierdzono, że wykazują one symetrię D<sub>2</sub> tworząc dwa dimery ułożone względem siebie „głowa do głowy”. Ponadto, na

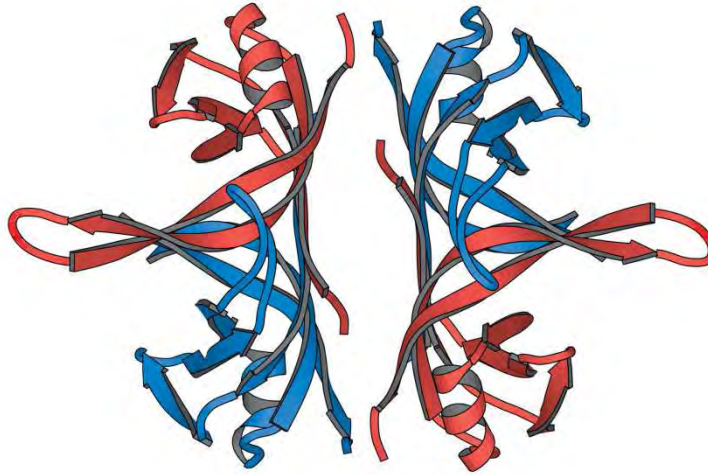
podstawie analizy porównawczej sekwencji aminokwasowych obu białek, wykazano, że ludzkie mitochondrialne białko SSB nie posiada fragmentu C-końcowego istotnego dla oddziaływań z innymi białkami u bakteryjnych SSB [109].

Monomer białka SSB *Sulfolobus solfataricus* składa się ze 148 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 16,2 kDa. SsoSSB jest interesującym białkiem ze względu na swoją multimeryczność oraz właściwości strukturalne. W roztworze wspomniane białko występuje w postaci monomeru, natomiast w kompleksie z kwasem nukleinowym tworzy multimeryczne formy, głównie tetrameryczne. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że domena OB SsoSSB jest wysoce homologiczna do domen wiążących ssDNA innych archeonów, natomiast fragment C-terminalny jest podobny do analogicznego fragmentu bakteryjnych białek SSB. Ponadto, nie zaobserwowano motywu palca cynkowego, który jest charakterystyczny dla białek SSB *Euryarchaea* i *Eukaryota*. Uzyskana w 2003 roku struktura krystalograficzna SsoSSB potwierdza wysokie podobieństwo domeny wiążącej DNA do domen OB białek RPA. Jednak pod względem biochemicznym białko to przypomina bakteryjne SSB [93, 110, 111, 112].

#### 4.4.2 Homodimeryczne białka SSB

Białka SSB o budowie homodimerycznej zostały odkryte stosunkowo niedawno. W 2002 roku zespół badawczy Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej otrzymał dwa białka SSB z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus* (*TaqSSB*) i *Thermus thermophilus* (*TthSSB*) [84, 85]. Monomery tych białek zawierają odpowiednio 263 (*TthSSB*) i 264 (*TaqSSB*) reszty aminokwasowe, a podobieństwo między tymi białkami jest wysokie i wynosi 90%. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wykazano, że w monomerach obu białek obecne są dwie domeny wiążące ssDNA: N-końcowa i C-końcowa. Za C-końcową domeną OB znajduje się również ujemnie naładowany fragment około dwudziestu reszt aminokwasowych. Identyczność domeny N-końcowej tych białek do N-końcowej domeny *EcoSSB* wynosi 32% dla *TthSSB* i 33% dla *TaqSSB*. Fragment C-końcowy obu białek zawiera dwa rejony homologiczne do białka wiążącego ssDNA *E. coli*. Pierwszy rejon od 126 do 239 reszty aminokwasowej jest nie tylko analogiczny do N-końcowej domeny tych termostabilnych białek, ale również do N-końcowego fragmentu białka *EcoSSB* (37% identyczności dla *TaqSSB* i 40% identyczności dla *TthSSB*). Drugi rejon obejmuje silnie zakonserwowaną sekwencję czterech ostatnich reszt aminokwasowych (DIPF). Na podstawie tej analizy zaproponowano, że aktywną formę białek *TaqSSB* i *TthSSB* stanowią homodimery – nowy stopień oligomeryzacji wśród bakteryjnych białek SSB [85]. Dimeryczność tych białek została potwierdzona późniejszymi badaniami krystalograficznymi (Rys. 3) [113, 114]. Homodimer tych białek SSB zawiera cztery domeny

wiążące ssDNA, ale tylko dwa C-końcowe fragmenty biorące udział w oddziaływaniach z innymi białkami.

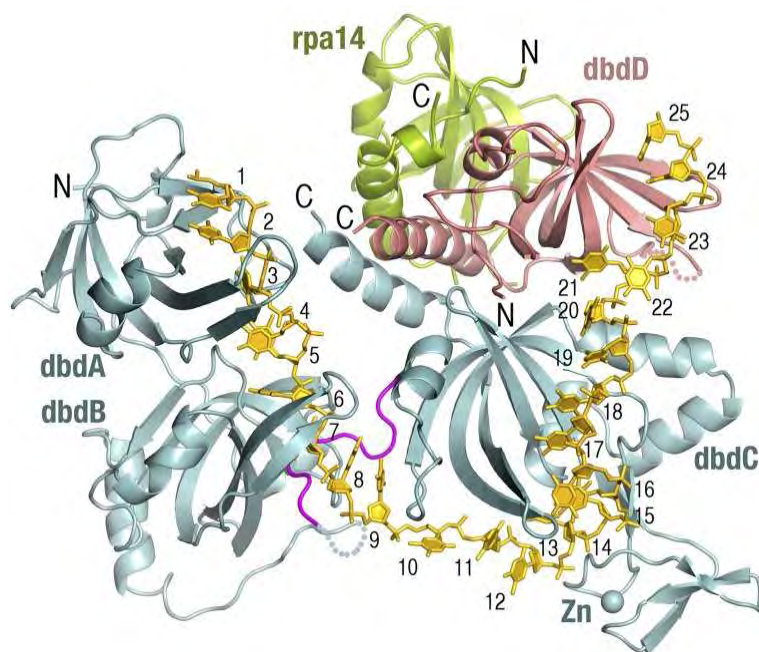


Rys. 3 Struktura krystalograficzna dimeru *TaqSSB*. Kolorem niebieskim oznaczono domeny N-terminalne, natomiast kolorem czerwonym - domeny C-terminalne monomerów [113].

Homodimery występują także wśród białek SSB bakterii rodzaju *Deinococcus*, (np. *D. radiodurans*, *D. grandis*, *D. proteolyticus*, *D. radiopugnans*, *D. murrayi*, *D. geothermalis*) [115, 116, 117, 118, 119]. Bakterie *D. radiodurans* wykazują wysoką oporność na promieniowanie radiacyjne i wyjątkowo dużą zdolność do naturalnej transformacji. Te niezwykle właściwości mają związek z istnieniem bardzo wydajnych procesów rekombinacji i naprawy DNA u tych bakterii. W komórkach *D. radiodurans* znajduje się średnio 19500 cząsteczek białka SSB, podczas gdy *E. coli* posiada ich od 300 do 2000 w komórce. Ilość cząsteczek *DraSSB* może wzrosnąć nawet do 56000 pod wpływem promieniowania radiacyjnego. Dane te ukazują bardzo istotny udział białek SSB w procesach ochrony i naprawy DNA [120]. W 2004 roku scharakteryzowano białko wiążące jednoniciowy DNA *D. radiodurans*, *DraSSB*, oraz uzyskano jego strukturę krystalograficzną [86, 121]. *DraSSB* składa się z dwóch monomerów długości 301 reszt aminokwasowych o łącznej masie cząsteczkowej 65 kDa i jest jednym z największych odkrytych dotąd białek SSB. Każdy monomer tego białka zawiera dwie domeny OB połączone ze sobą przez  $\beta$ -skręt. Ponadto monomery *DraSSB* wykazują asymetryczną budowę, ponieważ domeny OB nie są identyczne. Wykazano, że C-końcowa domena ma większe powinowactwo do ssDNA, ponieważ zawiera aż cztery reszty aminokwasowe analogiczne do reszt biorących udział w wiązaniu kwasu nukleinowego u *EcoSSB* [86, 120, 121].

#### 4.4.3 Heterotrimeryczne białka SSB

Białka SSB organizmów eukariotycznych i archenów podkrólestwa *Euryarchaea* określane są białkami RPA (ang. replication protein A) i występują w postaci heterotrimerów (Rys. 4). Zawierają aż sześć domen OB, ale tylko cztery z nich wiążą się z jednoniciowym DNA.



Rys. 4 Struktura krystalograficzna heterotrimeru RPA związanego z ssDNA. Kolorem jasnoniebieskim oznaczono podjednostkę RPA70, kolorem różowym – podjednostkę RPA32, kolorem zielonym – podjednostkę RPA14, kolorem żółtym – fragment jednoniciowego DNA, kolorem fioletowym – łącznik między domenami DBD-B i DBD-C. Nukleotydy nici DNA ponumerowano od 1 do 25, rozpoczynając od końca 5' DNA. Struktura nie zawiera N-terminalnej domeny podjednostki RPA70 [122].

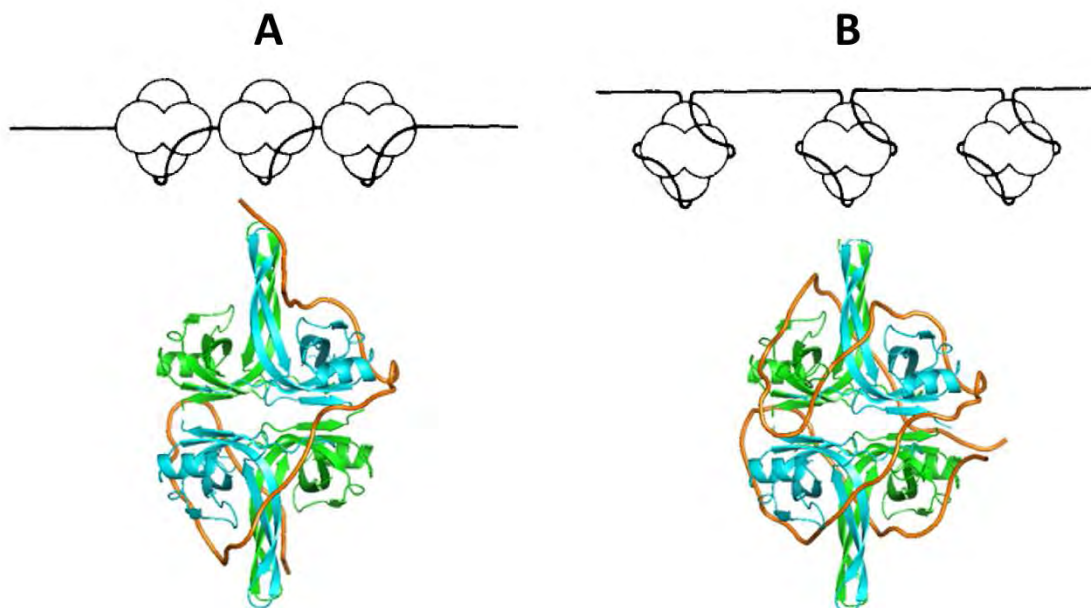
Pierwszym odkrytym eukariotycznym białkiem SSB było ludzkie białko RPA (*hsRPA*), które początkowo zidentyfikowano jako czynnik niezbędny do replikacji wirusa SV40 *in vitro* [88]. Białko składa się z trzech podjednostek o różnej wielkości: 70 kDa, 32 kDa i 14 kDa [123], kodowanych przez oddzielne geny. Podjednostka RPA70 zawiera cztery domeny o różnych funkcjach: N-końcową biorącą udział w oddziaływaniach z innymi domenami oraz trzy ułożone tandemowo domeny OB (określane w białkach RPA jako domeny DBD): DBD-A, DBD-B i DBD-C. Domena DBD-C RPA70 jest jednocześnie domeną C-końcową uczestniczącą w wiązaniu mniejszych podjednostek RPA32 i RPA14. Domeny DBD-A i DBD-B tworzą kanał wiążący jednoniciowy DNA, który składa się z 15 reszt aminokwasowych, natomiast domena DBD-C tworzy zakonserwowany w białkach RPA motyw „palca cynkowego” i stymuluje wiązanie ssDNA. Trzy domeny tworzą średnią podjednostkę RPA32. Pierwsza to wydłużona i nieuporządkowana domena N-końcowa, która jest najbardziej ufosforylowanym fragmentem *hsRPA*. Centralną część RPA32 stanowi, odpowiedzialna za wiązanie jednoniciowego DNA,

domena DBD-D, natomiast domena C-końcowa zaangażowana jest w oddziaływania z innymi białkami. Tylko jedna strukturalna domena jest obecna w podjednostce RPA14, a jej C-końcowy odcinek wraz z domenami DBD-C i DBD-D bierze udział w procesie trimeryzacji funkcjonalnego białka RPA [124, 125, 126, 127]. Natomiast wysoce zakonserwowany motyw „palca cynkowego” jest niezbędny w procesach replikacji i naprawy mutacji punktowych [128].

Przykładem archeona, u którego stwierdzono obecność białka RPA, jest *Pyrococcus furiosus*. Białko RPA *P. furiosus* (*PfuRPA*) stanowi trimeryczny kompleks podobny do *hsRPA*, złożony z podjednostek: RPA41, RPA32 oraz RPA14. Sekwencja aminokwasowa największej podjednostki jest homologiczna do eukariotycznego monomeru RPA70 i zawiera dwie domeny OB oraz motyw „palca cynkowego”. Natomiast mniejsze podjednostki RPA32 i RPA14 nie wykazują homologii do żadnych znanych białek SSB i RPA [92].

#### 4.5 Mechanizm wiązania białek SSB do ssDNA

Badania nad oddziaływaniami białek SSB z jednoniciowym DNA wykazały istnienie różnych rodzajów kompleksów SSB-DNA. Do oznaczenia tych kompleksów stosuje się skrót  $(SSB)_n$ , w którym  $n$  oznacza liczbę nukleotydów wiązanych przez tetramer białka SSB. Długość miejsca wiązania ssDNA przez białko zależy od siły jonowej roztworu, w tym kationów jednowartościowych i dwuwartościowych, stężenia samego białka, pH oraz temperatury [129]. Wykazano, że tetramer białka *EcoSSB* tworzy dwa podstawowe typy wiązania:  $(SSB)_{35}$  i  $(SSB)_{65}$ , w zależności od stężenia soli w roztworze (Rys. 5) [130].



Rys. 5 Modele wiązania tetrameru *EcoSSB* z ssDNA:  $(SSB)_{35}$  (A) i  $(SSB)_{65}$  (B) [130, 131].

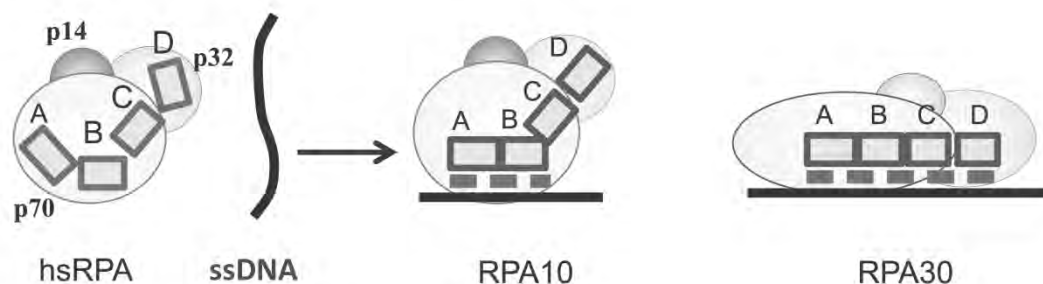
Przy niskim stężeniu soli ( $\leq 10$  mM NaCl) i wysokim stężeniu białka powstaje kompleks  $(SSB)_{35}$ , natomiast przy wysokim stężeniu soli ( $\geq 200$  mM NaCl) i niskim stężeniu białka powstaje kompleks  $(SSB)_{65}$ . Aktywny homotetramer *EcoSSB* zawiera cztery identyczne domeny OB, po jednej w każdym monomerze. W kompleksie typu  $(SSB)_{35}$  białko *EcoSSB* wiąże w sposób kooperatywny długie fragmenty ssDNA wykorzystując do wiązania jedynie dwie domeny OB tetramery. Dzięki temu możliwe jest tworzenie długich klasterów białka na nici DNA. Cztery domeny OB tetramery *EcoSSB* zaangażowane są w wiązanie fragmentu jednoniciowego DNA w kompleksie  $(SSB)_{65}$ , przy czym kooperatywność tego wiązania jest stosunkowo niska i nie powstają długie klasterki białkowe [132, 133, 134]. Wykazano również tworzenie się pośrednich kompleksów:  $(SSB)_{40}$  i  $(SSB)_{56}$  przy stężeniach soli w zakresie 10-200 mM NaCl [135, 136]. Zdolność białek SSB do tworzenia różnych typów kompleksów z ssDNA, zależną od warunków buforowych, można wykorzystać w celu regulacji i koordynacji procesów replikacji, naprawy oraz rekombinacji DNA [137].

Pierwsze badania nad mechanizmem wiązania białek SSB do jednoniciowego DNA były oparte na zjawisku wygaszania fluorescencji reszt tryptofanowych białka *EcoSSB* w miarę wzrostu stężenia oligonukleotydu poly(dT). W przypadku kompleksu  $(SSB)_{65}$ , w którym wszystkie domeny biorą udział w wiązaniu ssDNA, wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych zachodzi na poziomie 90%. Natomiast w modelu  $(SSB)_{35}$  wygaszanie fluorescencji tryptofanu wynosi około 50%, co ma związek z tym, że tylko połowa ważnych dla wiązania reszt tryptofanowych jest zaangażowana w oddziaływanie z oligonukleotydem. Na podstawie wyników tych doświadczeń stwierdzono, że reszty tryptofanu biorą udział w wiązaniu ssDNA przez białko SSB [130, 135, 138]. W monomerze białka *EcoSSB* obecne są cztery reszty tryptofanowe w pozycjach: 40, 54, 88 oraz 135. Na podstawie analiz spektroskopowych stwierdzono, że reszty tryptofanu w pozycjach 40 i 54 są zaangażowane w wiązanie ssDNA, a ich fluorescencja jest prawie całkowicie wygaszana. Dzięki wykorzystaniu mutagenyzy ukierunkowanej skonstruowano szereg mutantów białek SSB, w których reszty tryptofanu zastąpiono innymi resztami aminokwasowymi. Białka te miały znacznie obniżoną zdolność do wiązania jednoniciowego DNA, a w mutantach pozbawionych Trp54 istotną rolę w wiązaniu odgrywała reszta Trp88. Natomiast brak reszty tryptofanu w pozycji 135 nie wpływał na wiązanie białka do ssDNA. Obserwując wrażliwość na promieniowanie UV komórek bakteryjnych ze zmutowanym białkiem SSB, wykazano, że do pełnej aktywności białka niezbędne są reszty Trp54 i Trp88 [139, 140]. Istotną rolę w wiązaniu nici DNA przez *EcoSSB* odgrywa reszta fenyloalaniny w pozycji 60. Skutkiem zamiany tego aminokwasu na resztę alaniny był spadek powinowactwa białka do jednoniciowego DNA. Substytucje Phe60 resztami Leu, Val, Tyr i His nie powodowały zmian konformacji białka *EcoSSB*, natomiast obecność reszt



Trp lub Ser w tej pozycji powodowała istotną zmianę struktury białka. Zaobserwowano, że podstawienie Phe60 aromatyczną resztą aminokwasową powoduje zwiększenie powinowactwa SSB do jednoniciowego DNA. Natomiast substytucje Phe60 pozostałymi resztami powodowały obniżenie zdolności *EcoSSB* do wiązania ssDNA [141, 142, 143]. Analiza termodynamiczna wiązania *EcoSSB* do ssDNA wskazała istotny udział oddziaływań elektrostatycznych w wiązaniu kwasu nukleinowego [144, 145]. Reszty lizyny oraz N-koniec białka SSB poddano chemicznym modyfikacjom. Wykazano, że acetylacja reszt Lys43, Lys62, Lys73 i Lys87 oraz grupy aminowej N-końca białka powoduje znaczny spadek powinowactwa tak zmodyfikowanego *EcoSSB* do ssDNA [146]. Domena C-terminalna białka *EcoSSB* nie bierze udziału w wiązaniu jednoniciowego DNA. Zaobserwowano jednak, że silnie zakonserwowany fragment ostatnich 10 reszt aminokwasowych tej domeny jest odpowiedzialny nie tylko za oddziaływanie z innymi białkami, ale również za zdolność białka SSB do obniżania temperatury topnienia dwuniciowego DNA [147].

Białka RPA również tworzą różne typy wiązań w zależności od długości fragmentu ssDNA, z których dwa zostały najlepiej poznane: RPA10 i RPA30 (Rys. 6) [124, 148, 149].



Rys. 6 Modele wiązania trimeru *hsRPA* do ssDNA [137].

Pierwszy, mniej stabilny, kompleks RPA10 powstaje podczas wiązania fragmentu jednoniciowego DNA długości 8-10 nukleotydów. W wiązaniu tym biorą udział tylko dwie domeny dużej podjednostki RPA70: DBD-A i DBD-B [124]. Natomiast w najbardziej stabilnym kompleksie RPA30 trzy domeny podjednostki RPA70 (DBD-A, DBD-B, DBD-C) i jedna domena podjednostki RPA32 (DBD-D) są zaangażowane w wiązanie 30-nukleotydowego fragmentu ssDNA. Zaobserwowano, że w taki sam sposób białko RPA może także wiązać fragment DNA długości 17 nukleotydów (kompleks RPA17) [149, 150]. Badania dotyczące modyfikacji powinowactwa RPA do ssDNA wskazują na konkretną orientację eukariotycznych białek SSB w stosunku do nici DNA. Podjednostka RPA70 bardziej efektywnie wiąże fragment 5' jednoniciowego DNA, natomiast RPA32 silniej oddziałuje z regionem blisko końca 3' DNA [150, 151, 152]. Zaobserwowano również, że podczas wiązania 10-nukleotydowego ssDNA

może być zaangażowana najmniejsza podjednostka białka RPA, RPA14 [153]. Wiadomo, że podjednostka ta jest niezbędna do funkcjonowania komórek, co sugeruje, że typ kompleksu z jej udziałem odgrywa istotną rolę w interakcji z DNA podczas procesów replikacji i naprawy. Analizując modele wiązania RPA30, wskazano aromatyczne reszty aminokwasowe, które są kluczowe dla wiązania jednoniciowego DNA. Należą do nich: Phe238 i Phe269 (domena DBD-A), Trp361 i Phe386 (domena DBD-B), Phe532 i Tyr581 (domena DBD-C) oraz Trp107 i Phe135 (domena DBD-D) [148].

Homodimeryczne białka SSB bakterii rodzaju *Deinococcus* i *Thermus* posiadają dwie domeny OB w każdym z monomerów. Sekwencja aminokwasowa domeny N-końcowej i C-końcowej jest różna, co powoduje, że białka te nie wykazują budowy symetrycznej tak jak białka tetrameryczne, złożone z identycznych domen wiążących ssDNA. Pod względem składu aminokwasowego domena C-końcowa białka SSB *D. radiodurans* (*DraSSB*) jest bardziej homologiczna do domeny OB *EcoSSB* niż domena N-końcowa. W C-końcowej domenie OB *DraSSB* obecne są cztery reszty aminokwasowe (Tyr-164, Tyr-177, Trp-183, Trp-210) biorące udział w wiązaniu ssDNA analogiczne do reszt występujących u *EcoSSB* (Trp-40, Trp-54, Phe-60, Trp-88), podczas gdy N-końcowa domena zawiera tylko dwie zakonserwowane reszty o tej funkcji (Tyr-53, Trp-88). Występowanie różnic w sekwencji reszt aminokwasowych ważnych dla wiązania jednoniciowego DNA wpływa na efektywność tego oddziaływania. Podczas analizy sekwencji aminokwasowej białka *DraSSB* poszukiwano również reszt homologicznych do reszt Lys62 i Lys73, które u *EcoSSB* są także istotne w wiązaniu ssDNA. W domenie N-terminalnej *DraSSB* te reszty są zakonserwowane i są to: Lys61 i Lys71, natomiast w domenie C-terminalnej są to reszty Asp185 oraz Lys195. Różnice te powodują, że poszczególne domeny OB białka SSB *D. radiodurans* wiążą ssDNA z różną siłą. Analiza strukturalna dimeru *DraSSB* wykazała, że w proces dimeryzacji zaangażowane są tylko reszty aminokwasowe domen N-terminalnych (Arg16, Arg21, Tyr22, Glu31, Tyr53, Arg55), co przyczynia się do mniejszego udziału tych domen w wiązaniu jednoniciowego DNA [121].

## 4.6 Funkcje białek SSB

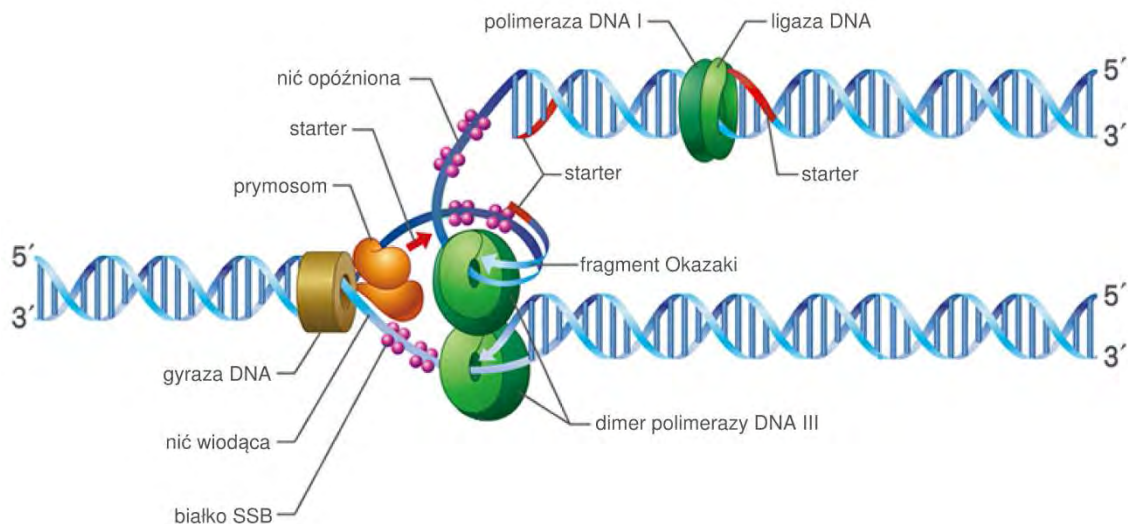
### 4.6.1 Rola białek SSB w replikacji DNA

Replikacja DNA umożliwia przekazywanie informacji genetycznej z komórki rodzicielskiej do komórek potomnych. Proces ten zachodzi w sposób prawie doskonały i zapewnia stabilność genetyczną wszystkich rozwijających się organizmów żywych. Wierność syntezy nowych nici DNA jest zapewniana nie tylko dzięki precyzyjnemu procesowi replikacji, ale także dzięki sprawnym mechanizmom wykrywania i naprawy błędów lub uszkodzeń powstałych w trakcie

i po amplifikacji. Podczas replikacji dochodzi do rozplatania podwójnej helisy DNA, a każda pojedyncza nić staje się matrycą do syntezy komplementarnej nici potomnej (mechanizm semikonserwatywny). W procesie replikacji bierze udział wiele białek, z których większość została już dobrze poznana.

Inicjacja replikacji w komórkach *E. coli* rozpoczyna się w loci *oriC*. To unikalna sekwencja długości 245 pz, która zwiera cztery dziewięcionukleotydydowe miejsca wiązania dla białka DnaA i trzy ułożone tandemowo trzynastonukleotydydowe fragmenty bogate w pary AT [154, 155, 156]. Duża zawartość zasad adeniny i tyminy w tych powtórzeniach ułatwia topnienie dupleksu DNA przez rozpoczęciem syntezy. Ponadto każdy trzynastonukleotydydowy fragment zawiera sekwencję GATC, która jest miejscem metylacji dla metylotransferazy adeninowej. Metylacja adeniny w tej sekwencji jest jednym z procesów regulujących inicjację kolejnej rundy replikacyjnej [157, 158]. Pierwszą fazę inicjacji replikacji stanowi aktywacja miejsca *oriC* przez transkrypcję, w wyniku której dochodzi do zwinięcia tego odcinka DNA w dodatkowe ujemne superskręty, które są niezbędne do otwarcia dupleksu. W tym czasie nagromadzone podczas wzrostu komórki białka DnaA zaczynają tworzyć kompleksy po 20-40 cząsteczek naraz i przyłączają się do miejsca *oriC*, tworząc tzw. kompleks zamknięty [155]. Przyłączenie białek DnaA następuje przy udziale ATP oraz białek histonopodobnych powodując rozwijanie nici w miejscach bogatych w pary AT (kompleks otwarty) [159]. Do tak wyeksponowanego fragmentu DNA przyłącza się białko DnaB, które jest ATP-zależną helikazą [160, 161]. Helikaza jest połączona z białkiem DnaC w postaci heksameru  $(DnaB)_6(DnaC)_6$ . W tym kompleksie DnaC jest jedynie przenośnikiem i jest uwalniane zaraz po przyłączeniu się DnaB do widełek replikacyjnych utworzonych przez jednoniciowy DNA [162, 163, 164]. Helikaza DnaB kontynuuje rozwijanie nici DNA wypierając niepotrzebne już na tym etapie białko DnaA. Rozwijane fragmenty jednoniciowego DNA są stabilizowane przez białka SSB. Do powstałego oczka replikacyjnego wiąże się białko DnaG (prymaza DNA), które jest wyspecjalizowaną polimerazą RNA [165]. Prymaza DNA syntetyzuje starter RNA, od którego rozpoczyna się synteza DNA na nici wiodącej. Podczas przesuwania się białka DnaB wzdłuż nici DNA, w wyniku rozwijania dwuniciowej helisy, powstają dodatnie superskręty, które są usuwane przez gyrazę. Ruchomy kompleks złożony z helikazy DnaB i prymazy nazywany jest prymosomem i odpowiada za syntezę starterów w odległości 1000-2000 nukleotydów na nici opóźnionej. Opóźnienie syntezy na nici opóźnionej jest równe długości jednego fragmentu Okazaki. Synteza nici opóźnionej zachodzi zgodnie z kierunkiem przesuwania się widełek replikacyjnych dzięki zapętleniu matrycy, które powstaje podczas syntezy startera. Pętla powiększa się aż do momentu napotkania uprzednio zsyntetyzowanego fragmentu Okazaki. W procesie elongacji, złożony z wielu podjednostek, holoenzym polimerazy DNA III odpowiada za wydłużanie

starterów obu nici. Polimeraza DNA III występuje w postaci dimeru, co umożliwia jednoczesną syntezę na obu niciach DNA, a powstające podczas tego procesu błędy są usuwane dzięki aktywności 3'→5' egzonukleazy, którą wykazuje ten enzym. Wydłużone startery na nici opóźnionej są usuwane, a następnie uzupełniane przez polimerazę DNA I. Powstałe fragmenty Okazaki są następnie łączone wiązaniami fosfodiesterowymi z udziałem ligazy. Kompleks holoenzymu polimerazy DNA III i prymosomu nazywany jest replisomem, który rozpada się po zakończeniu procesu replikacji (Rys. 7) [157, 166, 167].



Rys. 7 Schemat replikacji DNA z zaznaczeniem najważniejszych białek biorących udział w procesie [168].

Zasadniczą funkcją białek SSB w replikacji jest stabilizacja jednoniciowego fragmentu DNA. Białka SSB zabezpieczają ssDNA przed tworzeniem struktur drugorzędowych i chronią je przed działaniem nukleaz oraz zapobiegają ponownemu łączeniu rozdzielonych komplementarnych nici DNA. Ponadto wspomagają działanie enzymów zaangażowanych w proces replikacji. Stymulują zdolność do destabilizacji helisy DNA przez helikazy oraz tworzenie prymosomu, a także zwiększają wierność i procesywność polimeraz DNA [157].

Helikaza DnaB *E. coli* jest ssDNA-zależną ATP-azą i ma zdolność rozwijania helisy DNA o strukturze przypominającej widełki replikacyjne. Obecność białka SSB jest niezbędna do wydajnego i sprawnego działania tego enzymu [169, 170, 171]. Zaobserwowano, że zarówno białko *EcoSSB* jak i heterologiczne białka SSB stymulują aktywność helikazy DnaB. Stymulacja jednak zachodzi w inny sposób dla białek różnych od SSB *E. coli* [169]. W przeciwieństwie do *EcoSSB*, heterologiczne białka SSB wywierały stymulujący wpływ na helikazy jedynie w wąskim zakresie stężeń. W nieobecności substratu DNA (widełki replikacyjne), aktywność ATP-azy w tym enzymie była hamowana przez białko *EcoSSB*, podczas gdy inne białka SSB tylko nieznacznie zmniejszały stopień hydrolizy ATP. Białko *EcoSSB* zatem koordynuje i łączy

aktywność ATP-azy z aktywnością helikazy zapobiegając nieproduktywnej hydrolizie ATP przez białko DnaB. Różnice w strukturze badanych białek i związane z nimi różne oddziaływanie z domeną ssDNA-zależnej ATP-azy są przyczyną różnego wpływu białek SSB na białka DnaB [169, 171].

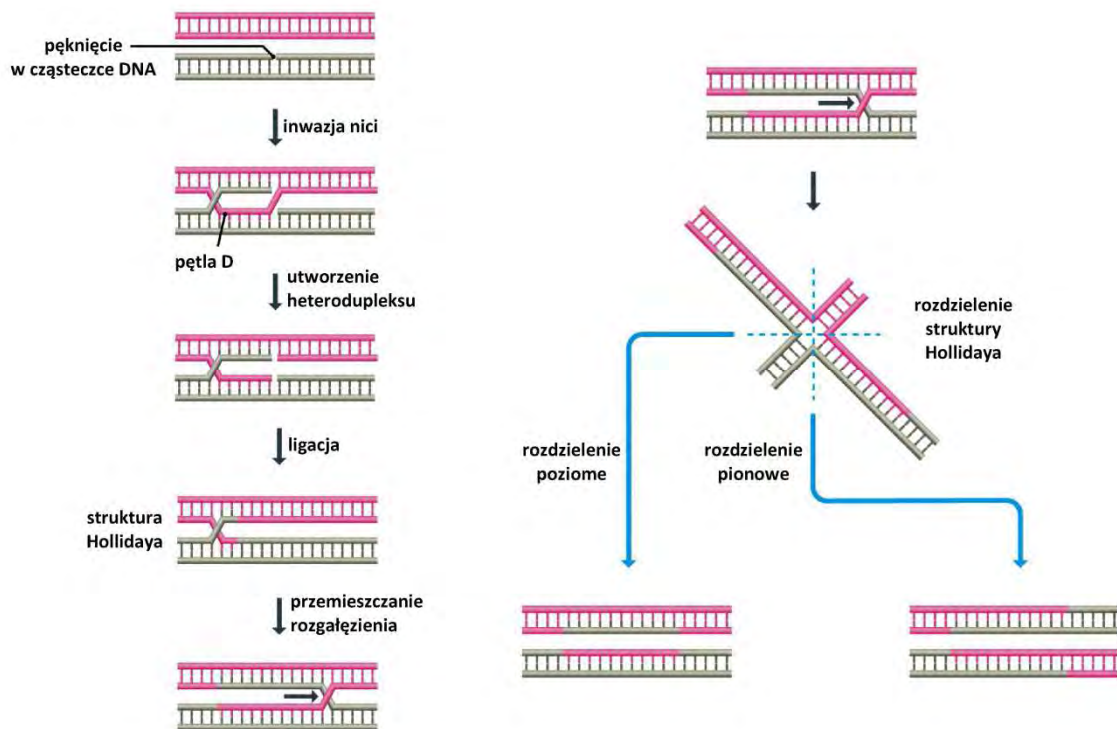
Wiele polimeraz DNA jest podatnych na popełnianie błędów podczas replikacji prowadzących do powstania delecji. Błędy te powstają podczas „ślizgania się” polimeraz wzdłuż krótkich powtórzeń sekwencji DNA i występują zarówno w komórkach prokariotycznych jak i komórkach eukariotycznych. Do polimeraz podatnych na popełnianie błędów w wyniku poślizgu zaliczane są m.in. holoenzym DNA polimerazy III, DNA polimeraza II i DNA polimeraza I *E. coli*, DNA polimeraza faga T4 oraz DNA polimeraza faga T7. Niska procesywność polimeraz sprzyja tworzeniu się heterodupleksów DNA, natomiast wysoka procesywność, związana z rzadszą dysocjacją enzymu od DNA, przyczynia się do tworzenia cząsteczek identycznych do DNA matrycowego. Białko *EcoSSB* zwiększa procesywność holoenzymu polimerazy DNA III i jednocześnie hamuje jej poślizg podczas procesu replikacji. Obserwacja ta dotyczy różnych polimeraz DNA. Zaobserwowano również, że częstość występowania błędów wskutek poślizgu polimeraz maleje ze wzrostem ich zdolności do rozplatania helisy DNA [172]. Stymulujący wpływ białek SSB na polimerazy DNA odbywa się poprzez zapobieganie tworzeniu się struktur drugorzędowych DNA i nieefektywnemu wiązaniu polimeraz z ssDNA, zwiększanie powinowactwa do kompleksu ssDNA-starter RNA i zwiększanie procesywności oraz przez oddziaływanie typu białko-białko [69, 101, 172, 173, 174, 175].

Inicjacja replikacji chromosomalnego DNA człowieka jest procesem złożonym i nie do końca poznanym. Udowodniono, że białko *hsRPA* jest niezbędne w tym procesie i nie może być zastąpione prokariotycznymi białkami SSB. Na inicjację replikacji *in vitro* mają wpływ specyficzne dla *hsRPA* przeciwciała, które w nieobecności tego białka nie dopuszczają do rozpoczęcia procesu. Przeciwciała te jednak nie mają wpływu na elongację replikacji. Białko *hsRPA* jest więc niezbędne w inicjacji replikacji i nie odgrywa istotnej roli na etapie elongacji [176]. Ludzkie białko RPA wywiera także korzystny wpływ na helikazy z rodziny RECQ zaangażowane w proces replikacji. W organizmie ludzkim stwierdzono obecność pięciu białek z tej grupy, w tym helikazę RECQ1, która jest zdolna do rozplatania krótkich fragmentów helisy DNA długości około 30 pz. Badania wykazały, że białko *hsRPA* ponad trzykrotnie zwiększa procesywność helikazy RECQ1 *in vitro*, a *EcoSSB* nie wywiera żadnego wpływu na ten enzym. Zatem ludzkie białko RPA specyficznie stymuluje aktywność helikazy RECQ1, a powstałe oddziaływanie odgrywa istotną rolę w metabolizmie DNA [177].

#### 4.6.2 Rola białek SSB w rekombinacji DNA

Rekombinacja jest procesem wymiany fragmentów nici między homologicznymi (rekombinacja ogólna, homologiczna, uprawniona) i niehomologicznymi (rekombinacja nieuprawniona, niehomologiczna) cząsteczkami DNA. Dzięki rekombinacji DNA dochodzi do wzrostu różnorodności genetycznej komórek i organizmów. Dochodzi również do naprawy uszkodzeń, które mają miejsce w obu niciach i których naprawa poprzez wycinanie uszkodzonych fragmentów i ponowną syntezę nie jest możliwa z powodu braku nieuszkodzonej matrycy. Wymiana fragmentów uszkodzonej cząsteczki z nieuszkodzoną cząsteczką DNA pozwala na przeżycie komórki. W komórkach *E. coli* większość procesów rekombinacji homologicznej odbywa się za pośrednictwem szlaku RecBCD. Jeśli szlak ten zostanie inaktywowany, np. przez mutację, wówczas jego rolę może przejąć szlak RecE. Natomiast, gdy inaktywacji ulegnie szlak RecE, zostaje on zastąpiony szlakiem RecF, który jest dominującym procesem w rekombinacyjnej naprawie DNA [178].

Rekombinacja homologiczna rozpoczyna się od równoległego względem siebie ułożenia homologicznych dupleksów DNA, po którym w jednej z cząsteczek DNA dochodzi do jednoniciowego pęknięcia. Wytworzony wolny koniec DNA dokonuje inwazji nienaruszonej podwójnej helisy w homologicznej pozycji i wypiera jedną z jej nici. Dochodzi do utworzenia trójniciowego fragmentu DNA, nazywanego pętlą D (ang. D-loop). W wyniku przecięcia wypchniętej nici w miejscu połączenia rejonu jedno- i dwuniciowego powstaje heterodupleks DNA. W kolejnym etapie następuje łączenie powstałych na niciach DNA przerw przez ligazę i tworzy się struktura w formie krzyża, zwana strukturą Hollidaya. Ta dynamiczna struktura może ulegać geometrycznym rearanżacjom, które zmieniają ustawienie nici wobec siebie (izomeryzacja nici). Miejsce skrzyżowania nici DNA może ulegać przesunięciu (ang. branch migration) w obrębie rekombinujących cząsteczek powodując wydłużenie heterodupleksu i umożliwiając wymianę dłuższych fragmentów. Rozdzielenie struktury Hollidaya następuje poprzez nacięcie nici i ich ponowną ligację, z wytworzeniem różnych produktów końcowych w zależności od sposobu przecięcia tej struktury. Gdy przecięciu ulegają nici dokonujące inwazji, powstają dwie cząsteczki różniące się od macierzystych tylko wymienionymi fragmentami. Natomiast przecięcie nici, które nie dokonały inwazji, prowadzi do powstania cząsteczek, których jedna połowa pochodzi od macierzystego dupleksu DNA, a druga – od drugiego dupleksu. Ten ostatni mechanizm jest klasycznym procesem crossing-over (Rys. 8) [62, 178].



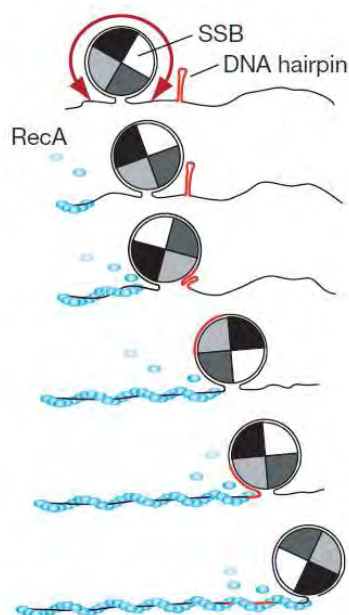
Rys. 8 Model rekombinacji homologicznej Hollidaya zmodyfikowany przez Meselsona i Raddinga [178].

W rekombinacji homologicznej biorą udział białka RecB, RecC i RecD, które tworzą kompleks RecBCD. Kompleks ten, dzięki aktywności helikazy (RecB i RecD) i nukleazy (RecC), w obecności ATP generuje jednoniciowe fragmenty DNA z dwuniciowego DNA i rozplata helisę kwasu nukleinowego. Następnie białko RecA, w obecności ATP, tworzy filamentarne struktury z ssDNA zdolne do inwazji nienaruszonego łańcucha helisy DNA i utworzenia pętli D. Dzięki podobieństwu sekwencji rekombinujących cząsteczek powstają komplementarne oddziaływania między przenoszoną nicią a nienaruszonym łańcuchem DNA, które stabilizują powstałe regiony heterodupleksowe. Proces przemieszczania się ramion struktury Hollidaya katalizowany jest przez białka RuvA i RuvB, a towarzyszące mu napięcia torsyjne znoszone są przez enzym topoiomerazę I. Natomiast białko RuvC jest nukleazą odpowiedzialną za rozdzielenie struktury Hollidaya [62, 167, 178].

Do białek niezbędnych w procesie rekombinacji należy białko SSB, którego rola polega na wiązaniu i stabilizacji jednoniciowego DNA, powstałego w wyniku działania kompleksu białek RecBCD. Białka SSB zapobiegają również degradacji jednoniciowych fragmentów DNA przez nukleazy, w tym hamują aktywność nukleolityczną kompleksu RecBCD [68, 179]. Białko SSB stabilizuje także kompleks RecA-ssDNA sprawiając, że formowanie pętli D jest procesem stosunkowo szybkim i nieodwracalnym. W nieobecności białka SSB również powstają kompleksy RecA-ssDNA, ale nie są one stabilne wystarczająco długo, aby zaszła kompletna

wymiana nici. Wówczas najwolniejszym etapem procesu rekombinacji jest tworzenie pętli D. W obecności białka SSB etapem limitującym szybkość tego procesu jest przemieszczanie się struktury Hollidaya. Przyłączenie się białka RecA do ssDNA jest hamowane w niskich stężeniach soli i wysokich stężeniach SSB, natomiast przy wysokich stężeniach soli faworyzowane jest tworzenie filamentów RecA-ssDNA [180, 181, 182]. Badając zmutowane formy białka RecA, w których usuwano C-terminalne reszty aminokwasowe, zaobserwowano, że wykazują one większą zdolność wypierania białka SSB z kompleksu z ssDNA, niż natywne białko RecA. Im większa była delecja w białku RecA, tym łatwiej wypierało ono białko SSB. RecA posiada więc naturalną zdolność do wypierania cząsteczek SSB z kompleksów z jednoniciowym DNA, która jest hamowana przez obecność C-terminalnego końca w tym białku [183]. Badano również białka RecO i RecR, które uważano za czynniki wspomagające RecA w pokonaniu hamującego wpływu SSB [184]. Okazało się jednak, że białka te nie są zdolne do wypierania białka SSB z jego kompleksów z jednoniciowym DNA. Białko RecO oddziałuje fizycznie z białkami RecR i SSB, przy czym oddziaływanie RecO-SSB jest silniejsze niż RecO-RecR. Zaobserwowano, że białko RecA wiąże się znacznie efektywniej do kompleksów RecO-RecR-SSB-ssDNA niż SSB-ssDNA. Ponadto kompleksy RecO-RecR-SSB-ssDNA wykazują większą aktywność w tworzeniu filamentów RecA-ssDNA niż sam kompleks SSB-ssDNA [185]. Sposób wypierania białka SSB z kompleksu z ssDNA tłumaczy przedstawiony w 2009 roku model dyfuzyjnego przemieszczania się *Eco*SSB po jednoniciowym DNA. Mechanizm tego zjawiska wyjaśniono dzięki zastosowaniu techniki FRET. Badania wykazały, że białko SSB zdolne jest do przemieszczania się wzdłuż nici DNA w obu kierunkach, umożliwiając przyłączenie się do niej innych białek. Ponadto wykazano, że białko SSB jest zdolne do destabilizacji struktur drugorzędowych, np. „szpilki do włosów” (ang. DNA hairpin), powstających na nici DNA, które hamują filamentację białka RecA. Analizując wpływ białka SSB na formowanie filamentów RecA-ssDNA wzdłuż nici DNA zawierającej strukturę drugorzędową, zaobserwowano znaczne zatężenie białka SSB w obrębie tego fragmentu DNA, które wymusza przesuwanie się SSB wzdłuż nici. Szybkość filamentacji białka RecA na nici ssDNA wzrasta 40-krotnie po dodaniu białka SSB. Model przemieszczania się SSB po nici DNA prawdopodobnie dotyczy wszystkich procesów metabolizmu DNA, w których bierze udział białko SSB (Rys. 9) [186].





Rys. 9 Model przemieszczania się białka SSB po jednoniciowym fragmencie DNA. Toczące się wzdłuż nici białko SSB rozrywa strukturę „szpilki do włosów” (DNA hairpin), a jego przesuwanie stymulowane jest przez przyłączające się kolejne cząsteczki białka RecA [186].

Białko SSB *E. coli* wywiera korzystny wpływ na białka RuvA i RuvB, które są zdolne do przesuwania struktury Hollidaya na obszarze nawet do 1800 pz heterodupleksu DNA. Przemieszczanie ramion tej struktury zachodzi znacznie łatwiej w obecności *EcoSSB*. Dzięki mikroskopii elektronowej możliwa była obserwacja etapów pośrednich tej reakcji, w których niesparowane fragmenty heterologicznego DNA były związane z SSB. Migracja struktury Hollidaya była znacznie ograniczona w nieobecności białka SSB. Analogiczny efekt obserwowano, gdy białko zastąpiono produktem genu 32 faga T4. Obecność białka SSB umożliwia wymianę heterologicznych fragmentów DNA na znacznej długości w procesach rekombinacji i opartej o rekombinację naprawy DNA [187].

Działanie szlaku RecF jest podobne do szlaku RecBCD. W szlaku RecF aktywność helikazy wykazuje białko RecQ, a za aktywność nukleolityczną odpowiada białko RecJ. Opłaszczanie ssDNA przez białko RecA zachodzi dzięki współdziałaniu białek RecF, RecJ, RecO, RecQ i RecR. W przeciwieństwie do szlaku RecBCD, szlak RecF u *E. coli* inicjuje również rekombinację między dwoma plazmidami. Ponadto szlak RecF jest głównym szlakiem odpowiedzialnym za rekombinacyjną naprawę jednoniciowych pęknięć powstających w wyniku replikacji poważnie uszkodzonego DNA [178]. Białko SSB wywiera stymulujący wpływ na helikazę RecQ przyczyniając się do prawidłowego procesu rekombinacji. Zaobserwowano, że oddziaływanie C-terminalnego końca *EcoSSB* z RecQ zwiększa efektywność rozplatania dupleksów. Analogiczne wyniki otrzymano w eksperymentach wykorzystujących produkt genu 32 faga T4

oraz białka RPA [105, 188]. Ponadto białko *EcoSSB* stymuluje wiązanie ssDNA przez nukleazę RecJ, czego nie zaobserwowano w przypadku białka gp32 [189].

### 4.6.3 Rola białek SSB w naprawie DNA

Systemy naprawy DNA są niezbędne każdej żywej komórce do jej prawidłowego funkcjonowania. Błędy w replikacji DNA oraz mutacje będące wynikiem działania mutagenów mogą poważnie upośledzić komórki lub prowadzić do ich śmierci. Naprawa DNA musi być więc procesem stale aktywnym w komórce, by szybko reagować na wszelkie uszkodzenia DNA i niwelować ich skutki. Proces naprawy DNA jest skomplikowany i bierze w nim udział wiele białek, w tym białko SSB. Udział białka SSB w naprawie DNA stwierdzono po raz pierwszy na podstawie zwiększonej wrażliwości komórek bakteryjnych na promieniowanie UV wśród mutantów z niefunkcyjnym genem *ssb* [190]. Białko SSB wspomaga procesy naprawy przez wycinanie, metylozależnej naprawy niekomplementarności, odpowiedzi SOS i naprawy rekombinacyjnej poprzez stabilizację struktury jednoniciowego DNA oraz oddziaływanie z innymi białkami kompleksu naprawczego [191].

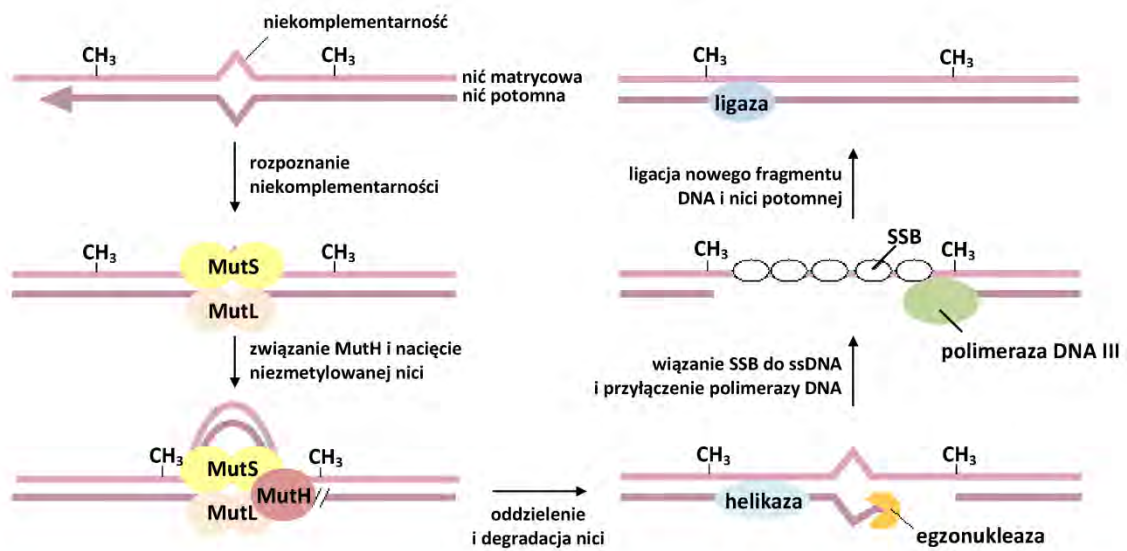
Najlepiej poznanym systemem naprawczym jest odpowiedź SOS u bakterii. Do aktywacji tego procesu dochodzi w sytuacji, gdy powstałe w wyniku działania czynnika mutagennego pęknięcia i fragmentacje nici DNA występują w takiej ilości, że inne systemy reperacyjne komórki nie są w stanie ich naprawić. Proces podlega negatywnej kontroli przez białko LexA, które uniemożliwia transkrypcję genów SOS w normalnych warunkach. Gdy w wyniku uszkodzeń powstaje duża ilość jednoniciowych fragmentów DNA, białko RecA wiąże się z nimi tworząc filamenty. Powstały kompleks RecA-ssDNA wykazuje aktywność koproteazy i uruchamia reakcję autolizy represorowych białek LexA. Następuje indukcja ekspresji genów SOS, w tym: *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *ssb*, *umuC* i *umuD*. W wyniku degradacji białek LexA gwałtownie wzrasta ilość RecA w komórce. Koproteaza RecA odcina fragment C-końcowy białka UmuD, tworząc białko UmuD'. Dwie cząsteczki UmuD' wiążą się z cząsteczką UmuC tworząc kompleks zwany polimerazą DNA V, która ma zdolność przypadkowego włączania zasad do nowo syntetyzowanej nici DNA w przypadku, gdy w nici matrycowej występuje luka lub dimery pirymidynowe. Kompleks UmuD'<sub>2</sub>C wraz z kilkoma cząsteczkami białka RecA tworzy mutasom. Wskutek proteolizy białek LexA zwiększa się również ilość białek SSB w komórce. Białko SSB, po przyłączeniu się do jednoniciowego fragmentu DNA, promuje przyłączanie się kolejnych cząsteczek białka RecA [178, 192, 193]. Białko SSB stymuluje aktywność polimerazy DNA V, a oddziaływanie C-końcowego fragmentu SSB z polimerazą DNA V ułatwia enzymowi przyłączenie się do nici DNA [104].

Białka MucA i MucB, będące homologami białek UmuD i UmuC, są kodowane przez geny znajdujące się w DNA plazmidowym *E. coli* i stanowią elementy systemu SOS naprawy DNA. Białko RecA wiąże się do MucA powodując jego cięcie i powstanie formy MucA'. Białka MucA i MucA' mogą tworzyć między sobą homodimery (MucA/A, MucA'/A') oraz heterodimery (MucA/A'). Prawdopodobnie oddziaływania MucA/A'-RecA powodują dalszą proteolizę cząsteczek MucA do formy MucA'. Dzięki temu następuje włączanie białek MucA' do kompleksu nukleoproteinowego bez istotnego oddysocjowania białka SSB od ssDNA. Mające zdolność wiązania jednoniciowego DNA białko MucB nie wypiera SSB z jego kompleksu z ssDNA, ale znacząco wpływa na konformację kompleksu SSB-ssDNA. Te zmiany konformacyjne ułatwiają polimerazie DNA omińnięcie uszkodzenia DNA oraz syntezę nowej nici w miejscu tego uszkodzenia. Zaangażowane w proces naprawy DNA białko RecA konkuruje z białkiem SSB o wiązanie z jednoniciowym DNA, jednak w pewnych warunkach powstają kompleksy SSB-RecA-ssDNA. Zarówno białko RecA, jak i SSB ma zdolność wiązania się z białkiem MucA', natomiast RecA nie wiąże się MucB. Kompleks białkowy RecA-MucA'-MucB-SSB powstaje w wyniku połączenia białka RecA z MucA', które utworzyło kompleks białkiem MucB związanym z SSB [194]. Sposób w jaki białko SSB wpływa na proces naprawy w systemie SOS nie jest jeszcze dokładnie poznany. Białko SSB wpływa na wydajną aktywację białka RecA oraz stymuluje RecA-zależną autolizę białek LexA [180].

Do systemów naprawy uszkodzonej nici DNA należy naprawa przez wycinanie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair) [195]. W tym systemie uszkodzony nukleotyd (lub nukleotydy) jest usuwany i zastępowany nowym. Pierwszym etapem procesu jest przyłączenie kompleksu UvrAB, złożonego z dwóch cząsteczek UvrA i jednej cząsteczki UvrB, do miejsca w DNA zawierającego uszkodzenie. Kompleks ten nie rozpoznaje poszczególnych typów uszkodzeń, tylko ogólne cechy uszkodzenia DNA, takie jak zaburzona struktura podwójnej helisy. Najbardziej zaangażowanym w lokalizację uszkodzeń DNA elementem kompleksu jest białko UvrA, które odłącza się po odnalezieniu uszkodzonego miejsca. Do białka UvrB wiąże się UvrC, a utworzony kompleks dokonuje nacięcia nici DNA po obu stronach uszkodzenia. Następnie wycinany fragment jest usuwany w postaci polinukleotydu przez helikazę DNA II, która rozrywa wiązania między zasadami łączące go z drugą nicią. W tym czasie białko UvrC dysocjuje od kompleksu UvrBC, natomiast białko UvrB pozostaje na miejscu, chroniąc odsłonięty fragment przed ponownym parowaniem i przed dalszym uszkodzeniem aż do przyłączenia polimerazy DNA I do naprawianego obszaru. Polimeraza DNA I syntezuje brakujące nukleotydy, a ligaza DNA łączy je z nieuszkodzonymi nićmi DNA [178, 196, 197, 198]. Gen kodujący białko SSB *E. coli* znajduje się pod kontrolą tego samego promotora co gen *uvrA*.

W związku z tym białko SSB jest niezbędne nie tylko w systemie odpowiedzi SOS, ale także w procesie naprawy z wycięciem nukleotydu, chociaż jego rola nie została jeszcze poznana.

Białko SSB bierze udział w metylozależnej naprawie niekomplementarności DNA będącej jednym z mechanizmów usuwania mutacji punktowych, które nie zostały wykryte i naprawione podczas replikacji [199]. Nić potomna po replikacji ulega metylacji z opóźnieniem, co umożliwia systemom naprawy odróżnienie tej nici od nici matrycowej oraz sprawdzenie poprawności syntezy i skorygowanie błędów zanim nici staną się nierozróżnialne. U *E. coli* nić potomna ulega metylacji przez metylazę adeninową DNA (Dam), która zamienia adeninę na 6-metyloadeninę w sekwencji 5'GATC3' oraz metylazę cytozynową DNA (Dcm), która zamienia cytozynę na 5-metylocytozynę w sekwencjach 5'CCAGG3' i 5'CCTGG3'. Należy zaznaczyć, że metylacje te nie mają działania mutagennego, a zmodyfikowane nukleotydy ulegają parowaniu tak samo jak ich niemodyfikowane odpowiedniki [178]. Niekomplementarność może zostać usunięta przez system naprawy w odległości nawet 1000 pz od miejsca metylacji. W procesie tym biorą udział białka MutH, MutL i MutS, tworzące kompleks, helikaza DNA II, SSB, holoenzym polimerazy DNA III, egzonukleaza oraz ligaza DNA [200]. Białko MutS rozpoznaje niekomplementarność i wiąże się do DNA w jej miejscu, a białko MutH wiąże się do sekwencji GATC i przecina niemetylowaną nić [199, 201]. Reakcja jest niezależna od polarności niemodyfikowanej nici i zachodzi na nici niemetylowanej, zarówno w kierunku 3' jak i 5', w stosunku do niekomplementarności [202, 203]. Białko MutL działa jako łącznik, wiążąc MutS i MutH w jeden kompleks i koordynując aktywność tych białek tak, aby MutH wiązało się tylko z sekwencjami GATC sąsiadującymi z miejscem niekomplementarności rozpoznany przez MutS [178, 199]. Po przecięciu przez MutH, nić niemetylowana jest oddzielana od nici metylowanej przez helikazę DNA II i degradowana przez egzonukleazę. Do jednoniciowego DNA powstałego po trawieniu nici niemetylowanej wiąże się białko SSB, które stabilizuje odstaloną nić i umożliwia syntezę brakującego fragmentu DNA przez holoenzym polimerazy DNA III. Następnie ligaza DNA łączy nowo powstały pozbawiony mutacji fragment z potomną nicią DNA. Wykazano, że białko SSB jest niezbędne w procesie metylozależnej naprawy niekomplementarności i działa stymulująco na helikazę, egzonukleazę i polimerazę (Rys. 10) [191, 200, 204].



Rys. 10 Schemat przebiegu procesu naprawy niekomplementarności z udziałem białek MutS, MutL i MutH [205].

Genomowe DNA może zostać uszkodzone przez reszty uracylowe, które zostały włączone do łańcucha polinukleotydowego przez polimerazę DNA lub które powstały w wyniku deaminacji cytozyny będącej efektem działania czynnika mutagennego. Skutkiem obecności reszt uracylowych w DNA jest tranzycja par GC do AT. Za wycinanie reszt uracylowych z dwuniciowego DNA odpowiedzialna jest glikozylaza uracylowa (UDG), która bierze udział w procesie naprawy DNA przez wycinanie zasad. Zaobserwowano, że białka SSB wpływają znacząco na proces wycinania reszt uracylowych z syntetycznych substratów DNA przez glikozylazy uracylowe pochodzące z *E. coli* (*EcoUDG*), *Mycobacterium tuberculosis* (*MtuUDG*) i *Mycobacterium smegmatis* (*MsmUDG*). Obecność białek SSB powoduje zmniejszenie stopnia wycinania reszt uracylowych z jednoniciowego DNA. W przypadku substratu DNA, który tworzył strukturę „szpilki do włosów” z czteronukleotydową pętlą, w której drugim nukleotydem był uracyl, obecność białek *EcoSSB* i *EcoUDG* lub *MtuSSB* i *MtuUDG* powodowała zwiększenie wydajności procesu wycinania reszt uracylowych [206].

#### 4.7 Lokalizacja genów kodujących białka SSB

W genomach bakteryjnych geny *ssb* są różnorodnie zlokalizowane, a geny z nimi sąsiadujące kodują białka o odmiennych funkcjach. Ponadto bakterie mogą posiadać więcej niż jeden gen *ssb* w swym genomie. Na podstawie zsekwencjonowanych do 2003 roku genomów bakteryjnych dokonano klasyfikacji bakterii ze względu na lokalizację i ilość genów kodujących białko SSB, która obejmuje cztery grupy (Tab. 2) [207].

Grupa	<i>rpsF-ssb-rpsR</i>	<i>uvrA-ssb</i>	wielokrotne geny <i>ssb</i>
I	+	-	+
II	+	-	-
III	-	+	-
IV	-	-	+/-

Tab. 2 Klasyfikacja bakterii ze względu na ilość i lokalizację genów *ssb* [207]. Legenda: „+” oznacza obecność danej cechy, natomiast „-” jej brak.

Grupa I obejmuje organizmy posiadające więcej niż jeden gen kodujący białko SSB. Główny gen *ssb* położony jest między genami *rpsF* i *rpsR*, kodującymi rybosomalne białka S6 i S18. Większość mikroorganizmów z tej grupy to bakterie Gram-dodatnie. Do bakterii grupy I należą m. in. *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bifidobacterium longum*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*. W genomie *Bacillus subtilis* obecne są dwa geny kodujące białka SSB, znajdujące się pod kontrolą różnych promotorów: gen *ssb* (kodujący białko SSB – *BsuSSB*) oraz gen *ywpH* (kodujący białko YwpH). Gen *ssb* wraz z otaczającymi genami *rpsF* i *rpsR* tworzy operon, który ulega podwyższonej ekspresji w czasie fazy logarytmicznego wzrostu bakterii. Gen *ywpH* jest transkrybowany z własnego promotora głównie na początku fazy stacjonarnej hodowli, a induktorem jego ekspresji jest białko ComK. Ekspresja białka YwpH zachodzi wraz z ekspresją białek stanu kompetencji, co wskazuje na udział tego białka w naturalnej transformacji, do której zdolne są bakterie *Bacillus subtilis* [207]. Bakterie *Streptococcus pneumoniae* również posiadają dwa geny kodujące białka SSB, są to: *ssbA* i *ssbB*. Białko SsbA jest głównym białkiem SSB *S. pneumoniae* biorącym udział w podstawowych procesach metabolizmu DNA [81]. Wykazano, że ekspresja genu *ssbB* zachodzi na wysokim poziomie, gdy komórka znajduje się w stanie kompetencji. Białko SsbB pełni istotną rolę w procesie naturalnej transformacji u *S. pneumoniae*, stabilizując pobrany ze środowiska jednoniciowy fragment DNA w komórce, a przez to ułatwiając proces rekombinacji z chromosomowym DNA [208].

Do grupy II zaliczono mikroorganizmy z tylko jednym genem kodującym białko SSB, znajdującym się w otoczeniu genów *rpsF* i *rpsR*. Możemy do niej zaliczyć m.in.: *Bacillus halodurans*, *Campyloacter jejuni*, *Helicobacter pylori* i *Borrelia burgdorferi* [207].

Bakterie, u których występuje tylko jeden gen *ssb* zlokalizowany w sąsiedztwie genu *uvrA* należą do grupy III. Jej najbardziej rozpoznawalnym przedstawicielem jest *Escherichia coli*, a wszystkie mikroorganizmy z tej grupy są bakteriami Gram-ujemnymi. Gen *ssb* *E. coli* poprzedzony jest aż trzema promotorami i genem *uvrA*, kodującym podjednostkę A egz nukleazy UvrABC, biorącej udział w naprawie DNA. Do bakterii posiadających organizację

genu *ssb* taką jak *E. coli* należą m. in. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* i *Shewanella oneidensis* [207].

Grupę IV stanowią bakterie, u których gen *ssb* nie jest ani w otoczeniu *rpsF* i *rpsR*, ani w sąsiedztwie *uvrA*. Bakterie z tej grupy niekiedy zawierają więcej niż jeden gen kodujący białko SSB (np. *Xylella fastidiosa* i szczep *Nostoc* PCC7120). Do grupy czwartej zalicza się m. in.: *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis* i *Chlamydia trachomatis* [207].

Wśród bakterii psychrofilnych, których białka SSB są przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej, *P. arcticus*, *P. cryohalolentis*, *P. haloplanktis* i *P. profundum* należą do grupy III, natomiast *D. psychrophila*, *F. psychrophilum*, *P. ingrahamii* i *P. torquis* należą do grupy IV.

#### 4.8 Zastosowanie białek SSB

Białka SSB, ze względu na swoją zdolność do wiązania ssDNA z wysokim powinowactwem oraz stymulujący wpływ na enzymy zaangażowane w procesy metabolizmu DNA, są stosowane w różnych technikach biologii molekularnej i metodach analitycznych [209].

Opracowana w latach 80-tych XX wieku metoda PCR, czyli łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction), jest stosowana w biologii i genetyce molekularnej, diagnostyce i terapii chorób genetycznych człowieka oraz w medycynie sądowej. Metoda PCR jest oparta o replikację DNA *in vitro* i umożliwia produkcję dużej liczby specyficznych fragmentów DNA przy wykorzystaniu odpowiedniej pary starterów i termostabilnej polimerazy DNA. Niewątpliwą zaletą techniki PCR jest możliwość amplifikacji *in vitro* unikalnego regionu pojedynczej cząsteczki DNA w krótkim czasie i w ilościach, które są wystarczające by mógł być użyty m.in. do klonowania i sekwencjonowania lub by mógł być poddany analizom restrykcyjnym. Reakcja PCR jest stale poddawana modyfikacjom w celu podniesienia wydajności i specyficzności amplifikacji DNA *in vitro*. Wydajność amplifikacji DNA spada proporcjonalnie do długości amplifikowanych fragmentów oraz liczby struktur drugorzędowych powstałych na matrycowym DNA. Z tego względu zaczęto poszukiwać związków i białek, które mają korzystny wpływ na wydajność reakcji PCR, aktywność polimeraz DNA oraz zapobiegają lub ograniczają powstawanie niespecyficznych produktów PCR. Do tej pory przeprowadzono wiele eksperymentów, w których wykazano, że białka SSB z powodzeniem mogą być wykorzystywane w technikach PCR, gdyż zwiększają wydajność i efektywność tych reakcji.

Pierwsze badania nad wpływem białek SSB na amplifikację DNA *in vitro* wykazały, że obecność produktu genu 32 faga T4 lub SSB *E. coli* w mieszaninie reakcyjnej poprawia

efektywność reakcji PCR. Białka te zwiększają procesywność prokariotycznych i eukariotycznych polimeraz DNA oraz zapobiegają powstawaniu niespecyficznych produktów reakcji PCR, które zazwyczaj tworzą się podczas amplifikacji matryc DNA zawierających liczne struktury drugorzędowe [210, 211]. Produkt genu 32 faga T4 podnosi wydajność i wierność amplifikacji przez polimerazę DNA T4 umożliwiając syntezę produktów o długości 3000-6500 pz [212]. Ponadto, dodatek białka *EcoSSB* zwiększa wydajność syntezy trudno amplifikujących się matryc DNA. W nieobecności tego białka w mieszaninie reakcyjnej nie uzyskiwano żadnych produktów amplifikacji, nawet po zastosowaniu techniki „Hot-Start” [211]. Badania termostabilnych białek SSB *Thermus aquaticus* (*TaqSSB*) i *Thermus thermophilus* (*TthSSB*) wykazały, że są one świetnymi wzmacniaczami reakcji PCR, ponieważ zwiększają wydajność amplifikacji nawet o kilka rzędów wielkości. Udowodniono również, że białko *TthSSB* drastycznie skraca czas etapu elongacji w reakcji PCR potrzebny do syntezy produktu przez polimerazę DNA *Thermus thermophilus*. Analizując wpływ białka *TthSSB* na procesywność polimeraz *Tth* i *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) podczas amplifikacji długiego fragmentu DNA (3200 pz), wykazano, że w obecności *TthSSB* i polimerazy *Tth* możliwe było skrócenie czasu elongacji z ponad 2 min do 1 min. Zatem szybkość syntezy DNA przez DNA polimerazę *Tth* wzrosła ponad dwukrotnie w obecności białka *TthSSB*. Podobne wyniki uzyskano dla syntezy DNA przez DNA polimerazę *Pfu* w obecności białka *TthSSB*, w której skrócenie czasu elongacji nie obniżało wydajności amplifikacji. Istotną dla reakcji PCR właściwością polimeraz jest ich wierność, umożliwiająca bezbłędną syntezę fragmentów DNA *in vitro*. Przeprowadzono badania nad amplifikacją DNA plazmidu pUC19 przez DNA polimerazę *Tth* w obecności lub nieobecności białka *TthSSB*, które wykazały korzystny wpływ tego białka na wierność zastosowanej polimerazy DNA. Amplifikacja DNA plazmidu pUC19 z użyciem DNA polimerazy *Tth* w obecności białka *TthSSB* umożliwia otrzymanie o wiele większej liczby plazmidów pozbawionych błędów w markerowym genie *lacZ*. Białko *TthSSB* powoduje więc zwiększenie wierności polimerazy *Tth* [213].

Reakcja multipleks PCR umożliwia jednoczesną syntezę wielu fragmentów DNA, dzięki zastosowaniu kilku par starterów w mieszaninie reakcyjnej. Obecność wielu starterów może prowadzić do ich hybrydyzacji oraz zwiększa ryzyko powstawania błędów podczas wiązania się ich z sekwencją docelową, co skutkuje obniżeniem wydajności amplifikacji. Z tego względu reakcja multipleks PCR jest trudna w optymalizacji. Białka SSB można stosować w celu zapobiegania hybrydyzacji starterów. Analizując reakcję multipleks PCR stosowaną do identyfikacji ludzkich markerów Y-STR wykazano, że dodatek białka *TaqSSB* zwiększa efektywność amplifikacji. Analiza polimorfizmu ludzkiego Y-STR umożliwia ustalenie ojcostwa i jest szeroko stosowana w laboratoriach medycyny sądowej. Dodatek białka *TaqSSB*



uniemożliwia tworzenie się struktur drugorzędowych, zarówno wewnątrzcząsteczkowych, jak i międzycząsteczkowych, dzięki czemu, uzyskuje się większą wydajność reakcji PCR [214, 215].

RT-PCR (ang. reverse transcription polymerase chain reaction) jest odmianą reakcji PCR, w której matrycę stanowi mRNA. W pierwszym etapie reakcji sekwencja nukleotydowa jest przepisywana z mRNA na cDNA przez odwrotną transkryptazę lub polimerazę DNA o aktywności odwrotnej transkryptazy. Metoda ta umożliwia amplifikację niewielkich ilości mRNA i jest stosowana w badaniach ekspresji genów oraz diagnostyce molekularnej. W obecności jonów  $Mn^{2+}$  DNA polimeraza *Tth* wykazuje aktywność odwrotnej transkryptazy. Badając wpływ białka *TthSSB* na reakcję odwrotnej transkrypcji *in vitro* w obecności  $MnCl_2$ , wykazano, że dodatek białka SSB do mieszaniny reakcyjnej powoduje zwiększenie ilości kopii cDNA uzyskiwanego z mRNA. Największą poprawę wydajności zaobserwowano w przypadku amplifikacji długich fragmentów cDNA (1000, 2000 i 3000 pz), mimo że powstawały również niespecyficzne produkty. Białko *TthSSB* wpływa bezpośrednio na etap odwrotnej transkrypcji zwiększając aktywność odwrotnej transkryptazy DNA polimerazy *Tth* oraz stabilizując mRNA dzięki swej zdolności wiązania z kwasem rybonukleinowym [213, 216].

W wyniku reakcji PCR, oprócz właściwego dwuniciowego produktu, mogą powstawać także niespecyficzne lub niedokończone produkty amplifikacji stanowiące kompleks ssDNA-dsDNA oraz niewykorzystane startery. Do rozdzielenia tych produktów wykorzystuje się elektroforezę kapilarną w buforze rozwijającym z dodatkiem białka SSB. Białko SSB wiążąc się do jednoniciowych fragmentów DNA mieszaniny poreakcyjnej powoduje opóźnienie ich ruchliwości elektroforetycznej, podczas gdy ruchliwość właściwych dwuniciowych produktów jest niezmieniona. Zastosowanie białka SSB umożliwia precyzyjne oddzielenie produktu PCR od produktów niespecyficznych i pozostałych po reakcji starterów. Ponadto właściwość ta może być kluczowym narzędziem w preparatywnej reakcji PCR do rozdzielenia aptamerów nukleotydów stosowanych w diagnostyce. Stwierdzono, że białka SSB są uniwersalnym i skutecznym narzędziem do ilościowej analizy DNA, RNA i białek w elektroforezie kapilarnej [217, 218].

Wykazano również, że białko SSB stymuluje wiązanie kwasu peptydonukleinowego (ang. peptide nucleic acid, PNA) do dwuniciowego DNA [219]. PNA jest syntetycznym polinukleotydowym analogiem DNA i RNA, w którym fosforanowo-cukrowy szkielet naturalnych kwasów nukleinowych został zastąpiony poliamidem, tworzonym przykładowo przez podjednostki *N*-(2-aminoetylo)glicyny połączone ze sobą wiązaniem peptydowym. Kwas peptydonukleinowy ma zdolność do tworzenia dwuniciowych struktur opartych o parowanie zasad, a także może wiązać się z RNA i DNA, tworząc heterodupleksy. Ze względu na stosunkowo silne oddziaływanie PNA z kwasami nukleinowymi można stosować go jako lek w terapii genowej. Krótkie odcinki PNA o ściśle określonej sekwencji mogą wiązać się

z docelowym fragmentem DNA czy mRNA blokując lub obniżając ekspresję genu docelowego. Co więcej, krótkie cząsteczki PNA mogą być znacznie bardziej selektywne niż analogiczne oligonukleotydy RNA lub DNA [220, 221]. Badania nad wpływem białka SSB na wiązanie cząsteczki PNA o komplementarnej sekwencji do fragmentu dwuniciowego DNA wykazały, że białko stabilizuje utworzony kompleks PNA-DNA. Stabilizacja polega na wiązaniu się SSB do jednoniciowego fragmentu DNA powstałego podczas inwazji PNA na jedną z nici dupleksu [219].

Pirosekwencjonowanie to metoda sekwencjonowania DNA w czasie rzeczywistym, w której biorą udział cztery enzymy: fragment Klenowa polimerazy DNA I, sulfurylaza ATP, lucyferaza i apyryaza. Reakcje katalizowane przez te enzymy są ze sobą powiązane – produkty kolejnych są substratami następnych. Kolejność zasad azotowych w badanym fragmencie DNA odczytuje się dzięki analizie błysków chemiluminescencji, emitowanych podczas dobudowywania kolejnych nukleotydów do jednoniciowej matrycy. Metodę pirosekwencjonowania stosuje się głównie, gdy konieczne jest szybkie poznanie sekwencji wielu krótkich fragmentów, np. w genotypowaniu do identyfikacji poszczególnych gatunków bakterii (np. analizy 16S rDNA), grzybów (region ITS2) czy wirusów (grypy, *Herpes Simplex Virus*), podczas analiz metylacji wysp CpG DNA, których zaburzenia mogą doprowadzić do przemiany nowotworowej komórki, a także w genetyce klinicznej (do wykrywania mutacji i polimorfizmów pojedynczych nukleotydów) [222, 223, 224]. W 2000 roku wykazano, że białko SSB znacznie poprawia wyniki pirosekwencjonowania DNA. Dzięki swej zdolności niespecyficznego wiązania ssDNA białko SSB zapobiega tworzeniu struktur drugorzędowych w DNA matrycy, co zwiększa szybkość polimeryzacji oraz wywiera stymulujący wpływ na enzymy biorące udział w pirosekwencjonowaniu. Dodatek białka SSB do mieszaniny reakcyjnej powoduje zwiększenie wydajności enzymów, zmniejszenie występowania niespecyficznego sygnału, zwiększenie intensywności sygnału w czasie reakcji, zwiększenie dokładności odczytu liczby identycznych sąsiadujących ze sobą nukleotydów, zwłaszcza w trudnych matrycach, oraz pozwala na uzyskanie dłuższych odczytów podczas sekwencjonowania [222]. Stosowanie białek SSB w celu poprawy odczytu sekwencji jest zalecane w wielu protokołach pirosekwencjonowania np. [225], dostępny jest również zestaw do pirosekwencjonowania (Pyro Gold firmy Qiagen), w którym jednym z odczynników jest białko SSB.

## 5. Materiały

### 5.1 Materiały podstawowe i aparatura

- aparat do elektroforezy agarozowej Delfin (DNA-Gdańsk II s. c., Polska)
- aparat do elektroforezy poliakrylamidowej Bluestar (DNA-Gdańsk II s. c., Polska)
- aparat do elektroforezy poliakrylamidowej Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences, USA)
- aparat HPLC (Merck-Hitachi, USA)
- autoklaw pionowy 2100 CLASSIC (Prestige Medical, Wielka Brytania)
- butle i kolby szklane (Simax, Republika Czeska)
- ciepłarka laboratoryjna TB2 (Pozamet, Polska)
- dezintegrator ultradźwiękowy Soniprep 150 MSE (SANYO, USA)
- inkubator powietrzny z wytrząsaniem (DNA-Gdańsk II s. c., Polska)
- kolumny do zagęszczania Amicon Ultra-15 (Millipore, USA)
- końcówki do pipet automatycznych (Medlab Products Sp. z o.o., Polska)
- kuchenka mikrofalowa AMM 17 E 70 (Amica, Polska)
- mieszadło magnetyczne (ATM, Polska)
- mikrokalorymetr NanoDSC (Calorimetry Science Corporation, USA)
- mikrowirówka Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Niemcy)
- pH-metr CP-315M (Elmetron, Polska)
- pipety automatyczne (Eppendorf, Niemcy; Gilson, USA)
- płytki Petriego (Medlab Products Sp. z o.o., Polska)
- probówki typu Eppendorf - 0,5 i 1,5 ml (Medlab Products Sp. z o.o., Polska)
- probówki 0,2 ml do reakcji PCR (Medlab Products Sp. z o.o., Polska)
- probówki typu Falcon - 15 i 50 ml (BD Biosciences, USA)
- probówki do ultrawierowania (Beckman Coulter, USA)
- spektrofluorymetr Perkin Elmer LS-5B (Perkin Elmer, USA)
- spektrofotometr Cary 300 Bio (Varian, USA)
- spektrofotometr Spectro 23 (Digital Spectrophotometer LaboMed, Inc., USA)
- sterylizator SP-65G (WAMED, Polska)
- system do dokumentacji i densytometrycznej analizy żeli VersaDoc (Bio-Rad, USA)
- termoblok Red-Hot 35 (DNA-Gdańsk II s. c., Polska)
- termocykler gradientowy Mastercycler Gradient (Eppendorf, Niemcy)
- termocykler gradientowy Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies, USA)

- transiluminator Foto/UV 21 (Fotodyne, USA)
- waga analityczna WA-31 (Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Polska)
- wirówka Sigma 6K-15 (Sigma, Niemcy), MPW-350R (MPW Med. Instruments, Polska)
- wirówka Beckman SW 60 Rotor (Beckman Coulter, USA)
- woreczek do dializy D0530 (Sigma, USA)
- worteks WL-1 (DHN, Polska)
- zasilacz prądu stałego Thunder (DNA-Gdańsk II s. c., Polska)
- zasilacz prądu stałego PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)

## 5.2 Szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* TOP10 – F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* (Invitrogen, USA)*
- *Desulfotalea psychrophila* DSM 12343 (DSMZ, Niemcy)
- *Flavobacterium psychrophilum* LMG 13180 (BCCM/LMG, Belgia)
- *Photobacterium profundum* LMG 19446 (BCCM/LMG, Belgia)
- *Pseudoalteromonas haloplanktis* CIP 108707 (Instytut Pasteura, Francja)
- *Psychrobacter arcticus* DSM 17307 (DSMZ, Niemcy)
- *Psychrobacter cryohalolentis* DSM 17306 (DSMZ, Niemcy)
- *Psychroflexus torquis* LMG 21429 (BCCM/LMG, Belgia)
- *Psychromonas ingrahamii* DSM 17664 (DSMZ, Niemcy)

## 5.3 Podłoża bakteriologiczne i dodatkowe składniki podłoż

PODŁOŻE	OBJĘTOŚĆ	SKŁADNIKI		pH
		NAZWA	ILOŚĆ	
LB	1000 ml	pepton K	10 g	7,2
		ekstrakt drożdżowy	5 g	
		NaCl	10 g	
		woda destylowana	do 1000 ml	
LA	1000 ml	pepton K	10 g	7,2
		ekstrakt drożdżowy	5 g	
		NaCl	10 g	
		agar	15 g	
Marine Broth	1000 ml	Difco Marine Broth 2216	37,4 g	7,6
		woda destylowana	do 1000 ml	

Podłoża LB, LA oraz Marine Broth 2216 jałowiono w autoklawie (20 min, 15 atm, 121°C), studzono do temperatury około 50°C oraz dodawano antybiotyku do żądanego stężenia, jeśli zachodziła taka konieczność.

<b>DODATKOWE SKŁADNIKI PODŁOŻA</b>	
ampicylina	100 mg/ml w wodzie
arabinoza	20% roztwór wodny

#### **5.4 Podstawowe odczynniki chemiczne**

- Agar bakteriologiczny (BTL, Polska)
- Agaroza Prona Plus (Prona, Hiszpania)
- Akrylamid (Sigma, USA)
- Arabinoza (Sigma, USA)
- Barwnik Coomassie Brilliant Blue R (Fluka, USA)
- β-merkaptotoetanol (Sigma, USA)
- Błękit bromofenolowy (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Bromek etydyny (Sigma, USA)
- Chlorek magnezu (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Chlorek potasu (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Chlorek sodu (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Chlorek wapnia (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Chlorowodorek guanidyny (Sigma, USA)
- Cyjan ksylenu (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Diwodorofosforan sodu ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- EDTA – sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Ekstrakt drożdżowy (BTL, Polska)
- Etanol, roztwór 96% (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Ficoll 400 (Sigma, USA)
- Gliceryna bezwodna (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Glicyna (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Izopropanol (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Kwas chlorowodorowy (HCl) (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Kwas octowy ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Marine Broth 2216 (Difco Laboratories, USA)

- Metanol (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- N, N'-metyleno-bis-akrylamid (Sigma, USA)
- Nadsiarczan amonu (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Pepton K (BTL, Polska)
- SDS – sól sodowa siarczynu (IV) dodecyłu (Sigma, USA)
- TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (Sigma, USA)
- Tris – trihydroksymetyloaminometan (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Fluka, USA)
- Wodorofosforan sodu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)
- Wodorotlenek sodu (Polskie Odczynniki Chemiczne S. A., Polska)

### 5.5 DNA plazmidowe

- pBADMyc-His A: wektor ekspresyjny, będący pochodną plazmidu pBR322; wykorzystywany do klonowania genów oraz ekspresji rekombinantowych białek w komórkach *E. coli*; zawiera elementy operonu arabinozowego: promotor  $P_{\text{BAD}}$  oraz gen *araC* (Invitrogen, USA)

### 5.6 Odczynniki do reakcji PCR

- dNTPs: 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP (Roche, Szwajcaria)
- Polimeraza *Pwo* Supernova 2 U/ $\mu\text{l}$  (DNA-Gdańsk II s. c., Polska)
- Bufor *Pwo*, 10x stężony (DNA-Gdańsk II s. c., Polska) o składzie:
  - 100 mM Tris-HCl pH 8,0
  - 500 mM KCl
  - 1,5 % Triton X-100 (w/w)
- 50 mM  $\text{MgCl}_2$
- Woda jałowa
- Startery (10  $\mu\text{M}$ ) (Sigma, USA):

Lp.	Nazwa startera	Sekwencja startera*
1	DPSSBNcoI	5' TTA <b>CCA TGG</b> GGA TAA ATA AGG CAA TTT TAA TTG GTA ATC TAG 3'
2	DPSSBHindIII	5' TTA <b>AAG CTT</b> CTA GAA GGG TAC GTC GTT AC 3'
3	FPSSBNcoI	5' GGA GGA <b>CCA TGG</b> <u>GGA</u> ACG GAA CGT TAA ATA AAG TCA TG 3'
4	FPSSBHindIII	5' TTA <b>AAG CTT</b> TTA AAA AGG CAA ATC ATT TTC TAC AG 3'
5	PARSSBNcoI	5' GGA GGA <b>CCA TGG</b> GGC GCG GTG TTA ATA AAG TTA TCA TC 3'
6	PARSSBBglII	5' TTA <b>AGA TCT</b> CTA GAA AGG AAT GTC ATC GTC 3'
7	PCRSSBNcoI	5' TTA <b>CCA TGG</b> <u>GGC</u> GCG GTG TTA ATA AAG TTA TCA TC 3'
8	PCRSSBHindIII	5' TTA <b>AAG CTT</b> TCA GAA CGG AAT GTC ATC GTC 3'
9	PHASSBNcoI	5' TTA <b>CCA TGG</b> CAC GCG GTG TGA ACA AAG TAA T 3'
10	PHASSBHindIII	5' TTA <b>AAG CTT</b> TCA GAA CGG TAT GTC GTC GTC AAA ATC 3'
11	PINSSBNcoI	5' TTA <b>CCA TGG</b> <u>GGT</u> TTA ACC GAA GCG TAA ACA AAG TAG 3'
12	PINSSBHindIII	5' TTA <b>AAG CTT</b> CTA AAA AGG AAT ATC ATC ATC GAA ATC 3'
13	PPRSSBNcoI	5' GGA GGA <b>CCA TGG</b> CCA GTC GTG GTG TAA ATA AGG 3'
14	PPRSSBBglII	5' TTA <b>AGA TCT</b> CTA GAA TGG GAT ATC ATC ATC AAA ATC 3'
15	PTOSSBNcoI	5' GGA GGA <b>CCA TGG</b> CAG GAA CAC TCA ATA AAG TTA TGC 3'
16	PTOSSBHindIII	5' TTA <b>AAG CTT</b> TTA AAA GGG TAG ATC ATC TTC CTC 3'

\* Sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych oznaczono kolorem: niebieskim dla enzymu restrykcyjnego *NcoI*, czerwonym dla enzymu restrykcyjnego *HindIII* i zielonym dla enzymu restrykcyjnego *BglII*. W sekwencjach starterów FPSSBNcoI, PCRSSBNcoI i PINSSBNcoI podkreślono nukleotydy, które zostały dodane w celu zachowania prawidłowej ramki odczytu.

## 5.7 Enzymy restrykcyjne i bufor do trawienia

Zastosowano następujące enzymy i bufor do trawienia (New England Biolabs, USA):

Enzym restrykcyjny	Sekwencja rozpoznania	Bufor do trawienia	Optymalna temperatura reakcji
<i>BglII</i>	5' ...A↓GATCT...3' 3' ...TCTAG↑A...5'	NEBuffer 2	37°C
<i>HindIII</i>	5' ...A↓AGCTT...3' 3' ...TTCGA↑A...5'	NEBuffer 2	37°C
<i>NcoI</i>	5' ...C↓CATGG...3' 3' ...GGTAC↑C...5'	NEBuffer 3	37°C

- NEBuffer 2: 10 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 1 mM DTT
- NEBuffer 3: 50 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl; 1 mM DTT

## 5.8 Odczynniki do reakcji ligacji

- DNA ligaza faga T4, 2U/ $\mu$ l (Epicentre, USA)
- 10x bufor do ligazy (Epicentre, USA)
- 25 mM ATP (Epicentre, USA)

## 5.9 Odczynniki, bufor i roztwory do rozdzielania DNA za pomocą elektroforezy agarozowej

- Agaroz
- Bromek etydyny 1 mg/ml
- Bufory:

BUFOR	OBJĘTOŚĆ	SKŁADNIKI		pH
		NAZWA	ILOŚĆ	
50x TAE	1000 ml	tris	242 g	7,5
		kw. octowy	57,1 ml	
		0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml	
		woda destylowana	do 1000 ml	
OBCIĄŻAJĄCY	-	ficoll 400	20%	-
		EDTA	0,1 M	
		cyjan ksylenu	0,25%	

## 5.10 Odczynniki, bufor i roztwory do rozdzielania białek za pomocą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz barwienia

### ODCZYNNIKI STOSOWANE DO SPORZĄDZENIA ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO

30% roztwór akrylamidów o składzie:

akrylamid	29 g
N, N'-metylenobisakrylamid	1 g
woda destylowana	70 ml

10% SDS

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

1 M Tris-HCl pH 6,8

10% nadsiarczan amonu

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina



NAZWA ROZTWORU	OBJĘTOŚĆ [ml]	SKŁADNIKI		pH
		NAZWA	ILOŚĆ	
<b>BUFOR DO ELEKTORFOREZY POLIAKRYLAMIDOWEJ</b> 5x Tris-Glicyna	1000	tris	15,1 g	8,3
		glicyna	94 g	
		10% SDS	50 ml	
		woda destylowana	900 ml	
<b>BUFOR LIZUJĄCY (do nanoszenia próbek na żel)</b>	10	1 M Tris-HCl	0,6 ml	6,8
		10% SDS	2 ml	
		glicerol	5 ml	
		β-merkaptotetanol	0,5 ml	
		1% błękit bromofenolowy	1 ml	
		woda destylowana	0,9 ml	
<b>ROZTWÓR BARWIĄCY</b>	100	Comassie Brilliant Blue R	0,25 g	-
		metanol	50 ml	
		kwas octowy	10 ml	
		woda destylowana	40 ml	
<b>ROZTWÓR ODBARWIAJĄCY</b>	1000	metanol	300 ml	-
		kwas octowy	100 ml	
		woda destylowana	600 ml	

### 5.11 Markery wielkości

- Markery wielkości DNA:
  - M250-10000: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 pz (SM 1163, Fermentas, Litwa)
  - M75-20000: 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75 pz (SM 1331, Fermentas, Litwa)
- Białkowe markery wielkości:
  - Unstained Protein Molecular Weight Marker: 116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa (SM 0431, Fermentas, Litwa)

## 5.12 Roztwory i buforory stosowane do oczyszczania białek i regeneracji złóż

BUFOR	A	A <sub>0</sub>	B	C	D	E	DD
<b>SKŁADNIK</b>	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,8	pH 7,8	pH 7,8	pH 7,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /NaHPO <sub>4</sub>	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	50 mM	50 mM	2 M	0,5 M	0,8 M	1,5 M	300 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	-
Glikol etylenowy	-	-	-	-	-	50%	-
Triton X-100	-	0,2%	-	-	-	-	-

## 5.13 Odczynniki do ultrawierowania

- Glicerol
- Bufor do ultrawierowania:
  - 50 mM Tris-HCl pH 7,5
  - 0,5 M NaCl
  - 1 mM EDTA
  - 5 mM β-merkaptotanol
- Wzorce białkowe (Sigma, USA):
  - Anhydraza węglanowa z krwi wołowej, 29 kDa (nr kat. C7025)
  - Albumina surowicy wołowej (BSA), 66 kDa (nr kat. A8531)
  - Dehydrogenaza alkoholowa *S. cerevisiae*, 150 kDa (nr kat. A8656)
  - β-amylaza ze słodkiego ziemniaka, 200 kDa (nr kat. A8781)

## 5.14 Odczynniki do sieciowania białek

- 25% aldehyd glutarowy (Sigma, USA)
- Bufor do sieciowania:
  - 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaHPO<sub>4</sub> pH 7,5
  - 0,3 M NaCl
- 1 M Tris-HCl pH 8,0

### **5.15 Bufory i odczynniki stosowane do badania opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA i spektrofluorymetrycznego badania aktywności białek SSB**

- oligonukleotydy dT<sub>76</sub> o stężeniu 10 μM (Metabion, Niemcy)
- 5' znakowane fluoresceiną oligonukleotydy dT<sub>35</sub>, dT<sub>76</sub>, dT<sub>120</sub> o stężeniu 10 μM (Metabion, Niemcy)
- ssDNA faga M13 (New England Biolabs, USA)
- Bufor BB<sub>300</sub>:
  - 300 mM NaCl
  - 20 mM bufor fosforanowy pH 7,5
  - 1 mM EDTA pH 8,0
- Bufor BB<sub>100</sub>:
  - 100 mM NaCl
  - 20 mM bufor fosforanowy pH 7,5
  - 1 mM EDTA pH 8,0
- Bufor BB<sub>2</sub>:
  - 2 mM NaCl
  - 20 mM bufor fosforanowy pH 7,5
  - 1 mM EDTA pH 8,0

### **5.16 Odczynniki do badania zdolności białek SSB do destabilizacji dsDNA**

- Bufor BB<sub>100</sub> [Mat. 5.15]
- Fragment dsDNA (44 pz) złożony z dwóch oligonukleotydów:
  - Stab + 5' GAA CCG GAG GAA TGA TGA TGA TGA TGG TGC GGT TTG TCG GAC GG 3'
  - Stab - 5' CCG TCC GAC AAA CCG CAC CAT CAT CAT CAT TCC TCC GGT TC 3'

## **6. Metody**

### **6.1 Hodowle bakteryjne**

#### **6.1.1 Hodowle płynne**

Hodowle szczepów *E. coli* TOP10 [Mat. 5.2] prowadzono w podłożu płynnym LB [Mat. 5.3] w wytrząsarce, w temperaturze 37°C przez różny czas, w zależności od wymagań. Hodowle bakterii psychrofilnych [Mat. 5.2] prowadzono w podłożu Marine Broth 2216 [Mat. 5.3] w temperaturze optymalnej dla wzrostu danego szczepu. Hodowle zaszczepiano eżą lub przez dodatek hodowli płynnej (w stosunku 1:50).

#### **6.1.2 Hodowle na podłożu stałym**

Hodowle rekombinantowych szczepów *E. coli* TOP10 prowadzono na podłożu stałym LA [Mat. 5.3], uprzednio wylanym na płytki Petriego. Przed wylaniem płytek, do LA ostudzonego do temperatury około 50°C, dodawano ampicylinę do żądanego stężenia [Mat. 5.3]. Hodowle były prowadzone przez 16 h w temperaturze 37°C, a następnie przechowywane w 4°C.

### **6.2 Izolacja DNA genomowego z hodowli bakteryjnej**

Izolacja DNA genomowego została przeprowadzona przy użyciu zestawu „Genomic Mini AX Bacteria” (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta.

### **6.3 Izolacja DNA plazmidowego**

Izolacja DNA plazmidowego została przeprowadzona przy użyciu zestawu „Plasmid Mini” (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta.

### **6.4 Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego**

Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego została przeprowadzona przy użyciu zestawu „Gel Out” (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta.

## 6.5 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych zostało przeprowadzone przy użyciu zestawu „Clean Up” (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta.

## 6.6 Elektroforeza agarozowa

1 lub 2% żel agarozowy był przygotowywany poprzez zmieszanie odpowiedniej ilości agarozy z 50 ml buforu 1 x TAE. Mieszanina taka ogrzewana była do całkowitego rozpuszczenia agarozy, a po jej ostygnięciu dodany został roztwór bromku etydyny tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło 1 µg/ml [Mat. 5.9]. Następnie żel został wylany na specjalną waniekę z grzebieniami. Zastygnięty żel został umieszczony w aparacie do elektroforezy napełnionym buforem 1 x TAE tak, aby pokryć całą powierzchnię żelu. Odpowiednio przygotowane próbki DNA (wymieszane z ok. 5 µl buforu obciążającego) były nanoszone do studzienek w żelu powstałych po wyjęciu grzebieni. Objętość próbek wahała się od 5 µl (DNA plazmidowe) do 10 µl (produkty PCR). Do jednej ze studzienek nanoszono odpowiedni marker wielkości DNA [Mat. 5.11] w ilości zalecanej przez producenta. Elektroforezę prowadzono przez co najmniej 30 minut przy napięciu 8-10 V/cm długości żelu. Żel agarozowy po przeprowadzonej elektroforezie analizowany był pod lampą UV ( $\lambda=315$  nm) [226].

## 6.7 Amplifikacja genów *ssb* bakterii psychrofilnych *D. psychrophila*, *F. psychrophilum*, *P. profundum*, *P. haloplanktis*, *P. arcticus*, *P. cryohalolentis*, *P. ingrahamii* i *P. torquis*

- Skład mieszaniny reakcyjnej [Mat. 5.6]:

SKŁADNIK	ILOŚĆ
dNTPs	2,5 µl
starter DPSSSBNcol	1 µl
starter DPSSSBHindIII	1 µl
bufor <i>Pwo</i>	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1 µl
polimeraza <i>Pwo</i>	0,5 µl
DNA genomowe <i>D. psychrophila</i>	1 µl
woda jałowa	15,5 µl

- Profil temperaturowo-czasowy:

temperatura [°C]	czas [s]	ilość cykli
94	300	x 1
94	60	
55	60	x 35
72	60	
72	300	x 1
4	∞	

Analogiczne reakcje przeprowadzono z użyciem starterów: FPSSBNcoI i FPSSBHindIII, PARSSBNcoI i PARSSBBgIII, PCRSSBNcoI i PCRSSBHindIII, PHASSBNcoI i PHASSBHindIII, PINSSBNcoI i PINSSBHindIII, PPRSSBNcoI i PPRSSBBgIII lub PTOSSBNcoI i PTOSSBHindIII oraz odpowiedniego dla każdej pary starterów DNA genomowego.

## 6.8 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcje trawienia były prowadzone przez 3 h w temperaturze 37°C. Zastosowano odpowiednie buforu zalecane przez producenta [Mat. 5.7]. Końcowa objętość mieszaniny była równa 20 µl. Po reakcji trawienia DNA było oczyszczane przy użyciu zestawu Clean Up [Met. 6.5] lub Gel Out [Met. 6.4].

## 6.9 Ligacja fragmentów DNA

Reakcję ligacji prowadzono przez 2 h w temperaturze 18°C. Mieszanina reakcyjna zawierała ligazę DNA faga T4, ATP, bufor ligacyjny, trawiony DNA wektor i trawiony DNA insert [Mat. 5.8]. Końcowa objętość próbki wynosiła 20 µl.

Skład mieszaniny ligacyjnej:

SKŁADNIK	ILOŚĆ
bufor do ligazy	2 µl
DNA ligaza T4	0,5 µl
ATP	0,5 µl
trawiony DNA wektor	1 µl
trawiony DNA insert	16 µl

## **6.10 Analiza wyników klonowania**

### **6.10.1 Sprawdzanie obecności DNA insertu za pomocą testu opóźnienia migracji plazmidowego DNA w żelu agarozowym**

Jałowymi końcówkami do pipet automatycznych [Mat. 5.1] przenoszono wybrane kolonie do probówek zawierających 3 ml pożywki LB z ampicyliną [Mat. 5.3] i wytrząsano przez 16 h w temperaturze 37°C. Z uzyskanych hodowli izolowano DNA plazmidowe [Met. 6.3] i rozdzielano je elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym [Mat. 5.9, Met. 6.6] przez okres od 30 do 60 min pod napięciem 100 V. Otrzymany w ten sposób elektroforegram umożliwił porównanie wielkości DNA plazmidowego z wprowadzonym DNA insertu i bez niego. Plazmidy pozbawione DNA insertu cechuje zwiększona ruchliwość elektroforetyczna w stosunku do DNA plazmidów z wprowadzonym DNA insertu. Próbkę zawierającą plazmidowe DNA z wprowadzonym DNA insertu poddawano dalszej analizie.

### **6.10.2 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą reakcji PCR**

Wyizolowane DNA plazmidowe potencjalnych klonów posłużyło jako matrycowe DNA do przeprowadzenia reakcji PCR. Obecność DNA insertu w wektorze plazmidowym pBAD sprawdzano używając odpowiednich par starterów: DPSSBNcoI i DPSSBHindIII, FPSSBNcoI i FPSSBHindIII, PARSSBNcoI i PARSSBBgIII, PCRSSBNcoI i PCRSSBHindIII, PHASSBNcoI i PHASSBHindIII, PINSSBNcoI i PINSSBHindIII, PPRSSBNcoI i PPRSSBBgIII lub PTOSSBNcoI i PTOSSBHindIII [Mat. 5.6, Met. 6.7]. Analiza produktów reakcji PCR została przeprowadzona za pomocą elektroforezy agarozowej [Mat. 5.9, Met. 6.6].

### **6.10.3 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą analizy restrykcyjnej**

Za pomocą analizy restrykcyjnej sprawdzano obecność DNA insertu w wektorze pBAD. Wyizolowane DNA plazmidowe potencjalnych klonów poddano trawieniu enzymami: *NcoI* i *HindIII* lub *NcoI* i *BglII* w zależności od DNA insertu zawartego w rekombinantowym plazmidzie [Mat. 5.7, Met. 6.8]. Wyniki trawienia analizowano za pomocą elektroforezy agarozowej w 2% żelu agarozowym [Mat. 5.9, Met. 6.6].

### **6.10.4 Sprawdzenie obecności DNA insertu za pomocą sekwencjonowania DNA**

W celu jednoznacznego potwierdzenia wyników klonowania oraz sprawdzenia obecności ewentualnych mutacji punktowych w klonowanych fragmentach DNA

przeprowadzono ich sekwencjonowanie w firmie Genomed (Polska) z wykorzystaniem uniwersalnych starterów do sekwencjonowania dla wektora pBAD.

### 6.11 Elektroforeza poliakrylamidowa białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE

Białka w elektroforezie SDS-PAGE poddawane są działaniu czynnika redukującego i denaturującego, które nadają im ujemny ładunek. Następnie rozdzielane są na drodze elektroforezy ze względu na masę cząsteczkową, największe białka migrują najwolniej, a mniejsze dużo szybciej. Procentowość żelu poliakrylamidowego uzależniona jest od wielkości rozdzielanych białek i waha się w granicach 8-15%. Elektroforeza SDS-PAGE pozwala na określenie stopnia czystości preparatu białkowego, wyznaczenie masy cząsteczkowej białka bądź liczby polipeptydowych jednostek.

#### 6.11.1 Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

Przygotowanie żelu polegało na wylaniu 12% żelu rozdzielającego, a następnie żelu zagęszczającego o stałej procentowości - 5%.

Skład żeli [Mat. 5.10]:

SKŁADNIK	ŻEL ZAGĘSZCZAJĄCY 5%	ŻEL ROZDZIELAJĄCY 12%
woda destylowana	1,4 ml	3,3 ml
30% roztwór akrylamidów	0,33 ml	4 ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	0,25 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2,5 ml
10% SDS	0,02 ml	0,1 ml
10% nadsiarazan amonu	0,02 ml	0,1 ml
TEMED	0,002 ml	0,008 ml

Odpowiednio przygotowaną mieszaninę wylano między szklane szyby uszczelnione specjalnymi gumkami i spięte klipsami. Najpierw wylano żel rozdzielający, a po jego zastygnięciu żel zagęszczający. Między szybami umieszczone były grzebienie, które pozwoliły na uformowanie studzienek, do których nanoszono próbki. Żel po zastygnięciu umieszczono w aparacie do elektroforezy poliakrylamidowej wypełnionym buforem 1x Tris-glicyna [Mat. 5.10]. Do studzienek w żelu nanoszono uprzednio przygotowane próbki.

#### 6.11.2 Przygotowanie próbek do białkowej elektroforezy poliakrylamidowej

Osad komórkowy powstały po zwirowaniu 1 ml hodowli zawieszano w 100 µl buforu TE uzyskując w ten sposób lizat komórkowy. Do 20 µl próbki z białkiem lub lizatu komórkowego



dodawano 5 µl buforu lizującego [Mat. 5.10]. Tak przygotowane próbki inkubowano przez 10 min w temperaturze 99°C, po czym nanoszono do studzienek w żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforetyczny był prowadzony przy natężeniu 15 mA na każdy żel. Czas elektroforezy uzależniony był od szybkości migracji próbek i kończył się w momencie dojścia barwnika do końca żelu.

### **6.11.3 Barwienie i odbarwianie żeli poliakrylamidowych**

Po skończonym rozdziale elektroforetycznym żel wyjęto spośród szklanych szyb i umieszczono w roztworze barwiącym [Mat. 5.10] na czas około 15 min. Po tym czasie barwnik zlano, a żele umieszczono w roztworze odbarwiającym [Mat. 5.10]. Żele odbarwiano aż do momentu uzyskania odpowiedniego tła, zmieniając jednokrotnie roztwór odbarwiający.

## **6.12 Oczyszczanie białek za pomocą chromatografii jonowymiennej**

Rekombinantowe białka SSB poddano oczyszczaniu na złożu QAE-celuloza stosując technikę chromatografii jonowymiennej. Był to pierwszy etap oczyszczania białek SSB, złożony z następujących procedur:

- Hodowle bakteryjne wirowano przez 15 min przy 5 000 obr/min, a osad uzyskany z 1 l hodowli zawieszano w 30 ml buforu A<sub>0</sub> [Mat. 5.12] i poddawano sonifikacji (8 x 30 s, 23 kHz, amplituda 3 µm). Lizaty komórkowe wirowano przez 30 minut przy 12 000 obr/min w temperaturze 4°C.
- Uzyskany supernatant nanoszono na przygotowaną wcześniej kolumnę jonowymienną (anionit) ze zrównoważonym 100 ml buforu A złożem QAE-celuloza (Sigma, USA). Zastosowano stały przepływ przez kolumnę buforów A i B [Mat. 5.12] wynoszący 1 ml/min.
- Elucji dokonywano za pomocą liniowego gradientu stężeń soli w zakresie od 0,05 do 2 M NaCl. Kolumnę regenerowano przez przemywanie buforem B, a następnie buforem A [Mat. 5.12] i przechowywano w 20% etanolu. Zebrane podczas elucji frakcje analizowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [Mat. 5.10, Met. 6.11].

## **6.13 Oczyszczanie białek za pomocą chromatografii powinowactwa**

Drugim etapem oczyszczania białek SSB była chromatografia powinowactwa na złożu ssDNA - celuloza według przedstawionej poniżej procedury:

- Kolumnę zawierającą 2,5 g złoża ssDNA - celuloza (Worthington, USA), zrównoważono 50 ml buforu C [Mat. 5.12], a następnie naniesiono 5 ml preparatu białkowego (rozcieńczonego w stosunku 1:10) uzyskanego po wstępnym oczyszczeniu za pomocą chromatografii jonowymiennej.
- W celu usunięcia zanieczyszczenia preparatu innymi białkami, złożę płukano 100 ml buforu C, a następnie 100 ml buforu D [Mat. 5.12].
- Elucji rekombinantowego białka dokonywano poprzez przemywanie złoża 20 ml buforu E [Mat. 5.12] porcjami po 5 ml, frakcje zbierano i analizowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [Mat. 5.10, Met. 6.11].
- Po zakończeniu oczyszczenia, złożę zregenerowano poprzez przemycie 50 ml buforu E, a następnie 50 ml buforu C i przechowywano w buforze zawierającym 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl i 1 mM EDTA pH 8,0.
- Około 50 ml frakcji zawierającej białko przeniesiono do woreczka dializacyjnego [Mat. 5.1] i dializowano w 2 l buforu DD [Mat. 5.12], który podczas trwania dializy zmieniano trzykrotnie. Proces prowadzono 48 h, w temperaturze 4°C, przy ciągłym, delikatnym mieszaniu buforu za pomocą mieszadełka magnetycznego.
- Preparaty białkowe zagęszczano poprzez wirowanie (40 min, 5 000 obr/min) na kolumnach do zagęszczania białek (Millipore, USA) z punktem odcięcia 10 kDa.
- Uzyskane preparaty białkowe używano w dalszych badaniach, a część przechowywano w temperaturze -20°C, w postaci konserw zawierających 50% glicerolu.

#### **6.14 Badanie opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA (test retardacji)**

Badanie opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA (ang. electrophoresis mobility shift assays, EMSA) jest podstawowym badaniem aktywności białek SSB. W teście zastosowano te same ilości znakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów (10 pmol dT<sub>35</sub>, dT<sub>76</sub> lub dT<sub>120</sub>) lub ssDNA faga M13 (0,05 pmol) [Mat. 5.15] i wzrastające stężenie białka od 25 do 200 pmol. Próbkę zawierającą białko SSB oraz znakowany fluorescencyjnie oligonukleotyd lub ssDNA faga M13 inkubowano w buforze BB<sub>100</sub> [Mat. 5.15] przez 15 min, w temperaturze pokojowej. Następnie próbki nanoszono do studzienek 2% żelu agarozowego bez bromku etydy (znakowane oligonukleotydy) lub 1% żelu agarozowego z bromkiem etydy (ssDNA M13) i przeprowadzono elektroforezę (100 V, 45 min). Wyniki analizowano pod lampą UV [Mat. 5.9, Met. 6.6].

## **6.15 Określenie masy cząsteczkowej i budowy białek SSB**

W celu oszacowania natywnej masy cząsteczkowej i określenia budowy białek SSB zastosowano dwie niezależne metody: ultrawierowania w gradiencie stężeń glicerolu oraz chemicznego sieciowania aldehydem glutarowym (ang. glutaraldehyde cross-linking).

### **6.15.1 Określenie masy cząsteczkowej białek metodą ultrawierowania**

W specjalnych probówkach do ultrawierowania przygotowano liniowe gradienty stężeń glicerolu od 15 do 30% (w/v) w buforze do ultrawierowania [Mat. 5.13]. Sporządzono preparaty białek SSB i wzorców [Mat. 5.13] o stężeniu 300  $\mu$ M w buforze do ultrawierowania. 50  $\mu$ l każdego preparatu umieszczono w oddzielnych specjalnych probówkach do ultrawierowania (Beckman Coulter, USA) zawierających 3,5 ml wcześniej przygotowanego gradientu stężeń glicerolu. Próbkę wirowano przez 24 h, przy 46 000 obr/min w temperaturze 4°C w wirówce Beckman SW 60 Rotor (Beckman Coulter, USA). Po zakończeniu wirowania z powierzchni preparatów zbierano porcje po 180  $\mu$ l. Pierwsze porcje preparatów pobrane z każdej próbki połączono w jedną frakcję oznaczoną numerem 1. Drugą serię próbek pobranych z każdej próbki wirówkowej również połączono, a frakcję oznaczono numerem 2. Analogicznie postępowano z kolejnymi seriami próbek, które oznaczono kolejnymi numerami frakcji. Uzyskano w ten sposób 19 frakcji, które analizowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [Mat. 5.10, Met. 6.11], stosując aparat do elektroforezy poliakrylamidowej Hoefer SE 600 [Mat. 5.1].

### **6.15.2 Określenie budowy i oszacowanie masy cząsteczkowej metodą sieciowania chemicznego**

Próbki zawierające 10, 50 lub 100 pmoli białek SSB oraz 0,5% (v/v) aldehydu glutarowego inkubowano w buforze do sieciowania (objętość końcowa: 20  $\mu$ l) przez 15 min, w temperaturze 25°C [Mat. 5.14]. Reakcję sieciowania zatrzymywano przez dodatek 1  $\mu$ l 1 M Tris-HCl o pH 8,0 [Mat. 5.14]. Następnie próbki analizowano przy użyciu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [Mat. 5.10, Met. 6.11].

## **6.16 Spektrofluorymetryczne badanie aktywności białek SSB**

W badaniu wykorzystano spektrofluorymetr Perkin Elmer LS-5B, w którym ustawiano długość fali wzbudzenia  $\lambda_{EX}=295$  nm i długość fali emisji  $\lambda_{EM}=348$  nm. Pomiarów dokonywano przy przesłonie równej 15 nm w przypadku wzbudzenia i 5 nm w przypadku emisji. Eksperymenty wykonywano w buforze BB o stężeniu 2 mM, 100 mM i 300 mM NaCl

[Mat. 5.15], w temperaturze 25°C. Po odczytaniu wartości fluorescencji dla samego białka ( $F_0$ ) wykonywano miareczkowanie białka SSB 2  $\mu$ l oligonukleotydu dT<sub>76</sub> (10  $\mu$ M) [Mat. 5.15] i odczytywano wartości fluorescencji ( $F_N$ ). Na podstawie uzyskanych wartości sporządzano wykresy fluorescencji, na które nanoszono styczne w oparciu o model Schwarza i Watanabe'a [227]. Punkt przecięcia stycznych wyznacza długość miejsca wiązania dla tetrameru danego białka SSB. Zastosowanie buforów o różnej zawartości NaCl pozwoliło na określenie zależności długości miejsca wiązania ssDNA przez białko SSB od stężenia soli.

### **6.17 Badanie aktywności białek SSB w wysokich temperaturach**

Białka SSB inkubowano w zakresie temperatur od 50°C do 99°C (skok temperatury co 5°C) i w czasie: 1; 2,5; 5; 10; 15; 30; 45 oraz 60 min. Następnie badano aktywność białek SSB zgodnie z procedurą badania opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA [Mat. 5.15, Met. 6.14]. W eksperymentach zastosowano minimalne ilości białka SSB, które w pełni wiązało porcję oligonukleotydu dT<sub>35</sub>. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów odczytywano czas, po którym badane białko SSB traciło 50% swojej aktywności (czas półtrwania).

### **6.18 Określenie temperatury denaturacji białek SSB z wykorzystaniem skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej (DSC)**

Temperaturę denaturacji badanych białek SSB określono dzięki wykorzystaniu skaningowej kalorymetrii różnicowej. Pomiar kalorymetryczny został wykonany przy użyciu mikrokalorymetru NanoDSC (Calorimetry Science Corporation, USA) [Mat. 5.1]. Analizowano próbki białek SSB o stężeniu 2 mg/ml w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,5 zawierającym 150 mM NaCl. Wykonano skany kalorymetryczne w zakresie temperatur od 0°C do 100°C z szybkością skanowania 1°C/min. Odwracalność procesu denaturacji została zbadana poprzez schłodzenie, a następnie ponowne ogrzanie tej samej próbki białka z prędkością skanu 1°C/min. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu programu NanoAnalyse Software V 1.1 (TA Instruments, USA).

### **6.19 Badanie zdolności do obniżania temperatury topnienia dsDNA**

W eksperymentach wykorzystano spektrofluorymetr Varian Cary 300 Bio [Mat. 5.1]. Przygotowano próby zawierające jedynie dsDNA (0,67 nmol) [Mat. 5.16] oraz mieszaninę dsDNA i wybranego białka SSB (4 nmol) w buforze BB<sub>100</sub> [Mat. 5.16] w 2 ml kuwetach o długości drogi optycznej 10 mm. Dokonywano pomiarów zmiany absorbancji przy długości

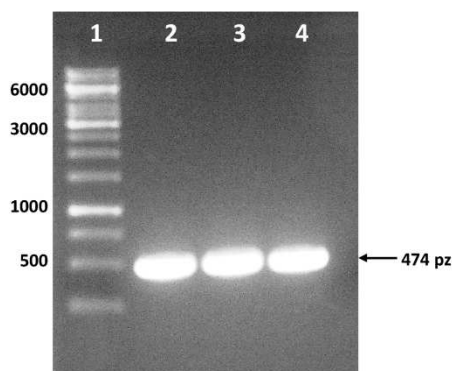
fali 260 nm ( $A_{260}$ ) stopniowo zwiększając temperaturę od 25°C do 95°C z prędkością 1°C/min. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono wykresy temperatur topnienia dsDNA w obecności i nieobecności SSB. W celu określenia zdolności białek SSB do obniżania temperatury topnienia dsDNA, odczytywano wartość temperatur dla punktu, w którym połowa dupleksu dsDNA ulegała denaturacji (*ang.* midpoint) i porównano je do wartości temperatury topnienia dupleksu w nieobecności SSB.

## 7. Wyniki

### 7.1 Klonowanie genów *ssb* bakterii psychrofilnych do wektora ekspresyjnego pBAD

#### 7.1.1 Amplifikacja genów *ssb* bakterii psychrofilnych

Geny *ssb* *D. psychrophila*, *F. psychrophilum*, *P. profundum*, *P. haloplanktis*, *P. arcticus*, *P. cryohalolentis*, *P. ingrahamii* i *P. torquis* zostały zamplifikowane przy użyciu starterów komplementarnych do każdego genu z końcami wiszącymi zawierającymi sekwencje miejsc rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych. Amplifikacji dokonano w zoptymalizowanych warunkach z użyciem DNA genomowego *D. psychrophila*, *F. psychrophilum*, *P. profundum*, *P. haloplanktis*, *P. arcticus*, *P. cryohalolentis*, *P. ingrahamii* i *P. torquis* [Met. 6.7]. Produkty tych reakcji nazwano kolejno dpsssb, fpsssb, pprssb, phassb, parssb, pcrssb, pinssb i ptossb, a ich wielkości wynosiły odpowiednio: 446, 443, 569, 749, 662, 677, 687 i 474 pz. Po przeprowadzonych reakcjach PCR produkty oczyszczono [Met. 6.4]. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR otrzymanych z użyciem matrycy *P. torquis* i starterów PTOSSBNcoI oraz PTOSSBHindIII przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 11).



Rys. 11 Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy genomowego DNA *P. torquis*. Legenda: 1 – marker M250-10000 [Mat. 5.11]; 2-4 – produkt PCR otrzymany przy temperaturze przyłączenia starterów: 50°C (2), 55°C (3) i 60°C (4).

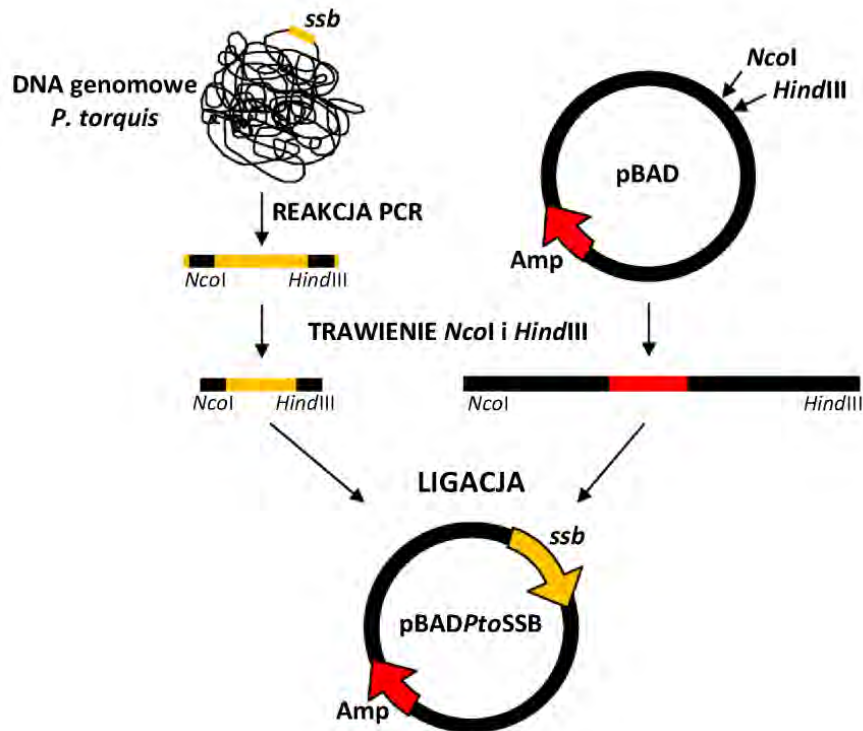
#### 7.1.2 Konstrukcja plazmidów rekombinantowych

DNA wektora pBAD poddano trawieniu za pomocą dwóch par enzymów *NcoI* i *HindIII* oraz *NcoI* i *BglII* w dwóch oddzielnych reakcjach [Mat. 5.7, Met. 6.8]. Produkty PCR dpsssb, fpsssb, pcrssb, phassb, pinssb i ptossb trawiono enzymami *NcoI* i *HindIII*, a produkty parssb oraz pprssb – enzymami *NcoI* i *BglII*. Uzyskane produkty trawienia oczyszczono wykorzystując

zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych [Met. 6.5]. Tak przygotowane DNA wektora poddano reakcji ligacji z DNA odpowiedniego insertu [Mat. 5.8, Met. 6.9]:

- pBAD trawiony *NcoI* i *HindIII* + dpsssb, fpsssb, phassb, pcrssb pinssb lub ptossb trawione *NcoI* i *HindIII*
- pBAD trawiony *NcoI* i *BglII* + pprssb lub parssb trawiony *NcoI* i *BglII*

Komórki kompetentne *E. coli* TOP10 transformowano mieszaninami ligacyjnymi. Komórki wysiano na podłoże LA zawierające ampicylinę [Mat. 5.3] i inkubowano 16 h, w temperaturze 37°C [Met. 6.1.2]. Na płytkach wyrosło od 60 do 100 kolonii, z których wybierano po 12 i zaszczepiano potencjalne klony na podłożu LB z ampicyliną [Mat. 5.3]. Po 16 h hodowli wyizolowano DNA rekombinantowych plazmidów [Met. 6.3]. Schemat klonowania na przykładzie klonowania produktu ptossb przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 12).



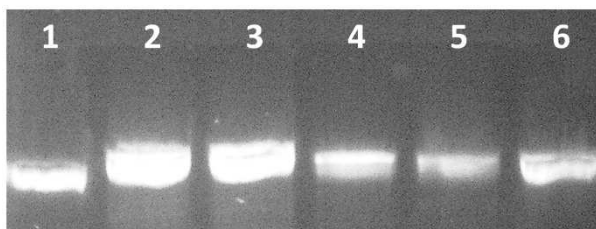
Rys. 12 Schemat klonowania produktu PCR ptossb do wektora pBAD.

### 7.1.3 Potwierdzenie obecności DNA insertów w plazmidach rekombinantowych

Obecność DNA insertów w rekombinantowych plazmidach pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB i pBADPtoSSB potwierdzono za pomocą: testu opóźnienia migracji plazmidowego DNA w żelu agarozowym [Met. 6.10.1], reakcji PCR [Met. 6.10.2], analizy restrykcyjnej [Met. 6.10.3] i sekwencjonowania DNA [Met. 6.10.4].

### 7.1.3.1 Analiza opóźnienia migracji DNA plazmidowego w żelu agarozowym

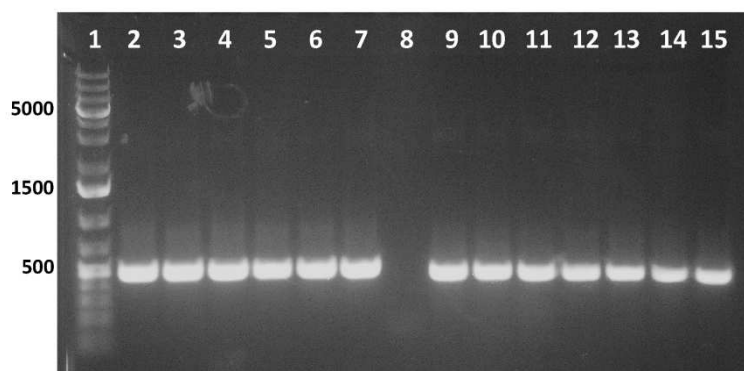
Obecność DNA insertów w DNA plazmidów pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB i pBADPtoSSB potwierdzono za pomocą testu opóźnienia migracji plazmidowego DNA w 1% żelu agarozowym. Na rysunku przedstawiono analizę opóźnienia migracji elektroforetycznej na przykładzie DNA plazmidowego klonów pBADPinSSB (Rys. 13).



Rys. 13 Rozdział elektroforetyczny DNA plazmidu pBAD oraz DNA rekombinantowych plazmidów pBADPprSSB. Legenda: 1 – wektor pBAD (4094 pz); 2-6 – DNA plazmidowe klonów pBADPprSSB (4631 pz).

### 7.1.3.2 Potwierdzenie obecności DNA insertu w DNA plazmidów za pomocą reakcji PCR

Przeprowadzono reakcje amplifikacji z wykorzystaniem tych samych starterów, które używano do otrzymania DNA insertów do klonowania [Mat. 5.6, Met. 6.7]. Jako matryce stosowano wyizolowane DNA plazmidów pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB i pBADPtoSSB, które wykazywały opóźnienie migracji w żelu agarozowym. Produkty reakcji PCR analizowano w 2% żelu agarozowym [Mat. 5.9, Met. 6.6]. W przypadku DNA plazmidów rekombinantowych w wyniku reakcji PCR otrzymano produkty odpowiadające wielkościom DNA insertów (Rys. 14).



Rys. 14 Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na matrycy DNA plazmidów rekombinantowych pBADPtoSSB i pBADDpsSSB. Legenda: 1 – marker M75-20000 [Mat. 5.11]; 2-7 – DNA plazmidowe klonów pBADPtoSSB (produkt 474 pz); 8 – kontrola negatywna; 9-15 – DNA plazmidowe klonów pBADDpsSSB (produkt 446 pz).



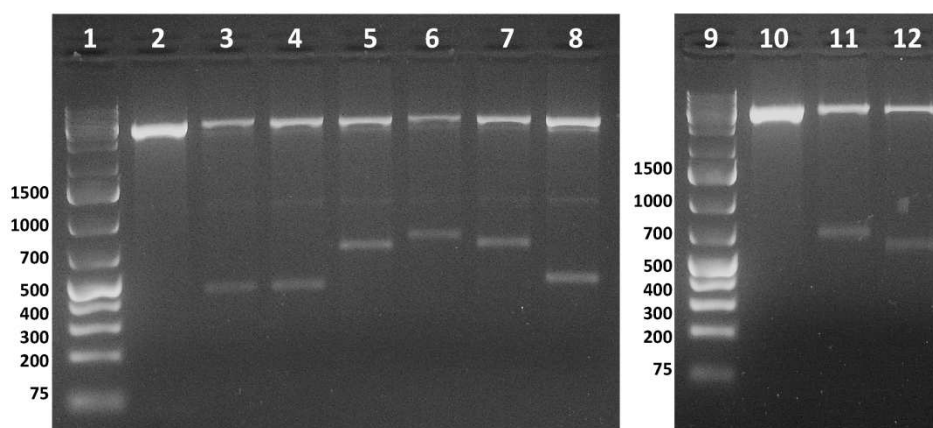
### 7.1.3.3 Potwierdzenie obecności DNA insertów w DNA plazmidów za pomocą analizy restrykcyjnej

Obecność DNA insertów w DNA plazmidów pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB i pBADPtoSSB potwierdzono także za pomocą analizy restrykcyjnej enzymami *NcoI* i *HindIII* lub *NcoI* i *BglII* [Mat. 5.7, Met. 6.8]. Oczekiwane produkty trawienia zestawiono w tabeli (Tab. 3).

Plazmid	zastosowane enzymy restrykcyjne	oczekiwane produkty trawienia [pz]
pBAD	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 48
pBAD	<i>NcoI</i> i <i>BglII</i>	4077, 17
pBADDpsSSB	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 434
pBADFpsSSB	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 428
pBADPprSSB	<i>NcoI</i> i <i>BglII</i>	4077, 554
pBADPhaSSB	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 737
pBADParSSB	<i>NcoI</i> i <i>BglII</i>	4077, 647
pBADPcrSSB	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 665
pBADPinSSB	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 674
pBADPtoSSB	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i>	4046, 459

Tab. 3 Zestawienie oczekiwanych produktów trawienia DNA plazmidowego enzymami restrykcyjnymi.

W przypadku DNA plazmidów rekombinantowych w wyniku reakcji trawienia uzyskano oczekiwane fragmenty DNA (Rys. 15). Wyniki analizowano w 2% żelu agarozowym [Mat. 5.9, Met. 6.6].



Rys. 15 Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia DNA rekombinantowych plazmidów pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB i pBADPtoSSB. Legenda: 1, 9 – marker M75-20000 [Mat. 5.11]; 2-8 – plazmidy trawione *NcoI* i *HindIII*; 2 – pBAD; 3 – pBADDpsSSB; 4 – pBADFpsSSB; 5 – pBADPcrSSB; 6 – pBADPhaSSB; 7 – pBADPinSSB; 8 – pBADPtoSSB; 10-12 – plazmidy trawione *NcoI* i *BglII*; 10 – pBAD; 11 – pBADParSSB; 12 – pBADPprSSB.

### 7.1.3.4 Potwierdzenie obecności DNA insertu w DNA plazmidów za pomocą sekwencjonowania DNA

Dla każdego rekombinowanego układu wybrano po jednym plazmidzie zawierającym DNA insertu i poddano sekwencjonowaniu [Met. 6.10.4]. Poniżej przedstawiono wynik sekwencjonowania plazmidu pBADPtoSSB porównany z sekwencją genu *ssb* *P. torquis* zamieszczoną w banku genów NCBI (AFU68265.1) (Rys. 16).

Wynik sekwencjonowania wykazuje 100% zgodność sekwencji nukleotydowej DNA insertu z sekwencją genu *ssb* *P. torquis* (456 pz). Analogicznie przeprowadzono analizę wyników sekwencjonowania pozostałych rekombinantowych plazmidów i potwierdzono zgodność sekwencji nukleotydowych wklonowanych genów z sekwencjami nukleotydowymi zamieszczonymi w bazie NCBI.

```

      *           20           *           40           *           60           *
sekwPtoSSB: ATGGCAGGAACACTCAATAAAGTTATGCTCATAGGCCATACTGGTGATGAGGTAAGATGCATTATTTTG : 70
Ptorquis : ATGGCAGGAACACTCAATAAAGTTATGCTCATAGGCCATACTGGTGATGAGGTAAGATGCATTATTTTG : 70

      80           *           100          *           120          *           140
sekwPtoSSB: AAGGTGGGAATTGTATTGGGCGCTTTCCCTTTGGCCACAAATGAAGAGTACATTAATAAAGCTACCAACGA : 140
Ptorquis : AAGGTGGGAATTGTATTGGGCGCTTTCCCTTTGGCCACAAATGAAGAGTACATTAATAAAGCTACCAACGA : 140

      *           160           *           180           *           200           *
sekwPtoSSB: AAAAGTAAGCAATACAGAATGGCACACTATAGTTGTGAGAAATAAGGCTGCTGAAGTTTGTGAAAAATAC : 210
Ptorquis : AAAAGTAAGCAATACAGAATGGCACACTATAGTTGTGAGAAATAAGGCTGCTGAAGTTTGTGAAAAATAC : 210

      220          *           240          *           260          *           280
sekwPtoSSB: CTCAAAAAGGGGATAAAGTATATATTTGAAGGACGTATTTAAAAACAAAAAATGGCAGGATGATAAAGGAA : 280
Ptorquis : CTCAAAAAGGGGATAAAGTATATATTTGAAGGACGTATTTAAAAACAAAAAATGGCAGGATGATAAAGGAA : 280

      *           300           *           320           *           340           *
sekwPtoSSB: TGGATAGATATTCTACAGAGATACAGTGTTTAGAATTTACATTTTTAACACCAAAGGATCCAGTTACTCC : 350
Ptorquis : TGGATAGATATTCTACAGAGATACAGTGTTTAGAATTTACATTTTTAACACCAAAGGATCCAGTTACTCC : 350

      360          *           380          *           400          *           420
sekwPtoSSB: TCAACCACCAACTCAAGTCCCCTCAGCTCCGCAACAACAACACTGCTTCAAAACCATCTACAAGCCTCAG : 420
Ptorquis : TCAACCACCAACTCAAGTCCCCTCAGCTCCGCAACAACAACACTGCTTCAAAACCATCTACAAGCCTCAG : 420

      *           440           *
sekwPtoSSB: GCTATAGAAGAGGAGGAAGATGATCTACCCTTTTAA : 456
Ptorquis : GCTATAGAAGAGGAGGAAGATGATCTACCCTTTTAA : 456

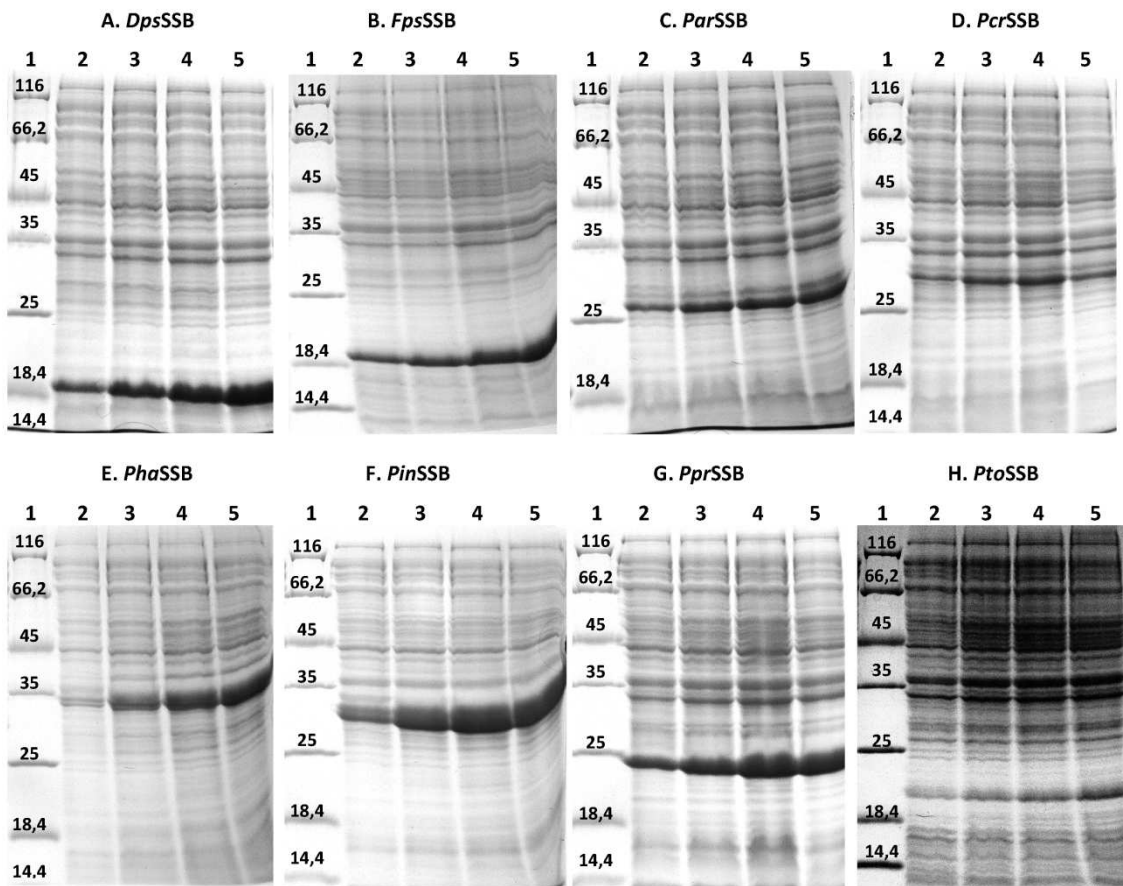
```

Rys. 16 Porównanie sekwencji DNA insertu uzyskanej w wyniku sekwencjonowania plazmidu pBADPtoSSB (sekwPtoSSB) z sekwencją nukleotydową genu *ssb* *P. torquis* dostępną w bazie danych NCBI (Ptorquis).

## 7.2 Produkcja rekombinantowych białek SSB

Skonstruowane plazmidy rekombinantowe pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB oraz pBADPtoSSB umożliwiły wydajną produkcję białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB*. W tym celu kompetentne komórki *E. coli* TOP10 transformowano DNA plazmidowym wektorów

ekspresyjnych pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB, pBADPhaSSB, pBADPinSSB, pBADPprSSB oraz pBADPtoSSB. Mieszanki transformacyjne wysiano na płytki z podłożem LA zawierającym ampicylinę w odpowiednim stężeniu [Mat. 5.3]. Kolonie *E. coli* zawierające plazmidy rekombinantowe zaszczepiono do 20 ml pożywki LB z ampicyliną [Mat. 5.3, Met.6.1.1]. Hodowle prowadzono przez 16 h, w temperaturze 37°C, a następnie przeniesiono do 1000 ml świeżego LB zawierającego antybiotyk [Mat. 5.3]. Gdy hodowle osiągnęły OD<sub>600</sub> w zakresie 0,3 - 0,5 dodano arabinozę do końcowego stężenia 0,02% [Mat. 5.3]. Po indukcji hodowle prowadzono przez kolejne 6 lub 20 h, po czym zwirowano (15 min, 5 000 obr/min). Produkcję każdego z białek wcześniej zoptymalizowano, a rezultaty analizowano za pomocą białkowej elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach denaturujących SDS-PAGE [Mat. 5.10, Met. 6.11] (Rys. 17).



Rys. 17 Elektroforegramy przedstawiające wyniki optymalizacji produkcji rekombinantowych białek SSB w *E. coli* TOP10: *DpsSSB* (A), *FpsSSB* (B), *ParSSB* (C), *PcrSSB* (D), *PhaSSB* (E), *PinSSB* (F), *PprSSB* (G) i *PtoSSB* (H). Legenda: 1 – białkowy marker wielkości UPMWM [Mat. 5.11]; 2 – lizat komórkowy 2 h po indukcji; 3 – lizat komórkowy 4 h po indukcji; 4 – lizat komórkowy 6 h po indukcji; 5 – lizat komórkowy 20 h po indukcji.

Hodowle rekombinantowych szczepów *E. coli* TOP10 zawierających plazmidy pBADPprSSB, pBADParSSB, pBADPcrSSB oraz pBADPinSSB prowadzono przez 6 h po indukcji ekspresji arabinozą, natomiast hodowle rekombinantowych szczepów *E. coli* TOP10

zawierających plazmidy pBADDpsSSB, pBADFpsSSB, pBADPhaSSB oraz pBADPtoSSB – przez 20 h po indukcji.

### 7.3 Oczyszczanie rekombinantowych białek SSB

Do procesu oczyszczania użyto lizaty komórkowe uzyskane z 1 l hodowli szczepów *E. coli* TOP10 pBADDpsSSB, *E. coli* TOP10 pBADFpsSSB, *E. coli* TOP10 pBADPprSSB, *E. coli* TOP10 pBADPhaSSB, *E. coli* TOP10 pBADParSSB, *E. coli* TOP10 pBADPcrSSB, *E. coli* TOP10 pBADPinSSB oraz *E. coli* TOP10 pBADPtoSSB. W pierwszym etapie przeprowadzono dezintegrację komórek za pomocą ultradźwięków. Po zwirowaniu, supernatant nanoszono na kolumnę do chromatografii jonowymiennej ze złożem QAE-celuloza [Mat. 5.12, Met. 6.12]. Elucję białek z tego złoża przeprowadzono z wykorzystaniem liniowego gradientu stężenia soli w zakresie od 0,05 do 2 M NaCl w buforze A [Mat. 5.12]. Kolejnym etapem oczyszczania była chromatografia powinowactwa na złożu ssDNA-celuloza [Mat. 5.12, Met. 6.13]. Zebrane frakcje zawierające białka *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* dializowano w buforze DD [Mat. 5.12], a następnie zagęszczono.

Wartości końcowych stężeń białek zestawiono w tabeli (Tab. 4). Wyniki oczyszczania analizowano w 12% żelu poliakrylamidowym [Mat. 5.10, Met. 6.11]. Uzyskano preparaty rekombinantowych białek SSB o czystości 95-98%.

Białko SSB	stężenie końcowe
<i>DpsSSB</i>	7 mg/ml
<i>FpsSSB</i>	8,5 mg/ml
<i>ParSSB</i>	4,8 mg/ml
<i>PcrSSB</i>	6,5 mg/ml
<i>PhaSSB</i>	4 mg/ml
<i>PinSSB</i>	6 mg/ml
<i>PprSSB</i>	3 mg/ml
<i>PtoSSB</i>	6,5 mg/ml

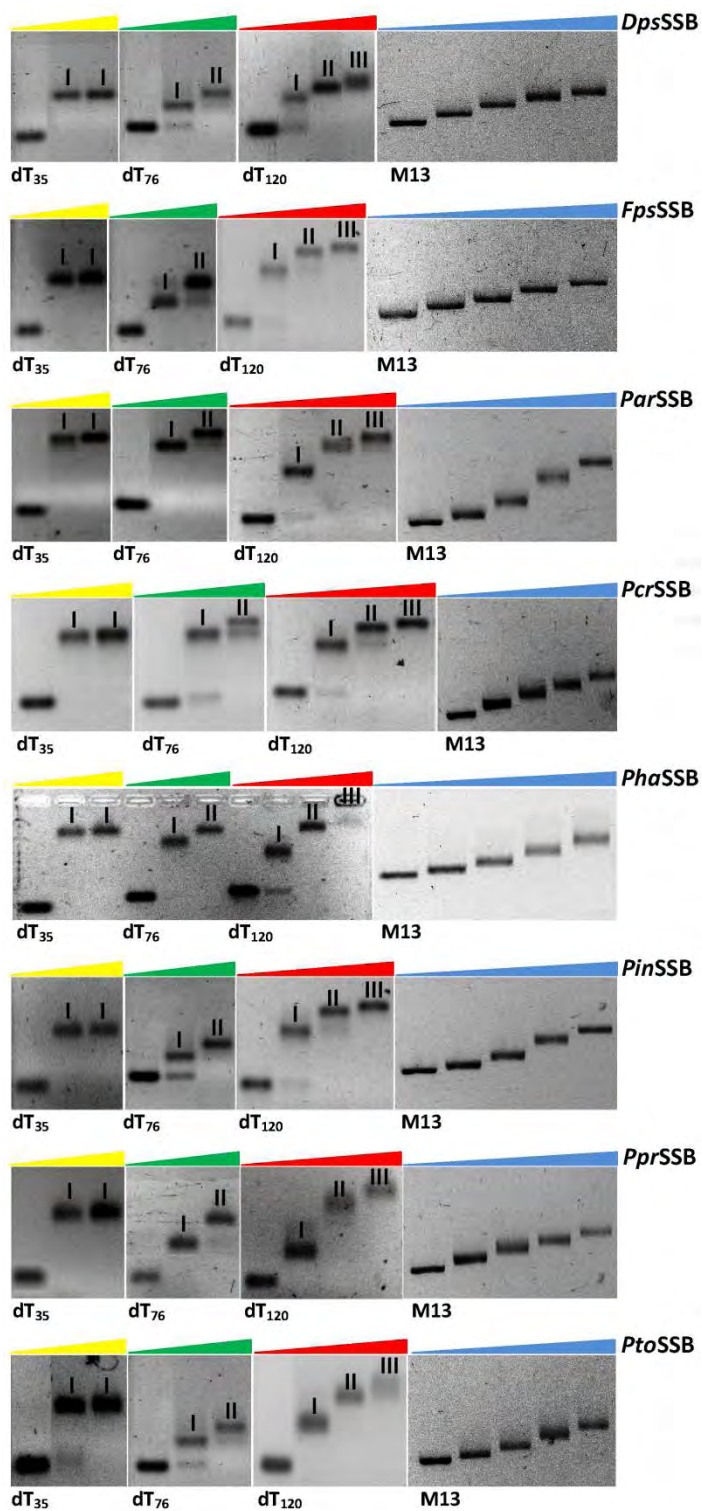
Tab. 4 Stężenia końcowe preparatów badanych białek SSB.

## 7.4 Charakterystyka molekularna psychrofilnych białek SSB

### 7.4.1 Badanie opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko:ssDNA

Testy opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej kompleksów białko SSB:ssDNA (testy EMSA) umożliwiły wykazanie zdolności wiązania jednoniciowego kwasu nukleinowego przez badane białka SSB. Przeprowadzono doświadczenia z użyciem znakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów dT<sub>35</sub>, dT<sub>76</sub> oraz dT<sub>120</sub> (indeksy oznaczają liczbę nukleotydów we fragmencie jednoniciowego DNA), dzięki czemu możliwe było wstępne określenie długości miejsca wiązania ssDNA przez badane białka [Mat. 5.15, Met. 6.14]. W celu sprawdzenia zdolności białek SSB do wiązania dłuższych fragmentów jednoniciowego DNA, przeprowadzono także testy retardacji z ssDNA faga M13 (7 250 nt) [Mat. 5.15, Met. 6.14]. Stężenia oligonukleotydów oraz ssDNA M13 w każdej próbce były takie same i wynosiły odpowiednio 10 pmol i 0,05 pmol, natomiast stężenie białek SSB było rosnące w kolejnych próbkach (25-200 pmol). Wyniki doświadczeń dla psychrofilnych białek SSB zestawiono na rysunku 18.

W testach EMSA z użyciem oligonukleotydu dT<sub>35</sub> tworzył się jeden kompleks oligonukleotyd dT:białko co oznacza, że na jedną cząsteczkę oligonukleotydu przypada jedna cząsteczka danego białka SSB. W teście z oligonukleotydem dT<sub>76</sub> powstawały dwa kompleksy oligonukleotyd dT:białko, co wskazuje, że na jedną cząsteczkę tego oligonukleotydu przypadają dwie cząsteczki białka SSB. Natomiast trzy cząsteczki białka wiążą jedną cząsteczkę oligonukleotydu dT<sub>120</sub>, o czym świadczy powstawanie trzech kompleksów dT:białko (Rys. 18). Intensywność świecenia kompleksów, wraz ze wzrostem stężenia białka, nie zmienia się. Oligonukleotyd znakowany fluoresceiną na końcu 5' jest oplatany przez białko w taki sposób, że nie dochodzi do jego całkowitego wygaszenia. W testach retardacji z wykorzystaniem ssDNA faga M13 ilość utworzonych kompleksów rośnie wraz ze wzrostem stężenia białek SSB. Białka SSB wiążąc się do ssDNA M13 ograniczają dostęp do zasad kwasu nukleinowego, w które może interkalować bromek etydyny, co powoduje widoczne w przypadku białek *FpsSSB*, *PhaSSB* i *PprSSB* osłabienie sygnału kompleksów SSB:ssDNA (Rys. 18). Ponadto, na podstawie ilości powstałych kompleksów białko:ssDNA w eksperymentach z oligonukleotydami (dT), długość miejsca wiązania jednoniciowego DNA przez badane psychrofilne białka SSB oszacowano na 35 nt. Wyniki testów retardacji z oligonukleotydami (dT) oraz ssDNA faga M13 potwierdzają zdolność wiązania się badanych białek SSB do jednoniciowego DNA.

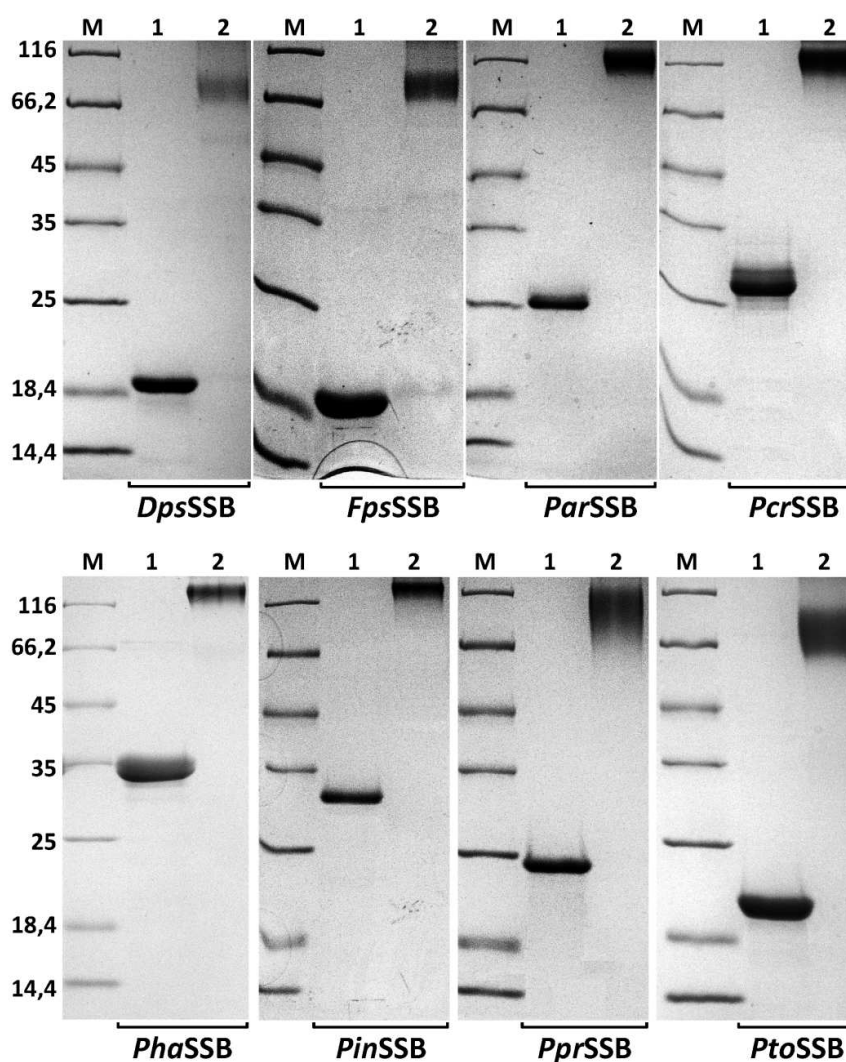


Rys. 18 Rozdział elektroforetyczny kompleksów psychrofilnych białek SSB z oligonukleotydami (dT) o różnej długości i ssDNA faga M13. Legenda: I, II i III – kolejne utworzone kompleksy SSB:dT; kolorowe trójkąty - rosnące stężenie białek SSB: żółty – 25 i 50 pmol; zielony – 50 i 100 pmol; czerwony – 50, 100 i 200 pmol; niebieski – 25, 50, 100 i 200 pmol.

#### 7.4.2 Określenie masy cząsteczkowej i budowy białek SSB

W celu oszacowania masy natywnej i określenia budowy badanych białek SSB zastosowano dwie niezależne metody: chemicznego sieciowania aldehydem glutarowym (ang. glutaraldehyde cross-linking) oraz ultrawierowania w gradiencie stężeń glicerolu.

Badane białka SSB inkubowano w buforze do sieciowania z aldehydem glutarowym przez 15 min, w temperaturze 25°C [Mat. 5.14, Met. 6.15.2]. Po zatrzymaniu reakcji sieciowania próbki analizowano przy użyciu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [Mat. 5.10, Met. 6.11]. Wyniki rozdziłu elektroforetycznego próbek po reakcji sieciowania przedstawiono poniżej (Rys. 19).

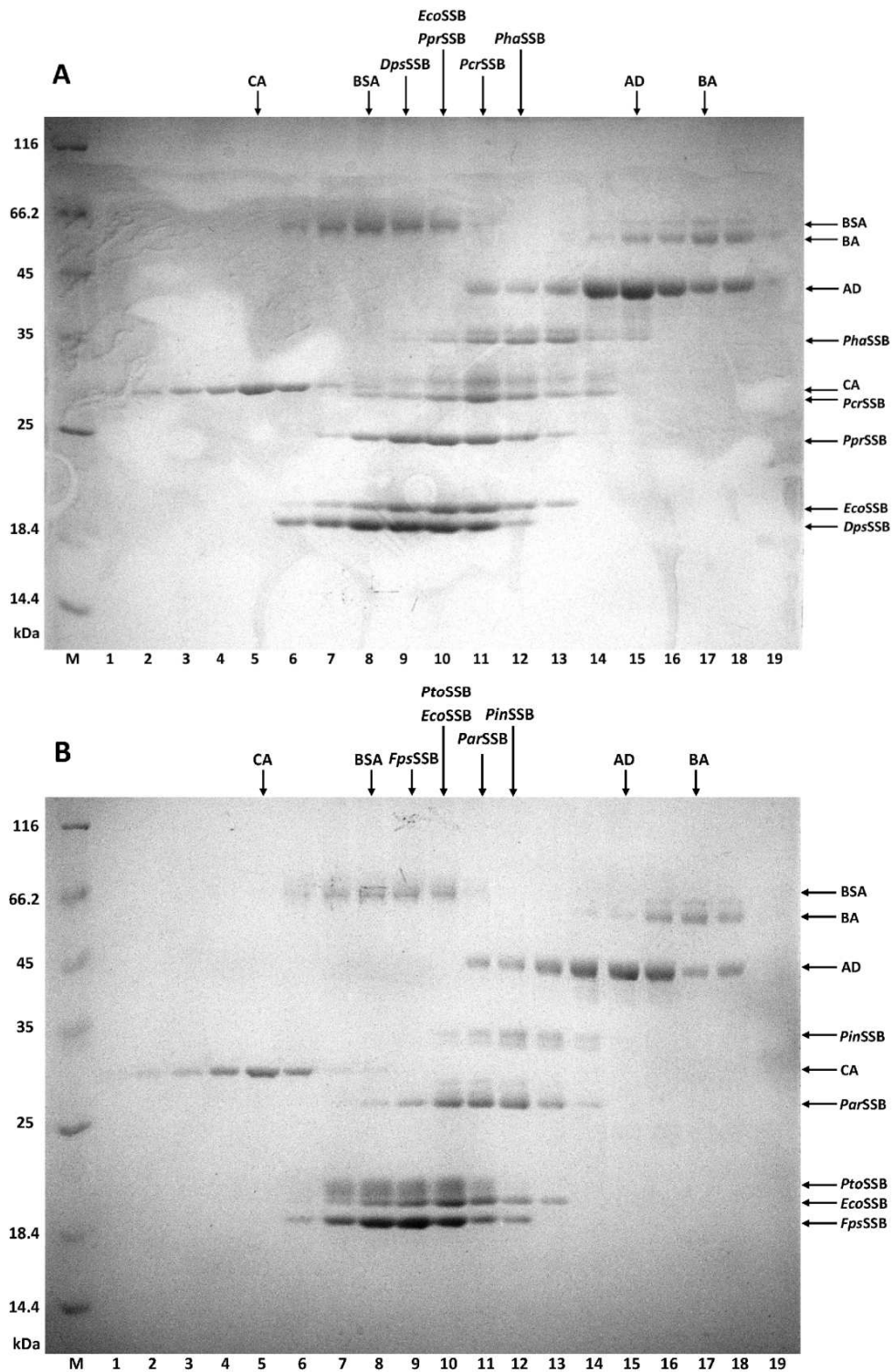


Rys. 19 Elektroforegramy przedstawiające wyniki chemicznego sieciowania psychrofilnych białek SSB aldehydem glutarowym. Legenda: M – białkowy marker wielkości UMPWM [Mat. 5.11]; 1 – SSB w buforze bez aldehydu glutarowego; 2 – SSB w buforze z aldehydem glutarowym.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano, że monomery badanych białek SSB wykazują większe (od około 2 do prawie 8 kDa) opóźnienie migracji elektroforetycznej niż wynikałoby to z ich masy cząsteczkowej obliczonej na podstawie sekwencji aminokwasowej. Wynikające z rozdziału elektroforetycznego masy monomerów białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PprSSB*, *PhaSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PinSSB* i *PtoSSB* wynoszą odpowiednio: 20 kDa, 21 kDa, 25 kDa, 27 kDa, 34 kDa, 32 kDa, 24 kDa oraz 21 kDa. Na podstawie uzyskanego rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji sieciowania oszacowano masę molekularną natywnych form badanych białek SSB. Masa cząsteczkowa białek *DpsSSB* i *PtoSSB* wynosi około 80 kDa, *FpsSSB* – około 90 kDa, *PprSSB* – około 100 kDa, a dla białek *ParSSB* i *PcrSSB* odpowiednio 110 kDa i 120 kDa. Prążki w żelu poliakrylamidowym odpowiadające sieciowanym białkom *PhaSSB* i *PinSSB*, znajdują się wyżej niż prążek odpowiadający wzorcowi o największej masie w białkowym markerze wielkości. Reakcję sieciowania tych dwóch białek powtórzono, a jej produkty analizowano z wykorzystaniem białkowego markera o większym zakresie. Masę molekularną *PhaSSB* i *PinSSB* oszacowano na 130 kDa dla obu białek. Wyników tej analizy nie pokazano ze względu na niską jakość uzyskanych obrazów. Otrzymane wartości masy cząsteczkowej badanych białek SSB podzielono przez wartości mas molekularnych ich monomerów wynikające z rozdziału elektroforetycznego, otrzymując wartości w zakresie od 3,8 do 4,4. Na podstawie tych obliczeń stwierdzono, że badane białka SSB wykazują budowę homotetrameryczną, tak jak większość bakteryjnych białek SSB.

Do eksperymentów ultrawierowania w gradiencie stężeń glicerolu przygotowano preparaty psychrofilnych białek SSB, kontrolnego białka SSB, którym było *EcoSSB* oraz białek wzorcowych [Mat. 5.13, Met. 6.15.1]. Frakcje po ultrawierowaniu, zbierane z powierzchni gradientu, analizowano w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [Mat. 5.10, Met. 6.11] (Rys. 20).





Rys. 20 Elektroforegramy przedstawiające wyniki ultrawierowania psychrofilnych białek SSB, *EcoSSB* oraz białek wzorcowych. Legenda: M – białkowy marker wielkości UPMWM [Mat. 5.11]; 1-19 – kolejne frakcje zbierane z powierzchni gradientu glicerolu po ultrawierowaniu; białka wzorcowe: CA – anhidraza węglanowa (29 kDa, monomer), BSA – albumina surowicy wołowej (66 kDa, monomer), AD – dehydrogenaza alkoholowa (150 kDa, tetramer), BA –  $\beta$ -amylaza (200 kDa, tetramer) [Mat. 5.13]. Pionowymi strzałkami oznaczono frakcje, w których stężenie danego białka było największe.

W celu sporządzenia rozkładu mas cząsteczkowych w gradiencie glicerolu brano pod uwagę frakcje, w których stężenie białek wzorcowych i modelowego białka *EcoSSB* było największe. Takie założenie umożliwiło oszacowanie wartości masy cząsteczkowej w poszczególnych frakcjach po ultrawiirowaniu. Największe stężenie wzorcowych białek: anhidrazy węglanowej, BSA, dehydrogenazy alkoholowej i  $\beta$ -amylazy znajdowało się we frakcjach o numerach odpowiednio 5, 8, 15 i 17, natomiast największa ilość białka *EcoSSB* była obecna we frakcji 10. Rozkład mas cząsteczkowych w zakresie od 29 kDa do 200 kDa, uwzględniający numery frakcji po ultrawiirowaniu, przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 5).

numer frakcji	białko wzorcowe	masa cząsteczkowa [kDa]	badane białko SSB
5	anhidraza węglanowa	29	
6	-	41	
7	-	53	
8	BSA	66	
9	-	71	<i>DpsSSB</i> , <i>FpsSSB</i>
10	<i>EcoSSB</i>	76	<i>PprSSB</i> , <i>PtoSSB</i>
11	-	91	<i>ParSSB</i> , <i>PcrSSB</i>
12	-	106	<i>PhaSSB</i> , <i>PinSSB</i>
13	-	120	
14	-	135	
15	dehydrogenaza alkoholowa	150	
16	-	175	
17	$\beta$ -amylaza	200	

Tab. 5 Rozkład mas cząsteczkowych po ultrawiirowaniu oszacowany w oparciu o białka wzorcowe oraz *EcoSSB*. W tabeli uwzględniono również badane psychrofilne białka SSB w celu ułatwienia analizy otrzymanych wyników.

Analiza wyników ultrawiirowania wykazała, że największe stężenie białek *DpsSSB* i *FpsSSB* znajdowało się we frakcji 9, a białek *PprSSB* i *PtoSSB* – we frakcji 10. We frakcji 11 obecne w największej ilości były białka *ParSSB* i *PcrSSB*, natomiast we frakcji 12 – białka *PhaSSB* i *PinSSB* (Rys. 20, Tab. 5). Uwzględniając sporządzony rozkład mas we frakcjach po ultrawiirowaniu, wyznaczono masy cząsteczkowe psychrofilnych białek SSB, które wynoszą: 71 kDa dla *DpsSSB* i *FpsSSB*, 76 kDa dla *PprSSB* i *PtoSSB*, 91 kDa dla *ParSSB* i *PcrSSB* oraz 106 kDa dla *PhaSSB* i *PinSSB*. Na podstawie stosunku tych mas do mas monomerów stwierdzono, że wszystkie badane białka SSB posiadają budowę tetrameryczną.

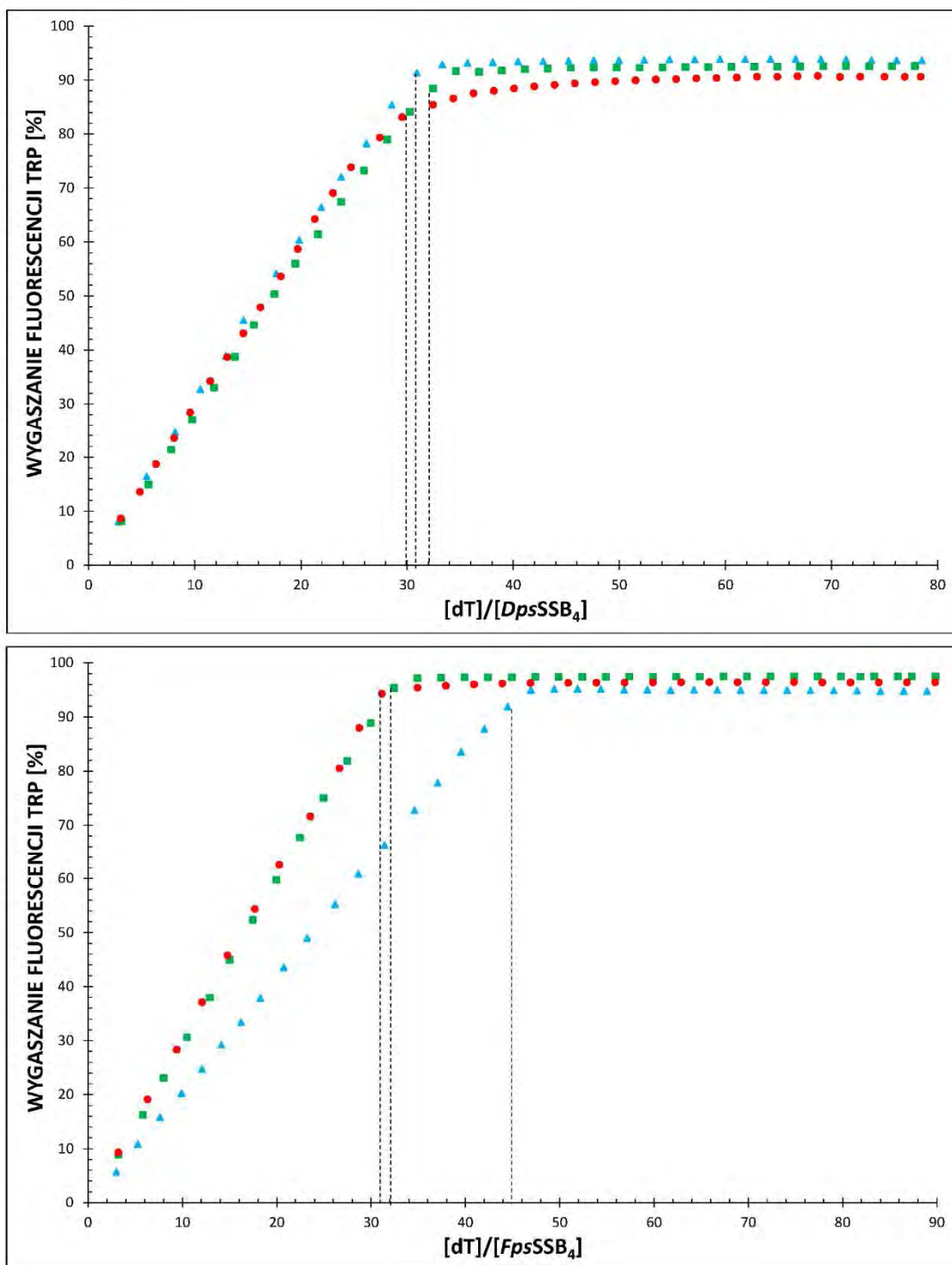
### 7.4.3 Spektrofluorymetryczne badanie aktywności białek SSB

Reszty tryptofanu wykazują naturalną fluorescencję, którą wywołuje przejście elektronu ze stanu wzbudzonego do różnych stanów oscylacyjnych stanu podstawowego. Zjawisku temu towarzyszy emisja fali o długości  $\lambda_{EM}=348$  nm. Dodanie różnego rodzaju wygaszaczy (np. oligonukleotydu dT<sub>76</sub>) do miejsc, w których zlokalizowane są reszty aminokwasowe wykazujące fluorescencję, informuje o wiązaniu się wygaszaczy do białek i o ich strukturze dynamicznej. Mechanizm ten został wykorzystany w badaniu wiązania się białek SSB do jednoniciowego DNA. Dzięki niemu można precyzyjnie określić obszar DNA, do którego wiąże się białko SSB.

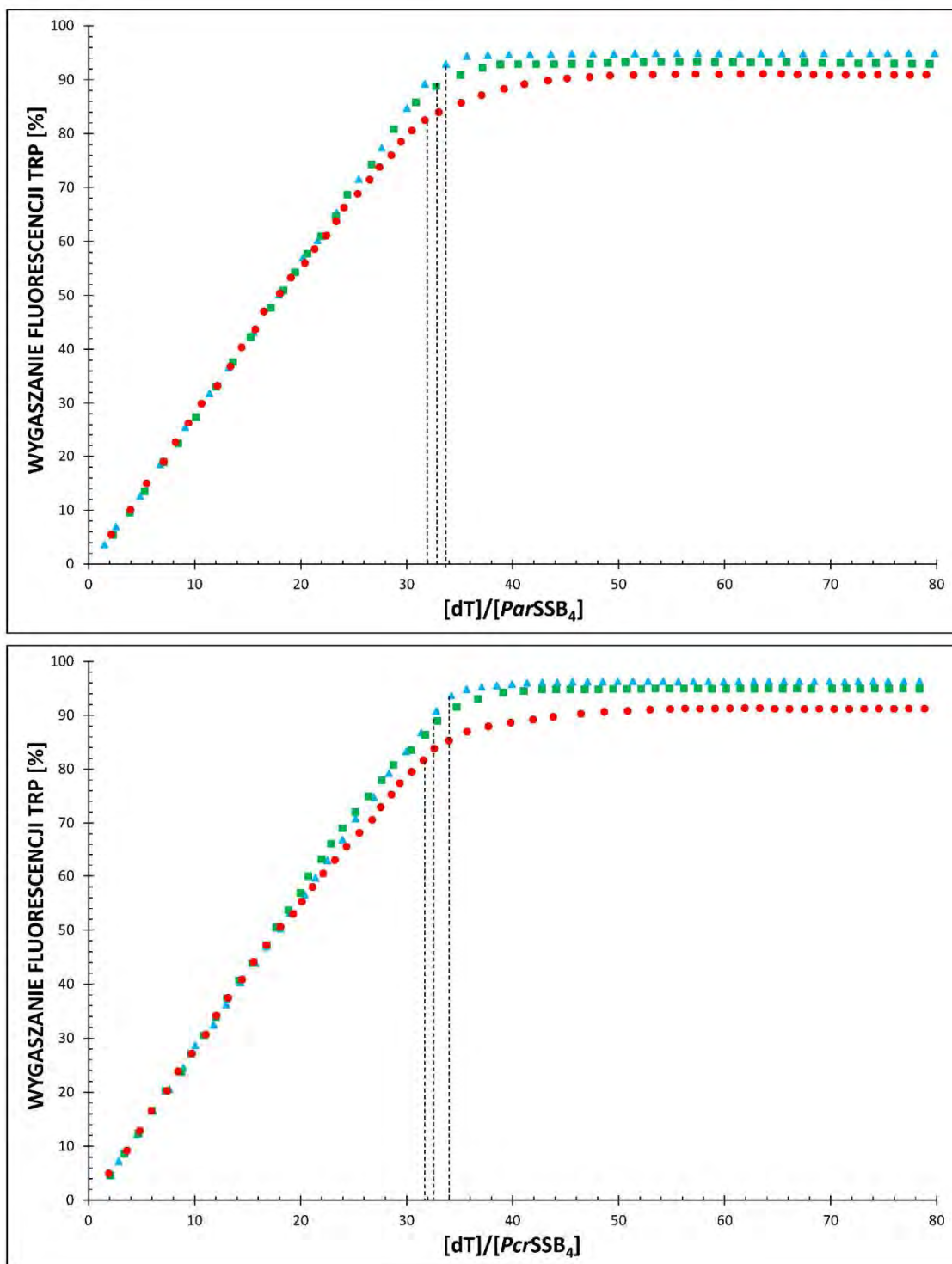
Badanie zostało przeprowadzone w kuwetach o objętości 2 ml, w buforze BB, zawierającym 2, 100 lub 300 mM NaCl oraz stałe ilości badanego białka [Mat. 5.15, Met. 6.16]. Do pomiaru wykorzystano spektrofluorymetr Perkin Elmer LS-5B przy długości fali wzbudzenia  $\lambda_{EX}=295$  nm i długość fali emisji  $\lambda_{EM}=348$  nm. Po odczytaniu wartości fluorescencji dla samego białka ( $F_0$ ), preparat miareczkowano kolejno porcjami po 2  $\mu$ l oligonukleotydu dT<sub>76</sub> (10  $\mu$ M), po czym odczytywano wartość fluorescencji ( $F_N$ ). Procent wygaszania tryptofanu obliczono ze wzoru:

$$\% \text{ wygaszania } trp = [(F_0 - F_N) \div F_0] \times 100\%$$

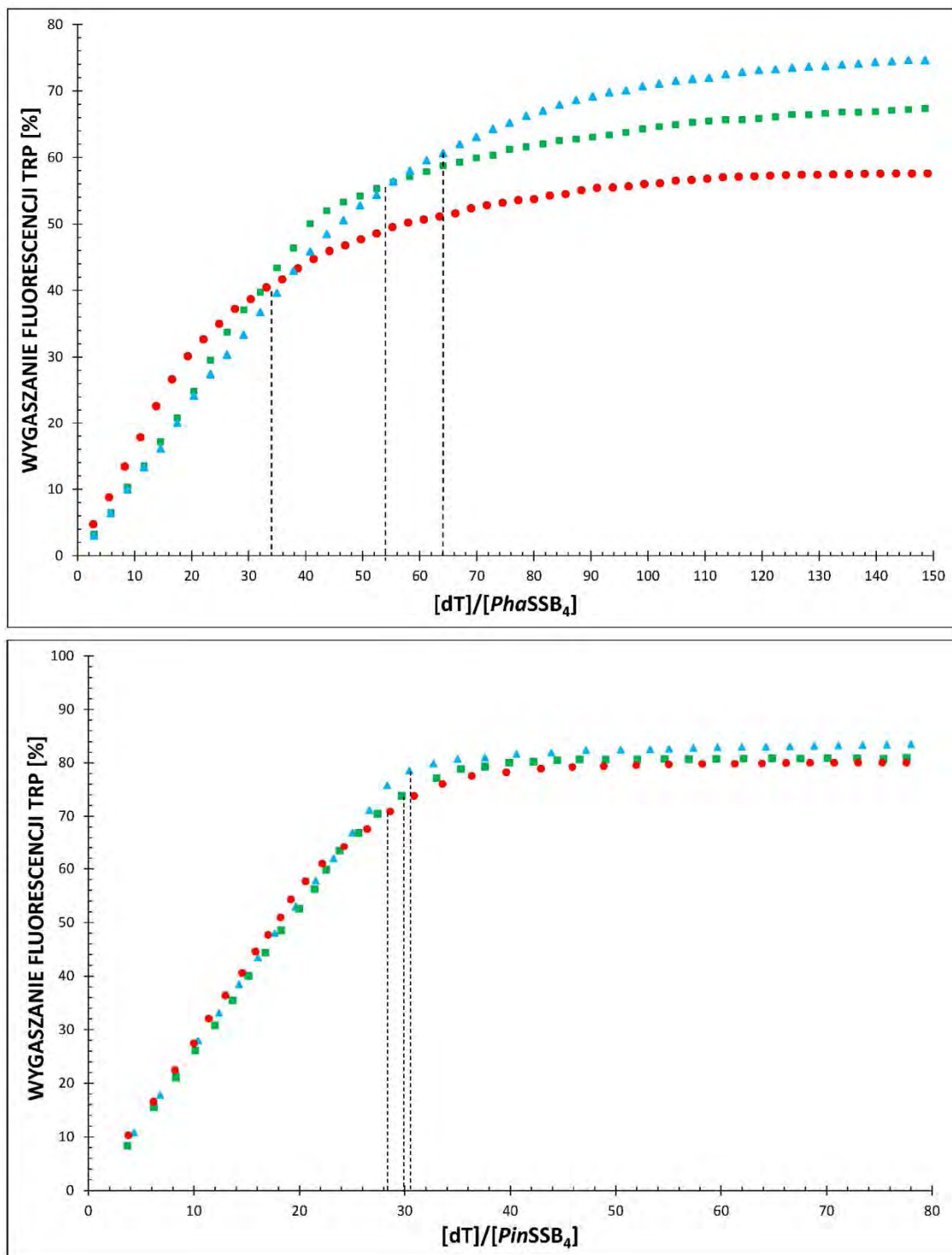
W domenie OB białek *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB* i *PtoSSB* znajdują się dwie, w domenie OB *PinSSB* i *PprSSB* trzy, a w domenie OB *DpsSSB* aż cztery reszty tryptofanowe biorące udział w wiązaniu jednoniciowego DNA. Wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych zachodziło na poziomie 90-93% dla *DpsSSB*, 91-97% dla *FpsSSB*, 91-95% dla *ParSSB*, 91-96% *PcrSSB*, 80-83% dla *PinSSB*, 87-92% dla *PprSSB* oraz 90-96% dla *PtoSSB*. Wartość wygaszania fluorescencji tryptofanu dla białka *PhaSSB* jest różna w zależności od stosowanego buforu i wynosi dla buforów BB<sub>2</sub>, BB<sub>100</sub> i BB<sub>300</sub> odpowiednio: 58%, 67% i 74%. Na podstawie uzyskanych danych sporządzono wykresy miareczkowania badanych białek SSB i wyznaczono długość miejsca wiązania jednoniciowego DNA (Rys. 21, Rys. 22, Rys. 23, Rys. 24). Uzyskane wartości wielkości miejsc wiązania dla każdego stosowanego buforu oraz stopnia wygaszania fluorescencji zebrano w tabeli (Tab. 6).



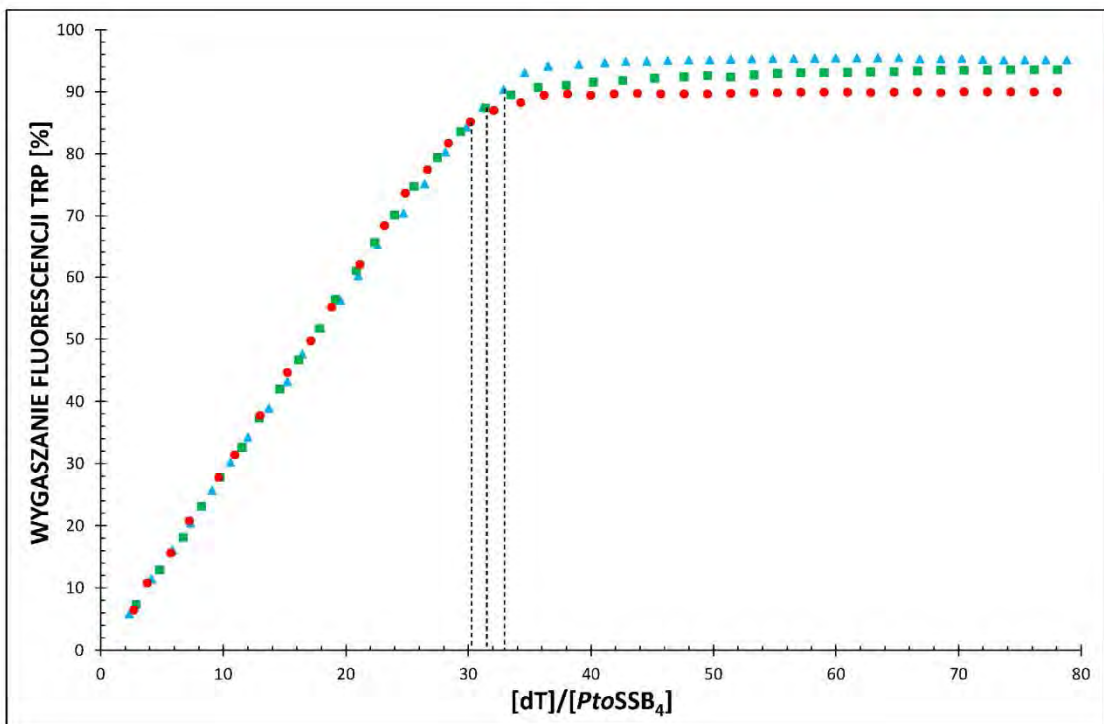
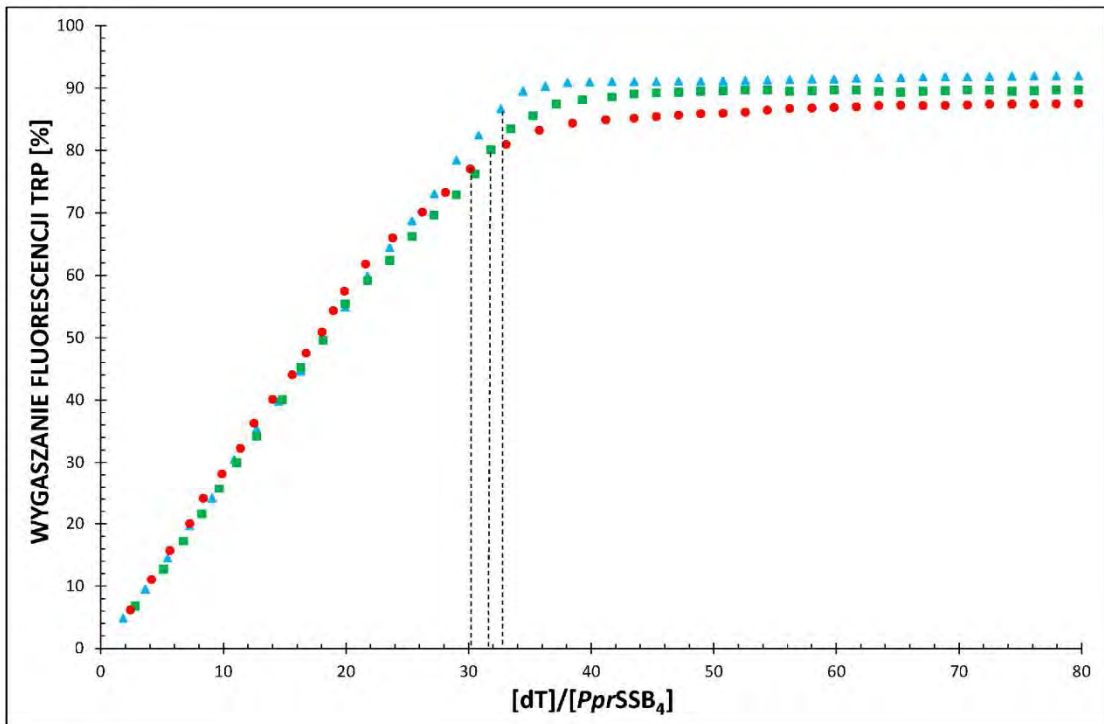
Rys. 21 Wykresy przedstawiające wyniki miareczkowania białek *DpsSSB* i *FpsSSB* oligonukleotydem  $dT_{76}$ . Linie przerywane poprowadzono w oparciu o punkt przecięcia stycznych do wykresów i wyznaczają długość miejsca wiązania ssDNA. Eksperymenty przeprowadzono w buforach BB o różnych stężeniach soli: 2 mM NaCl (●), 100 mM NaCl (■), 300 mM NaCl (▲).



Rys. 22 Wykresy przedstawiające wyniki miareczkowania białek *ParSSB* i *PcrSSB* oligonukleotydem  $dT_{76}$ . Linie przerywane poprowadzono w oparciu o punkt przecięcia stycznych do wykresów i wyznaczają długość miejsca wiązania ssDNA. Eksperymenty przeprowadzono w buforach BB o różnych stężeniach soli: 2 mM NaCl (●), 100 mM NaCl (■), 300 mM NaCl (▲).



Rys. 23 Wykresy przedstawiające wyniki miareczkowania białek *PhaSSB* i *PinSSB* oligonukleotydem dT<sub>76</sub>. Linie przerywane poprowadzono w oparciu o punkt przecięcia stycznych do wykresów i wyznaczają długość miejsca wiązania ssDNA. Eksperymenty przeprowadzono w buforach BB o różnych stężeniach soli: 2 mM NaCl (●), 100 mM NaCl (■), 300 mM NaCl (▲).



Rys. 24 Wykresy przedstawiające wyniki miareczkowania białek *PprSSB* i *PtoSSB* oligonukleotydem  $dT_{76}$ . Linie przerywane poprowadzono w oparciu o punkt przecięcia stycznych do wykresów i wyznaczają długość miejsca wiązania ssDNA. Eksperymenty przeprowadzono w buforach BB o różnych stężeniach soli: 2 mM NaCl (●), 100 mM NaCl (■), 300 mM NaCl (▲).

SSB	BUFOR	DŁUGOŚĆ MIEJSCA WIAZANIA	STOPIEŃ WYGASZANIA
<i>DpsSSB</i>	BB <sub>2</sub>	30 ±2 nt	90%
	BB <sub>100</sub>	32 ±2 nt	92%
	BB <sub>300</sub>	31 ±2 nt	93%
<i>FpsSSB</i>	BB <sub>2</sub>	31 ±2 nt	96%
	BB <sub>100</sub>	32 ±2 nt	97%
	BB <sub>300</sub>	45 ±2 nt	91%
<i>ParSSB</i>	BB <sub>2</sub>	31 ±2 nt	91%
	BB <sub>100</sub>	32 ±2 nt	93%
	BB <sub>300</sub>	33 ±2 nt	95%
<i>PcrSSB</i>	BB <sub>2</sub>	32 ±2 nt	91%
	BB <sub>100</sub>	32 ±2 nt	95%
	BB <sub>300</sub>	34 ±2 nt	96%
<i>PhaSSB</i>	BB <sub>2</sub>	34 ±2 nt	58%
	BB <sub>100</sub>	54 ±2 nt	67%
	BB <sub>300</sub>	64 ±2 nt	74%
<i>PinSSB</i>	BB <sub>2</sub>	28 ±2 nt	80%
	BB <sub>100</sub>	30 ±2 nt	81%
	BB <sub>300</sub>	31 ±2 nt	83%
<i>PprSSB</i>	BB <sub>2</sub>	30 ±2 nt	87%
	BB <sub>100</sub>	32 ±2 nt	90%
	BB <sub>300</sub>	33 ±2 nt	92%
<i>PtoSSB</i>	BB <sub>2</sub>	30 ±2 nt	90%
	BB <sub>100</sub>	32 ±2 nt	94%
	BB <sub>300</sub>	33 ±2 nt	96%

Tab. 6 Długość miejsca wiązania ssDNA przez badane białka SSB oraz stopień wygaszenia fluorescencji w buforze BB zawierającym 2, 100 lub 300 mM NaCl.

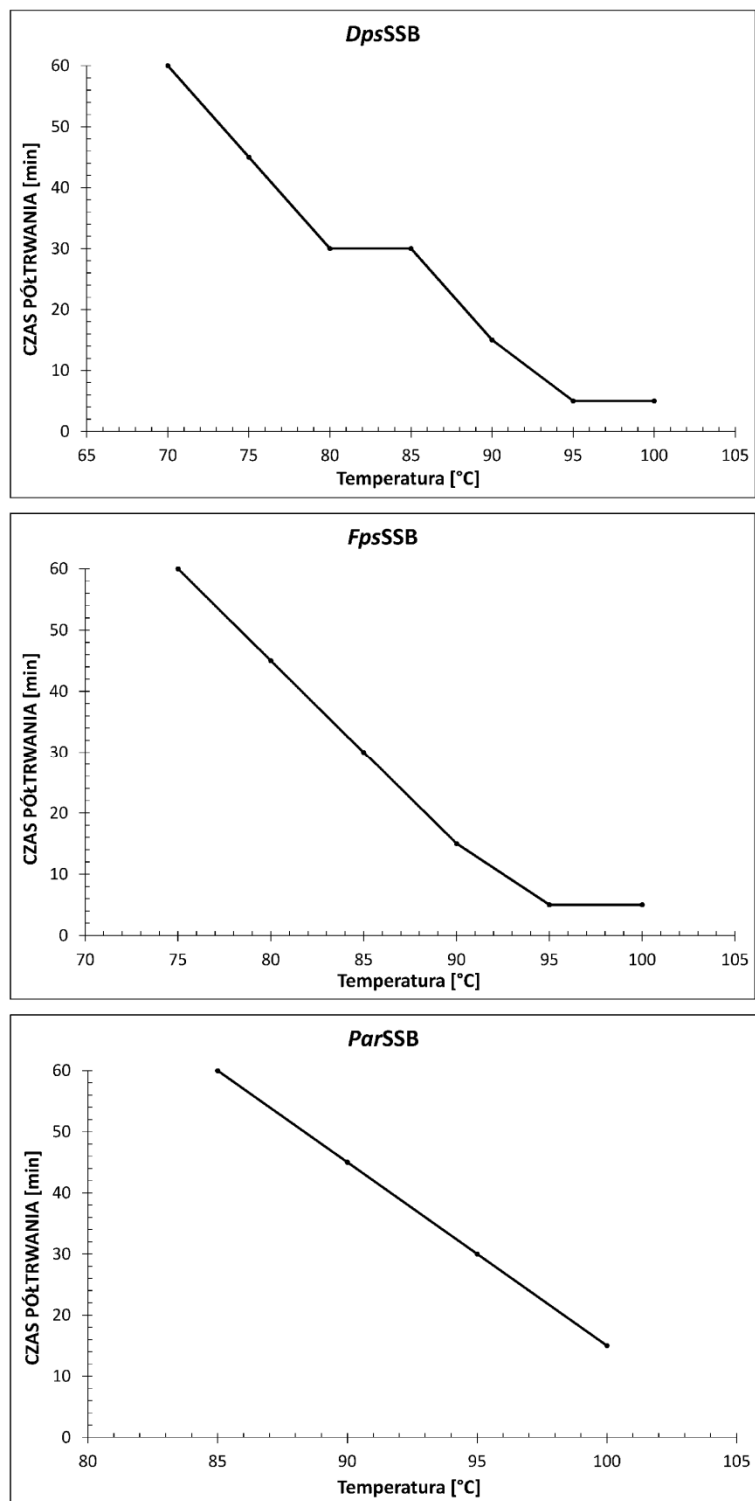
Długość miejsca wiązania jednoniciowego DNA przez badane psychrofilne białka SSB nie zmienia się ze wzrostem stężenia NaCl i wynosi odpowiednio 30±2 nt dla *PinSSB*, 31±2 nt dla *DpsSSB* oraz 32±2 nt dla *ParSSB*, *PcrSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* (wartości uśrednione). W buforach zawierających 2 i 100 mM NaCl wielkość miejsca wiązania ssDNA przez białko *FpsSSB* wynosi odpowiednio 31±2 i 32±2 nt, natomiast w buforze zawierającym 300 mM NaCl jej wartość wzrasta do 45±2 nt. W przypadku białka *PhaSSB* długość miejsca wiązania rośnie wraz z rosnącym stężeniem soli i przyjmuje wartości: 34±2 nt (2 mM NaCl), 54±2 nt (100 mM NaCl) i 64±2 nt (300 mM NaCl).



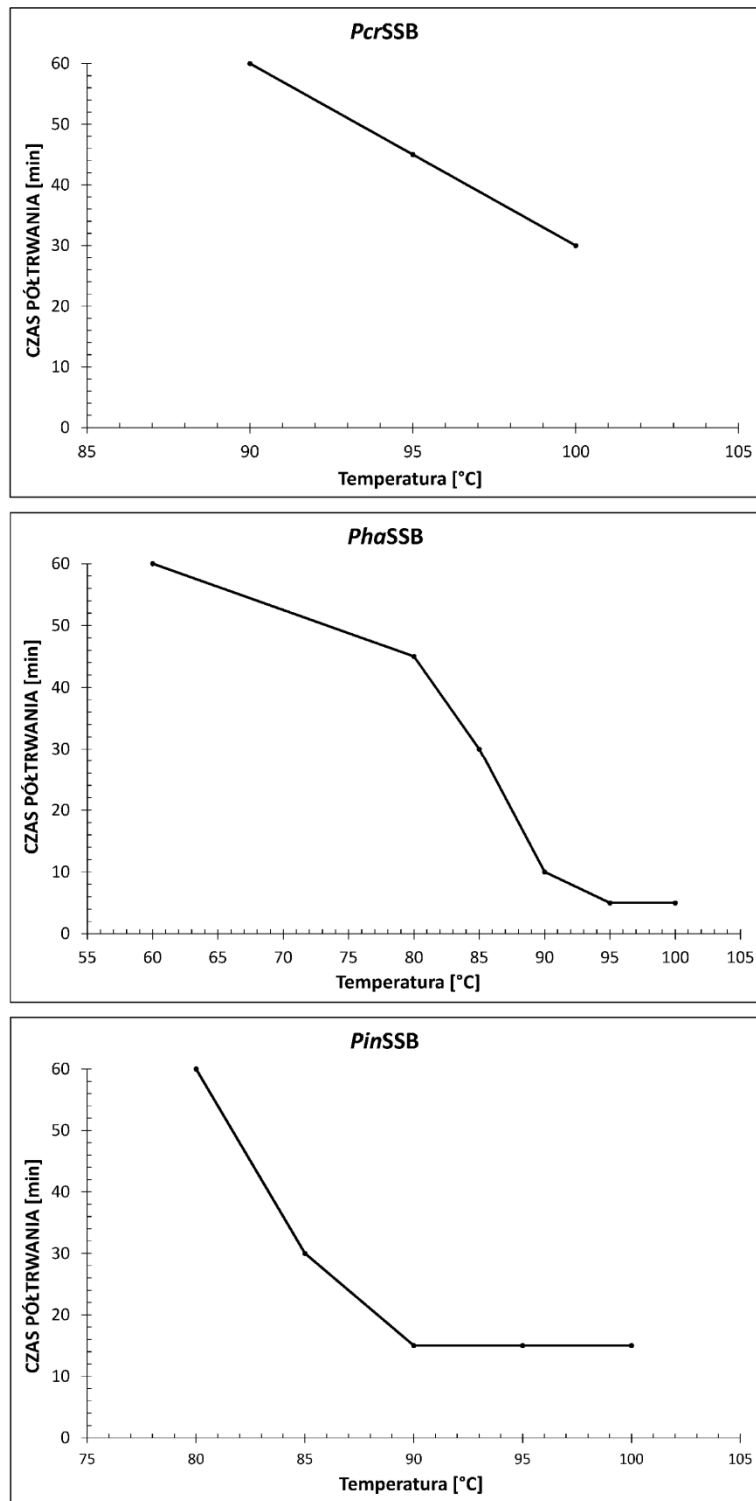
#### 7.4.4 Badanie aktywności białek SSB w wysokich temperaturach

Zbadano aktywność psychrofilnych białek SSB w zakresie temperatur od 50°C do 95°C w przedziale czasowym od 0,5 do 60 min z użyciem 5' znakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów dT<sub>35</sub> [Mat. 5.15, Met. 6.17]. Doświadczenie to pozwoliło wyznaczyć czas półtrwania badanych białek SSB w danej temperaturze – czas, po którym połowa białka zachowuje swoją aktywność. Próbki zawierające stałe ilości badanych białek inkubowano w badanej temperaturze przez czas 1; 2,5; 5; 10; 15; 30; 45 i 60 min. Następnie do każdej próbki dodano stałą ilość oligonukleotydu dT<sub>35</sub> w celu zbadania aktywności i pozostawiono na czas 10 min w temperaturze 25°C, po czym całość naniesiono na 2% żel agarozowy bez bromku etydydy [Mat. 5.15, Met. 6.14].

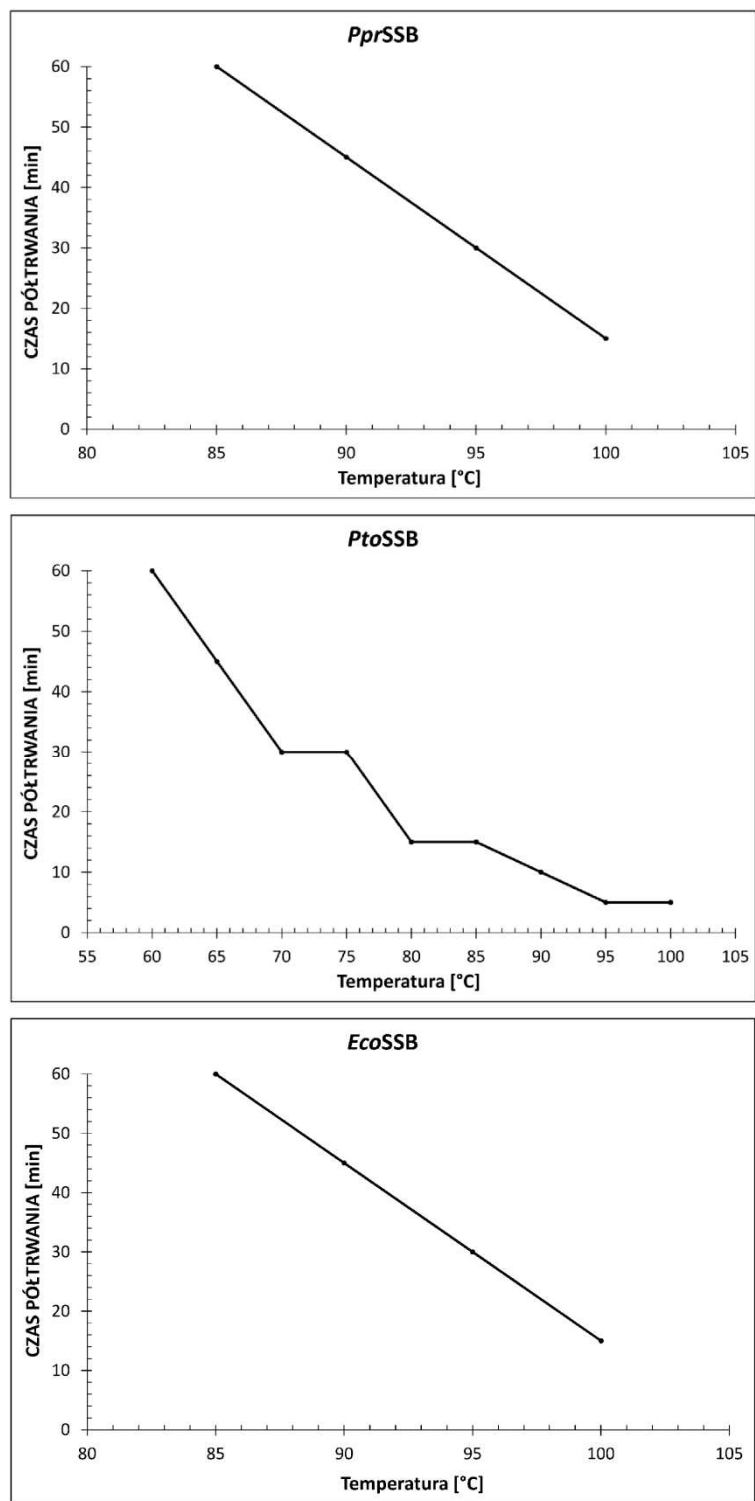
Czas półtrwania dla białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PhaSSB* oraz *PtoSSB* dla obu temperatur: 99°C i 95°C jest taki sam i wynosi 5 min, natomiast dla białka *PinSSB* – 15 min. Czasy półtrwania białek *ParSSB* i *PprSSB* wynoszą 15 min w temperaturze 99°C i 30 min w temperaturze 95°C, natomiast dla białka *PcrSSB* – odpowiednio 30 i 45 min. Białka *DpsSSB*, *FpsSSB* i *PinSSB* charakteryzuje czas półtrwania wynoszący 15 min w temperaturze 90°C i 30 min w 85°C. W temperaturze 90°C białka *PhaSSB* i *PtoSSB* wykazują 50% aktywności po 10 min, białka *PprSSB* i *ParSSB* – po 45 min, natomiast białko *PcrSSB* – dopiero po 60 min. Czas półtrwania dla białka *SSB P. torquis* wynosi 15 min w 85°C i 80°C, 30 min w 75°C i 70°C oraz 45 min w 65°C. W temperaturze 85°C utratę połowy aktywności zaobserwowano dla *PhaSSB* po 30 min, a dla *ParSSB* i *PprSSB* po 60 min inkubacji. Natomiast w 80°C białka: *DpsSSB* po 30 min, *FpsSSB* i *PhaSSB* po 45 min, a *PinSSB* po 60 min zachowują jeszcze połowę aktywności. 60 min to czas półtrwania dla białka *FpsSSB* w 75°C, *DpsSSB* w 60°C oraz *PhaSSB* i *PtoSSB* w 60°C. Przeprowadzono również testy aktywności SSB *E. coli* w wysokich temperaturach. Czas półtrwania białka *EcoSSB* w 99°C, 95°C, 90°C i 85°C wynosi odpowiednio 15, 30, 45 oraz 60 min. Dane z przeprowadzonych doświadczeń zestawiono w formie wykresów (Rys. 25, Rys. 26, Rys. 27), a wyniki badania termostabilności w żelu agarozowym pokazano na przykładzie białek *FpsSSB*, *PcrSSB* i *PtoSSB* (Rys. 28).



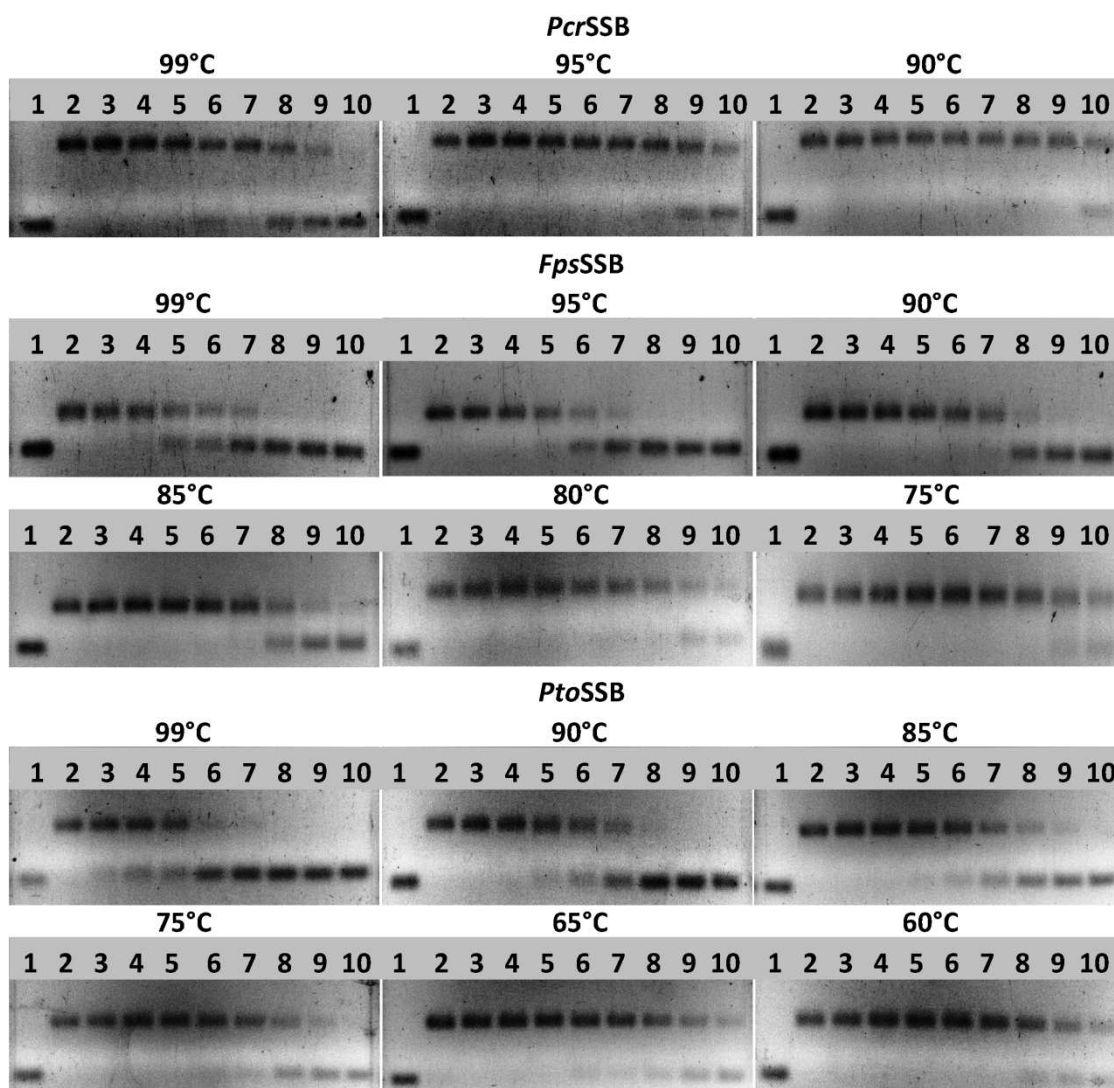
Rys. 25 Wykresy przedstawiające wyniki badania termostabilności białek *DpsSSB*, *FpsSSB* i *ParSSB*.



Rys. 26 Wykresy przedstawiające wyniki badania termostabilności białek *PcrSSB*, *PhaSSB* i *PinSSB*.



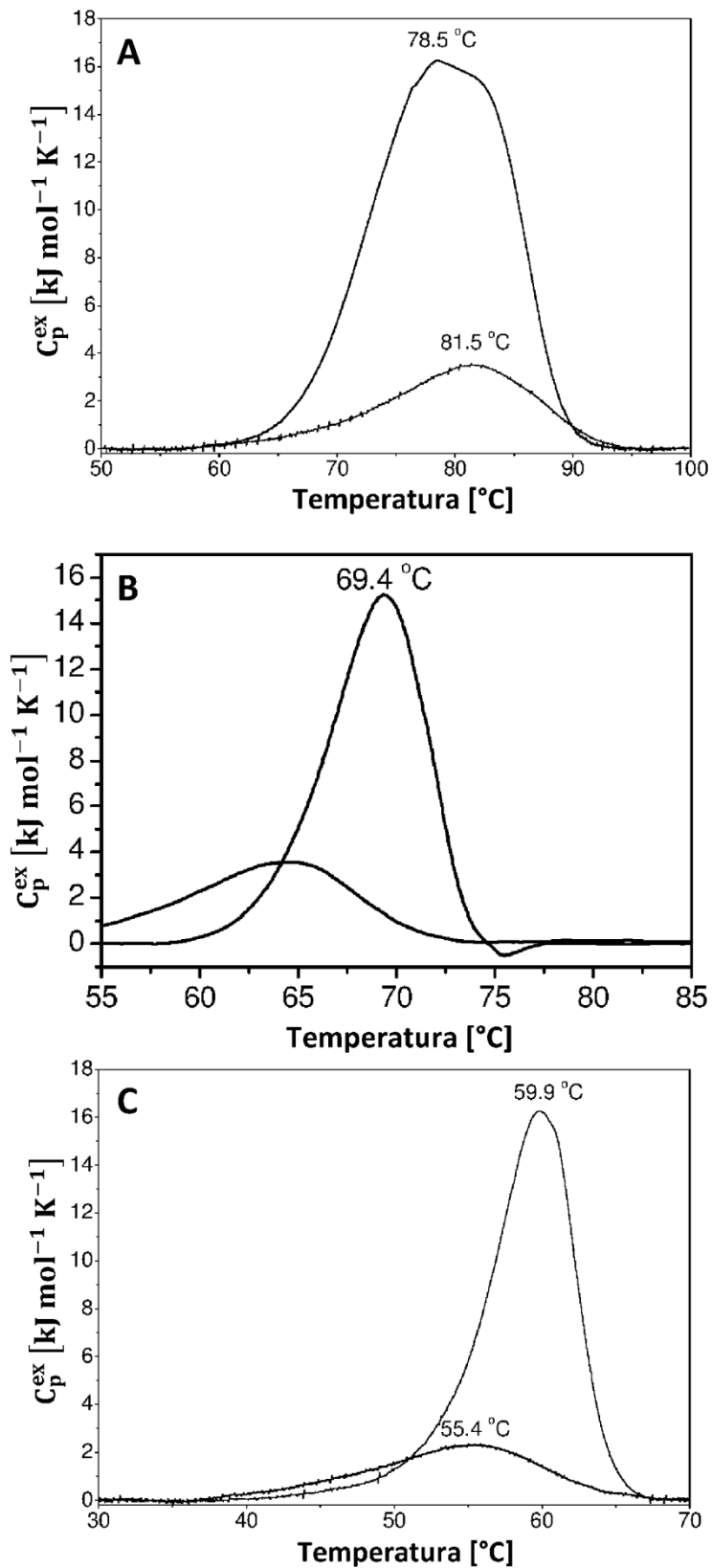
Rys. 27 Wykresy przedstawiające wyniki badania termostabilności białek *PprSSB*, *PtoSSB* i *EcoSSB*.



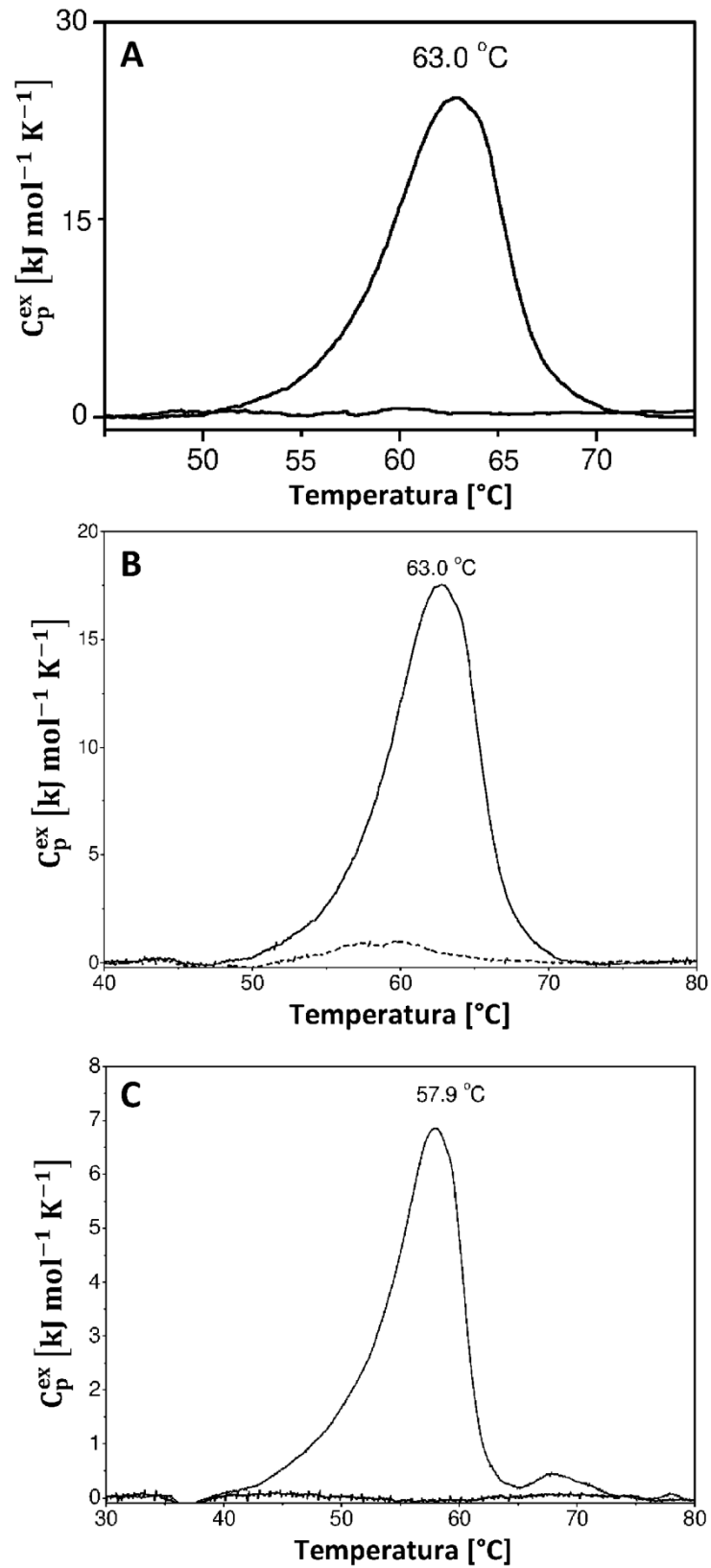
Rys. 28 Elektroforegramy przedstawiające wyniki badania termostabilności białek *FpsSSB*, *PcrSSB* i *PtoSSB*. Legenda:  
 1 – oligonukleotyd dT<sub>35</sub> bez SSB; 2-10 badane białka SSB po czasie inkubacji: 0 min (2), 1 min (3), 2,5 min (4), 5 min (5), 10 min (6), 15 min (7), 30 min (8), 45 min (9) i 60 min (10).

#### 7.4.5 Określenie temperatury denaturacji białek SSB

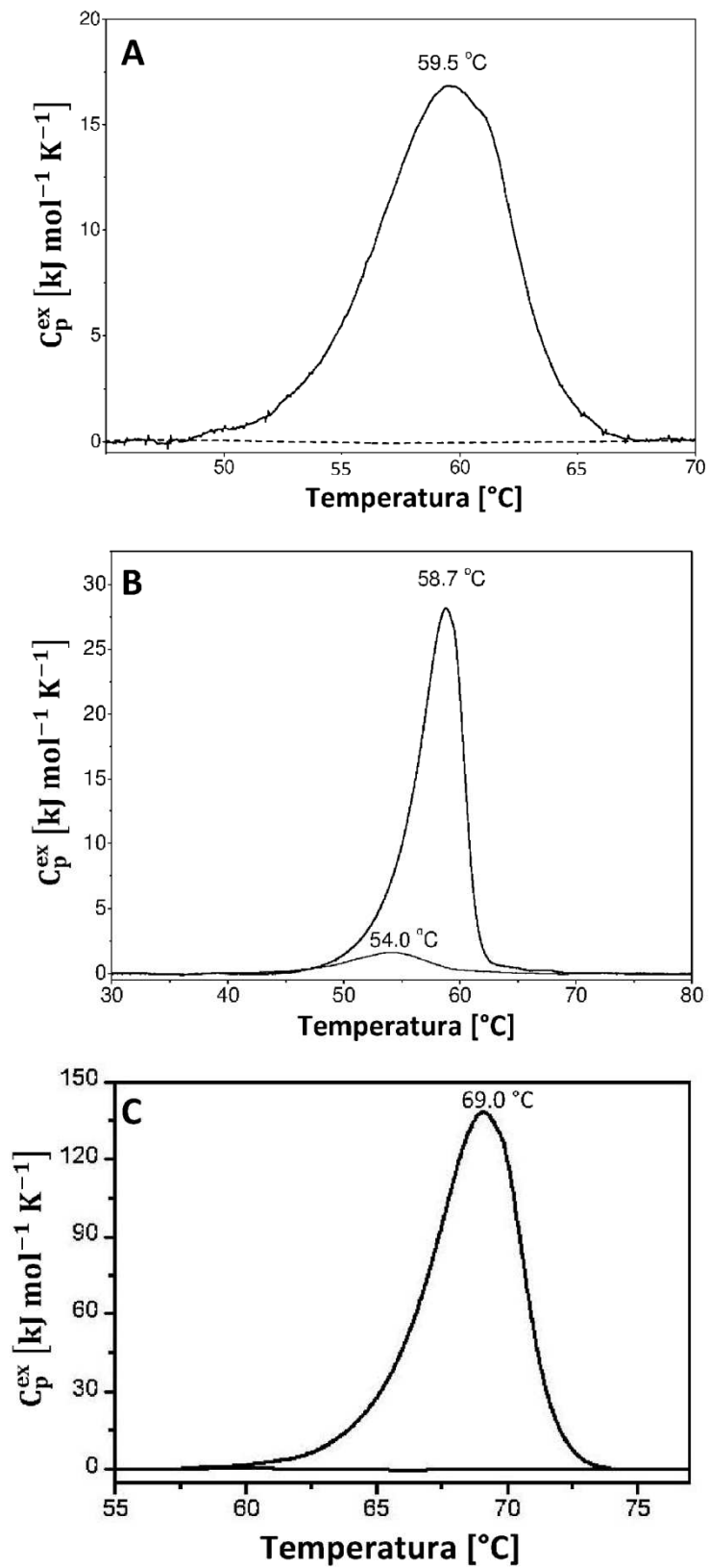
Temperaturę denaturacji badanych psychrofilnych białek SSB oraz białka *EcoSSB* wyznaczono przy użyciu mikrokalorymetru NanoDSC [Mat. 5.1] zgodnie z procedurą zamieszczoną w rozdziale „Metody” [Met. 6.18]. Na podstawie uzyskanych wyników oraz przy użyciu programu NanoAnalyse Software V 1.1 do analizy danych mikrokalorymetrycznych sporządzono wykresy przebiegu procesu denaturacji badanych białek SSB (Rys. 29, Rys. 30, Rys. 31).



Rys. 29 Wykresy przedstawiające przebieg procesu denaturacji białek *DpsSSB* (A), *FpsSSB* (B) i *ParSSB* (C).



Rys. 30 Wykresy przedstawiające przebieg procesu denaturacji białek *PcrSSB* (A), *PhaSSB* (B) i *PinSSB* (C).



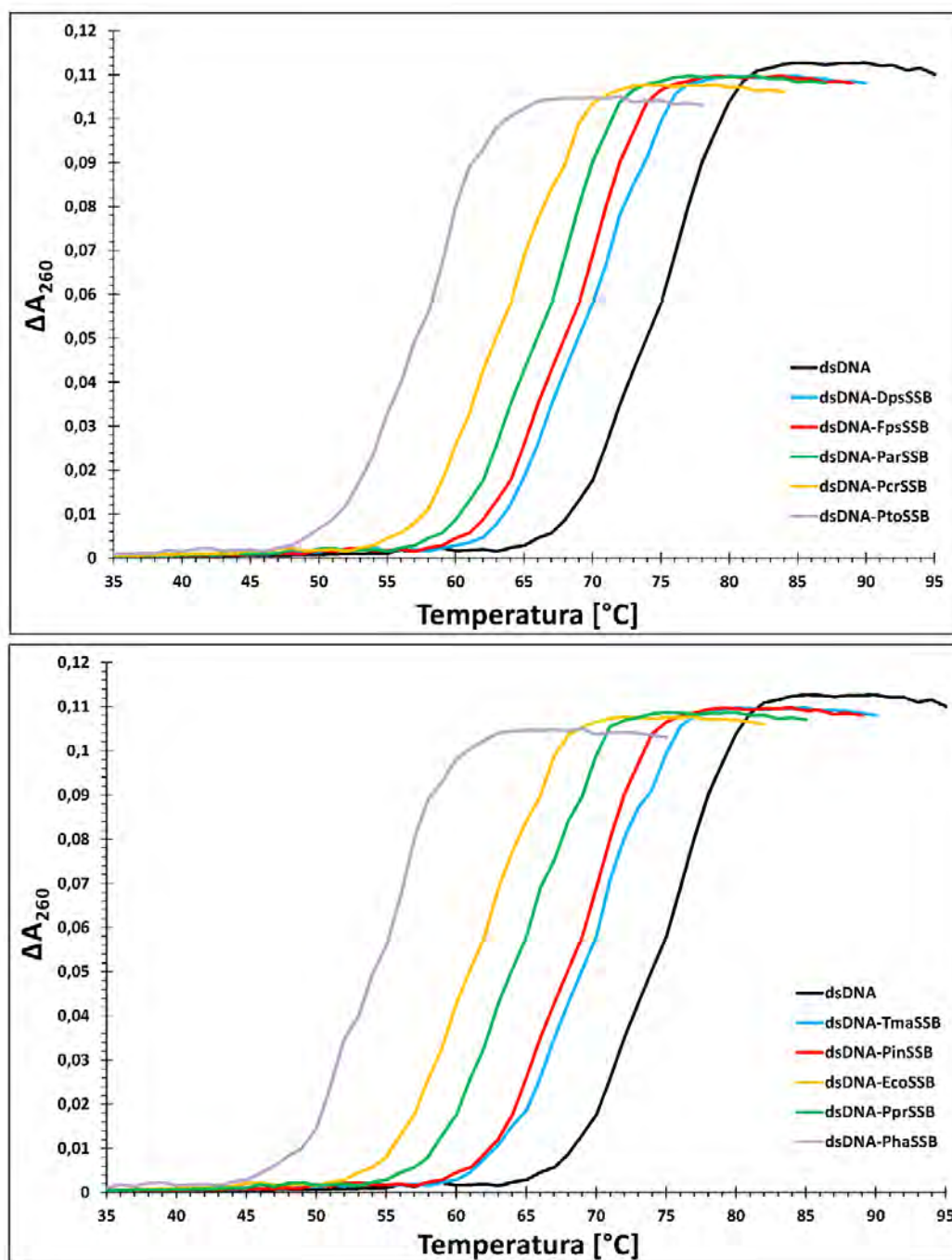
Rys. 31 Wykresy przedstawiające przebieg procesu denaturacji białek *PprSSB* (A), *PtoSSB* (B) i *EcoSSB* (C).



Termiczna denaturacja białek *PcrSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* oraz *EcoSSB* jest procesem nieodwracalnym, a ich temperatura denaturacji wynosi odpowiednio 63°C, 57,9°C, 59,5°C i 69°C (Rys. 30 A i C, Rys. 31 A i C). W przypadku pozostałych białek po ponownym podgrzaniu próbki uzyskano wyniki świadczące o tym, że proces denaturacji jest procesem częściowo odwracalnym (Rys. 29, Rys. 30 B, Rys. 31 B). Temperatura denaturacji dla białka *DpsSSB* wynosi 78,5°C, dla *FpsSSB* – 69,4°C, dla *ParSSB* – 59,9°C, dla *PhaSSB* – 63°C, a dla *PtoSSB* – 58,7°C.

#### **7.4.6 Badanie zdolności białek SSB do obniżania temperatury topnienia dsDNA**

Jedną z właściwości białek SSB jest ich zdolność do destabilizacji dwuniciowego DNA. Za zdolność do obniżania temperatury topnienia odpowiada najprawdopodobniej C-terminalna domena białek SSB, tak jak to ma miejsce w przypadku *EcoSSB*. W badaniach wykorzystano dsDNA o długości 44 pz [Mat. 5.16]. Mieszaninę zawierającą dwuniciowy DNA i poszczególne psychrofilne białka SSB oraz dodatkowo białka *EcoSSB* i *TmaSSB* stopniowo ogrzewano od temperatury 25°C do 95°C. Po każdym wzroście temperatury o 1°C mierzono wartość absorbancji  $A_{260}$  [Met. 6.19]. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono profile denaturacji dsDNA w obecności badanych białek SSB (Rys. 32).



Rys. 32 Wykresy przedstawiające profile denaturacji dsDNA w nieobecności i obecności psychrofilnych białek SSB oraz białek *EcoSSB* i *TmaSSB*.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że temperatura topnienia zastosowanego fragmentu dsDNA w nieobecności białek SSB wynosi 75°C. W obecności psychrofilnych białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* temperatura topnienia dupletu DNA wynosi odpowiednio 70°C, 69°C, 67°C, 64°C, 55°C, 69°C, 65°C i 58°C. Natomiast obecność mezofilnego białka *EcoSSB* i termofilnego białka *TmaSSB* powoduje obniżenie temperatury topnienia dsDNA z 75°C do odpowiednio 62°C i 70°C.

## 8. Dyskusja

### 8.1 Charakterystyka molekularna psychrofilnych białek SSB

Białka SSB wiążąc się do jednoniciowego DNA, utrzymują go w formie rozplecionej, przez co dostępnej dla białek uczestniczących w procesach replikacji, rekombinacji i naprawy DNA. Ze względu na istotę spełnianych funkcji występują one u wszystkich organizmów żywych i wirusów. Do tej pory scharakteryzowano wiele białek wiążących jednoniciowy DNA należących do mezofilnych i termofilnych organizmów prokariotycznych. W 1997 roku otrzymano białka SSB pochodzące z morskich bakterii rodzaju *Shewanella*, ale nie kontynuowano badań w kierunku określenia właściwości biofizycznych i biochemicznych uzyskanych białek [228].

Do tej pory nikt nie przedstawił produkcji, otrzymywania i charakterystyki molekularnej białek SSB bakterii psychrofilnych o tak zróżnicowanym filogenetycznie i ewolucyjnie podłożu, jak w niniejszej rozprawie doktorskiej. Zaprezentowane badania są więc pierwszymi studiami nad białkami SSB bakterii zaadaptowanych do zimna.

W celu otrzymania białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB*, skonstruowano rekombinantowe plazmidy umożliwiające wydajną ich produkcję w komórkach *E. coli* w systemie ekspresyjnym pBAD. W wyniku dwuetapowej procedury oczyszczania, uzyskano homogenne preparaty badanych białek, które posłużyły do przeprowadzenia charakterystyki molekularnej.

Stosując dwie niezależne metody: chemicznego sieciowania aldehydem glutarowym oraz ultrawierowania w gradiencie stężeń glicerolu określono tetrameryczną budowę natywnych form badanych białek SSB. Na podstawie wyników ultrawierowania wyznaczono masy cząsteczkowe psychrofilnych białek SSB, które wynoszą 71 kDa dla *DpsSSB* i *FpsSSB*, 91 kDa dla *ParSSB* i *PcrSSB*, 106 kDa dla *PhaSSB* i *PinSSB* oraz 76 kDa dla *PprSSB* i *PtoSSB*. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano również, że monomery badanych białek SSB wykazują większe (od około 2 do prawie 8 kDa) opóźnienie migracji elektroforetycznej niż wynikałoby to z ich masy cząsteczkowej obliczonej na podstawie sekwencji aminokwasowej. Zjawisko opóźnienia migracji w żelu poliakrylamidowym dotyczy również innych bakteryjnych białek SSB, np. białek rodzaju *Deinococcus* i *Thermus* (różnica 2-3 kDa) [84, 86], *Mycobacterium* (różnica 3 kDa) [229] czy *Shewanella* (różnica 7-11 kDa) [228].

W testach opóźnienia migracji kompleksów białko:ssDNA w żelu agarozowym (EMSA) potwierdzono zdolność do wiązania jednoniciowego DNA przez białka SSB pochodzące z bakterii psychrofilnych. Wszystkie badane białka wiążą zarówno krótkie, jak i długie

fragmenty ssDNA. W przypadku wszystkich badanych białek SSB dla oligonukleotydu dT<sub>35</sub> otrzymano jeden kompleks, dla dT<sub>76</sub> – dwa kompleksy, natomiast dla dT<sub>120</sub> – trzy kompleksy dT:białko. Na tej podstawie, długość miejsca wiązania jednoniciowego DNA przez badane psychrofilne białka SSB oszacowano na 35 nt.

Główną rolę w wiązaniu ssDNA przez białka SSB odgrywają reszty tryptofanowe. W celu wyznaczenia długości miejsca wiązania jednoniciowego DNA przez te białka stosuje się metodę wygaszania naturalnej fluorescencji reszt tryptofanu. Ponadto, na podstawie stopnia wygaszenia fluorescencji można określić ilość zaangażowanych w wiązanie ssDNA reszt tego aminokwasu. Wykazano, że niemal wszystkie badane białka SSB z bakterii psychrofilnych mają stałe miejsce wiązania, niezależne od stężenia NaCl, którego długość wynosi 30±2 nt dla *PinSSB*, 31±2 nt dla *DpsSSB* oraz 32±2 nt dla *ParSSB*, *PcrSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB*. Wielkość miejsca wiązania ssDNA przez białko *FpsSSB* jest stała w zakresie od 2 do 100 mM NaCl i wynosi około 32±2 nt, a jej wartość wzrasta do 45±2 nt przy stężeniu 300 mM NaCl. W przypadku białka *PhaSSB* długość miejsca wiązania rośnie wraz z rosnącym stężeniem soli i przyjmuje wartości: 34±2 nt (2 mM NaCl), 54±2 nt (100 mM NaCl) i 64±2 nt (300 mM NaCl). Białko SSB *P. haloplanktis* prawdopodobnie tworzy analogiczne do *EcoSSB* typy wiązania: podstawowe (SSB)<sub>35</sub> i (SSB)<sub>65</sub> oraz przejściowy typ (SSB)<sub>56</sub>. W modelu (SSB)<sub>65</sub> *EcoSSB* wszystkie domeny OB biorą udział w wiązaniu ssDNA, a wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanu zachodzi na poziomie 90%. Natomiast w modelu (SSB)<sub>35</sub> wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanu wynosi około 50% ze względu na zaangażowanie tylko połowy ważnych dla wiązania ssDNA reszt tryptofanowych (dwóch domen OB) w białku SSB *E. coli*. Badane białka SSB, z wyjątkiem *PhaSSB*, charakteryzuje prawdopodobnie tylko jeden typ wiązania niezależny od stężenia soli, podobny do modelu (SSB)<sub>35</sub> *EcoSSB*. Wszystkie reszty tryptofanowe w monomerach białek *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PtoSSB* (2x Trp) oraz *DpsSSB* (4x Trp) znajdują się w sekwencji domeny OB i zaangażowane są w wiązanie ssDNA. Natomiast w przypadku białek *PinSSB* i *PprSSB* trzy reszty Trp z czterech obecnych w monomerze biorą udział w wiązaniu jednoniciowego DNA. Większość reszt tryptofanowych białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* zostaje wygaszona po dodaniu oligonukleotydu (stopień wygaszenia w zakresie 80-97%), co sugeruje zaangażowanie wszystkich domen w wiązanie jednoniciowego kwasu nukleinowego. Prawdopodobnie wśród psychrofilnych białek SSB istnieje model wiązania (SSB)<sub>35</sub>, analogiczny do modelu *EcoSSB*, w którym wszystkie domeny OB biorą udział w wiązaniu jednoniciowego DNA. Natomiast w przypadku białka *FpsSSB*, oprócz modelu (SSB)<sub>35</sub>, w wysokich stężeniach soli występuje model charakteryzujący się miejscem wiązania ssDNA o długości 45±2 nt.

W literaturze opisano wiele bakteryjnych białek SSB, które nie wykazują wszystkich typów wiązania analogicznych do *Eco*SSB. Na przykład białka rodzaju *Deinococcus* (*Dge*SSB, *Dgr*SSB, *Dmu*SSB, *Dpr*SSB i *Drp*SSB) charakteryzuje długość miejsca wiązania w zakresie 24-35 nt niezależnie od stężenia NaCl [116, 117, 118, 119]. Dla tych białek nie zaobserwowano odpowiednika modelu (SSB)<sub>65</sub>, jedynie typ wiązania (SSB)<sub>35</sub>. Ponadto w przypadku białek *Drp*SSB i *Dpr*SSB wygaszanie fluorescencji tryptofanu zachodzi na poziomie 80% i 85%, wskazując na udział większości reszt tego aminokwasu w wiązaniu ssDNA tak jak w przypadku badanych psychrofilnych białek SSB. Z kolei dla białek *Taq*SSB, *Tma*SSB, *Tne*SSB i *Dra*SSB nie stwierdzono typu wiązania odpowiadającego modelowi (SSB)<sub>35</sub> u *E. coli* i wykazano, że białka te posiadają miejsce wiązania długości 50-68 nt na poziomie wygaszania 70-98% w szerokim zakresie stężeń NaCl, co wskazuje na obecność dwóch modeli wiązania: (SSB)<sub>55</sub> i (SSB)<sub>65</sub> [87, 230, 231].

Psychrofilne białka SSB wykazują zdolność do destabilizacji dwuniciowego DNA, która jest właściwością charakterystyczną dla białek SSB. Stwierdzono, że obecność badanych białek SSB powoduje obniżenie temperatury denaturacji dsDNA w różnym stopniu. Białko *Dps*SSB powoduje taki sam spadek temperatury denaturacji jak białko *T. maritima* (5°C), natomiast białka *Fps*SSB i *Pin*SSB obniżają ją o 6°C, a białko *Par*SSB – o 8°C. Obecność białek *Pto*SSB i *Pha*SSB powoduje obniżenie temperatury denaturacji dsDNA aż o odpowiednio 17°C i 20°C. Efekt ten jest silniejszy od tego jaki wywołują białka SSB *E. coli*, *T. aquaticus* i *T. thermophilus* (obniżenie o 13°C) [85] oraz inne białka SSB-podobne, np. dla SSB *Proteus mirabilis* spadek temperatury denaturacji wynosi 14°C [232], a dla SSB *Pseudomonas aeruginosa* – 6°C [82].

Psychrofilne białka SSB, jak na białka pochodzące z bakterii żyjących w niskich temperaturach, są wysoce termostabilne, a ich czasy półtrwania w wysokich temperaturach są nawet wyższe niż dla niektórych białek SSB pochodzących z bakterii termofilnych. Badane białka SSB wykazują większą termostabilność niż mezofilne białka *Dgr*SSB (1 min w 65°C) [116], *Dpr*SSB (1 min w 67,5°C) [116] i *Dra*SSB (1 min w 65°C) [119] oraz termofilne białka *Taq*SSB, *Tth*SSB i *Tte*SSB3, dla których czas półtrwania w 95°C wynosi 30 sekund [85, 233], oraz *Dge*SSB, które w temperaturze 90°C traci połowę aktywności po upływie 5 minut [119]. Profil aktywności białek SSB *P. arcticus* i *P. profundum* w wysokich temperaturach jest taki sam jak dla białka SSB *E. coli*, które również cechuje stosunkowo wysoka termostabilność. Najbardziej termostabilnym białkiem SSB pochodzącym z psychrofilnego organizmu jest *Pcr*SSB, dla którego czas półtrwania w temperaturze 99°C wynosi 30 minut i jest zbliżony do białka SSB termofilnej bakterii *Deinococcus murrayi*, *Dmu*SSB (40 min) [118].

Zaskakujący jest fakt, iż białka pochodzące z bakterii zasiedlających permanentnie zimne środowiska są aktywne w tak wysokich temperaturach, preferowanych przez hipertermofilne

mikroorganizmy. Ze względu na swoją termostabilność psychrofilne białka SSB są dobrymi kandydatami do badań aplikacyjnych w reakcjach wysokotemperaturowych – opartych np. o amplifikację kwasów nukleinowych *in vitro*. Ponadto badane białka mogą okazać się konkurencyjne dla białek SSB termofilnych bakterii stosowanych obecnie w technikach biologii molekularnej.

Dzięki zastosowaniu skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej wyznaczono temperaturę denaturacji badanych psychrofilnych białek SSB oraz białka *EcoSSB*. Termiczna denaturacja białek *PcrSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* oraz *EcoSSB* jest procesem nieodwracalnym, a ich temperatura denaturacji wynosi odpowiednio 63°C, 57,9°C, 59,5°C i 69°C. Natomiast dla pozostałych białek proces denaturacji jest procesem częściowo odwracalnym. Temperatura denaturacji dla białka *DpsSSB* wynosi 78,5°C, dla *FpsSSB* – 69,4°C, dla *ParSSB* – 59,9°C, dla *PhaSSB* – 63°C oraz dla *PtoSSB* – 58,7°C. Badane psychrofilne białka SSB oraz mezofilne białko *E. coli* wykazują niższą temperaturę denaturacji niż termofilne białka SSB rodzaju *Thermus*, np. *TaqSSB* (86,8°C) [87] i *TthSSB* (89,2°C) [85], oraz rodzaju *Thermotoga*, np. *TmaSSB* (109,3°C) i *TneSSB* (112,5°C) [87]. Białka SSB *D. psychrophila* i *F. psychrophilum* charakteryzuje wyższa temperatura denaturacji niż *E. coli*. Ponadto temperatura denaturacji białka *DpsSSB* jest niższa od *TaqSSB* o zaledwie 8,3°C. Białka i enzymy pochodzące z organizmów zaadaptowanych do zimna, ze względu na swą elastyczną i rozluźnioną strukturę, uważane są za termolabilne. Jednak wśród psychrofilnych enzymów istnieją wyjątki, gdzie zaadaptowane do zimna białka wykazywały większą termostabilność i wyższą temperaturę denaturacji niż ich odpowiedniki pochodzące z organizmów mezofilnych, o czym wspomniano w rozdziale 4.2.3. Do takich wyjątków zaliczyć można również białka SSB pochodzące z psychrofilnych bakterii, które łączą w swojej strukturze cechy białek psychrofilnych oraz mezofilnych i termofilnych. Ponadto, jak to wykazano podczas analizy sekwencji aminokwasowej, białka te wykazują wysoką homologię do *EcoSSB*, co wskazuje, że elementy silnie zakonserwowane w strukturze tych molekuł mogą również znacząco wpływać na ich termostabilność.

## 8.2 Analiza sekwencji białek SSB

Sekwencje aminokwasowe otrzymanych białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* porównano z sekwencjami białek SSB dwóch gatunków bakterii mezofilnych (*Escherichia coli*, *EcoSSB* i *Bacillus subtilis*, *BsuSSB*), dwóch gatunków bakterii termofilnych (*Thermotoga maritima*, *TmaSSB* i *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *TteSSB3*) oraz jednego gatunku bakterii psychrofilnej (*Shewanella woodyi*, *SwoSSB*) (Rys. 33). Dostępne w bazie NCBI sekwencje aminokwasowe porównano przy użyciu programów komputerowych ClustalX i GeneDoc.

Badane białka *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* są polipeptydami o różnej długości sekwencji w zakresie od 140 do 244 reszt aminokwasowych oraz wykazują zróżnicowaną homologię do modelowych białek SSB bakterii mezofilnych, termofilnych i psychrofilnych (Rys. 33, Tab. 7, Tab. 8). Białka *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* wykazują stosunkowo wysoką homologię do białka SSB psychrofilnej bakterii *S. woodyi* (21-53% identyczności, 38-66% podobieństwa). Nieco niższe podobieństwo tych białek występuje w stosunku do mezofilnego białka *BsuSSB*: 21-31% identyczności i 37-48% podobieństwa oraz termofilnych białek *TteSSB3* i *TmaSSB*, odpowiednio: 18-36% i 15-31% identyczności oraz 30-53% i 28-52% podobieństwa (Tab. 7).

	*	20	*	40	*	60	*		
		N4 666G lg dpe ry g 6 6At			te5h	41aE			
DpsSSB	:	---MINKAFLIGNLGADPEIRSTGN	TCVATLRLATERRKQ	SGMQESFEWERVIA	GRLEICGE		: 65		
FpsSSB	:	-MNGTINKVMLIGLGEPIKMFH	FDGNCIGRFFLATNEIY	INKSINKITSFEW	NVVVRNKA	FEICEK	: 69		
ParSSB	:	--MRGVNKVIIIGNLGAADPEAR	CFNNGGSVTNISVATSE	QWTIKCSGSKREATE	WEFRISLENRIGETAAQ		: 68		
PcrSSB	:	--MRGVNKVIIIGNLGAADPEAR	CFNNGGSVTNISVATSE	QWTIKCSGSKREATE	WEFRISLENRIGETAAQ		: 68		
PhaSSB	:	-MARGVNVKVLVGNLGDQDPEV	RMPNNGVANITLATS	SDSYKKNITGOMVDR	KTEWFRVVF	GKLEIVGE	: 69		
PinSSB	:	MFNRNVKVVLVGNLGDQDPEV	RMPNNGVANITLATS	SDSYKKNITGOMVDR	KTEWFRVVF	GKLEIVGE	: 70		
PprSSB	:	MASRGVNVKVLVGNLGDQDPEV	RMPNNGVANITLATS	SDSYKKNITGOMVDR	KTEWFRVVF	GKLEIVGE	: 70		
PtoSSB	:	-MAGTINKVMLIGHTCDEVKM	HFEGNCIGRFFLATNEE	YINKAINKVSNTEW	TIVVRNKA	FEVCEK	: 69		
SwoSSB	:	MASRGVNVKVLVGNLGDQDPEV	RMPNNGVANITLATS	SDSYKKNITGOMVDR	KTEWFRVVF	GKLEIVGE	: 69		
EcoSSB	:	MASRGVNVKVLVGNLGDQDPEV	RMPNNGVANITLATS	SDSYKKNITGOMVDR	KTEWFRVVF	GKLEIVGE	: 70		
BsuSSB	:	---MNRVVLVGRITKQPELRY	TPNCAAVATFFLAVNR	TF-TNQS--GEREAD	FINCVTARRQ	ENVAN	: 63		
TteSSB3	:	---MINKVILIGRLTKQPEV	MRYSMDMVEVTTFFL	AVNRNY-VSQS--GERE	FDFFIVTARK	LAEICAN	: 63		
TmaSSB	:	--MSFFNKIILIGRLVVRDPE	RYTLSETEVTTFFLAV	DRVP-RKNAPDDA	QTIDFFRIVT	GRLEAFART	: 67		
		* <td></td> <td style="text-align: center;">100 <td style="text-align: center;">* <td style="text-align: center;">140 <td></td> </td></td></td>		100 <td style="text-align: center;">* <td style="text-align: center;">140 <td></td> </td></td>	* <td style="text-align: center;">140 <td></td> </td>	140 <td></td>			
		1 KG y6eG 6 5 G tE6			6				
DpsSSB	:	YLNKCARVYIEGRITCRKWQ	IQS-GNDRYSFEIVAR	---	EYKMLIS-PRGS	-----	: 110		
FpsSSB	:	YLSKGDKIYVEGRITKRFSE	QWQAE-CTVKYITFEIQ	VT---	EFTFLINTRKDS	-----	: 115		
ParSSB	:	YLRKGSKVYIEGSRTRRYQ	DPN-GQDRYITFEIRAE	---	QMQMLDGGATGGSGD	-GSGFASNQ	: 126		
PcrSSB	:	YLRKGSKVYIEGSRTRRYQ	DPN-GQDRYITFEIRAE	---	QMQMLDGGSTGGSNDA	GGGFGSNNQGG	: 129		
PhaSSB	:	YLRKGSQVYIEGQITCRKWQ	QCGQDYTEVTVVQ	SGFNGVYQMLG-GR	QG--GGQQQ	-----	: 124		
PinSSB	:	YLRKGSQVYIEGQITCRKWQ	QCGQDYTEVTVVQ	SGFNGVYQMLG-GR	QG--GGQQQ	-----	: 124		
PprSSB	:	YLRKGSQVYIEGQITCRKWQ	QCGQDYTEVTVVQ	SGFNGVYQMLG-GR	QG--GGQQQ	-----	: 124		
PtoSSB	:	YLRKGSQVYIEGQITCRKWQ	QCGQDYTEVTVVQ	SGFNGVYQMLG-GR	QG--GGQQQ	-----	: 124		
SwoSSB	:	YLRKGSQVYIEGQITCRKWQ	QCGQDYTEVTVVQ	SGFNGVYQMLG-GR	QG--GGQQQ	-----	: 124		
EcoSSB	:	YLRKGSQVYIEGQITCRKWQ	QCGQDYTEVTVVQ	SGFNGVYQMLG-GR	QG--GGQQQ	-----	: 127		
BsuSSB	:	FLKKGSLAGVLDGRITCRN	YENQC-QQRVVTEVQAE	---	SVQFLPEPKNGGG	SGSGGYNEGNSGGG	: 124		
TteSSB3	:	NLKKGRIVAVTGSITCR	QWQDSS-CNRHVVIEV	VAD---	DVRHIEPKSGFG	SGSAPEEEE	: 118		
TmaSSB	:	YITKGRIVYVEGENRMR	RWETPT-GERVSEEVAN	---	VVRFRDRKP-AET	VSETEEEL	: 122		
		* <td></td> <td style="text-align: center;">180 <td style="text-align: center;">* <td style="text-align: center;">200 <td></td> </td></td></td>		180 <td style="text-align: center;">* <td style="text-align: center;">200 <td></td> </td></td>	* <td style="text-align: center;">200 <td></td> </td>	200 <td></td>			
DpsSSB	:	-----	NNSSDSSSAG	-----			: 120		
FpsSSB	:	-----		-----			: -		
ParSSB	:	-----	QGGYGNQGGGFSN	QGGQNDYGGQGGN	QPAHQGGYNQGGG	AAQGGH	: 171		
PcrSSB	:	-----	QSNQGGYGNQGGG	FSNQGQNDYGGQGGN	QPAHQGGYNQGGG	SASQGGH	: 177		
PhaSSB	:	QSQGGYQNNQSQGG	QSQGGYQSNQGGN	QNNQGGYTPQQS	SAPAA-QPQSAPAP	QNNQYQ-QPQGGFAPQ	: 205		
PinSSB	:	-----	QDNGQREQSSW	GKAPQQAPTQ-QPAP	QMAPAYQSTQN	QRPPAQAPQ	: 174		
PprSSB	:	-----	QQQQQGNW	---	KPQ--	QPAA--APQ	: 144		
PtoSSB	:	-----		-----			: -		
SwoSSB	:	QYN	-----	APQQAPQGGYAP	KPQAAPQQAPQ	GGYQSQQQGGQQ	QAPAYAPK	: 183	
EcoSSB	:	-----	GGQPQGGW	---	QPQ--	GNQ	: 147		
BsuSSB	:	-----	QYFGGQNDN	PEGG	-----		: 138		
TteSSB3	:	-----	KELDEDE	---			: 126		
TmaSSB	:	-----	EIPEEDES	-----			: 130		
		* <td></td> <td style="text-align: center;">240 <td style="text-align: center;">* <td style="text-align: center;">260 <td></td> </td></td></td>		240 <td style="text-align: center;">* <td style="text-align: center;">260 <td></td> </td></td>	* <td style="text-align: center;">260 <td></td> </td>	260 <td></td>			
DpsSSB	:	-----	ENSFPEPTGPD	AYGGTG	-----	NDVPE	: 142		
FpsSSB	:	-----	EIVKTASEAP	---	KTTSFDST	---	VENDLPE	: 140	
ParSSB	:	QNI	-----	FNNQKAPACQK	FFDQPTCAPAC	SKPTAML	DGPVDDIPE	: 213	
PcrSSB	:	QNS	-----	FNNQNAQAQ	QNFNKPTCAPA	QSKPTAMP	DGPVDDIPE	: 219	
PhaSSB	:	QSS	-----	APQQGGFAP	KPQNAQGGAS	-NPMEPT	ID--FDDIPE	: 244	
PinSSB	:	QPAQNRPPAQTQQ	QPAQNRPPA	QAPQQTQTQY	NEPESMD--	FDDIPE		: 222	
PprSSB	:	QSV	-----	APQQQAP	QPPQAPQPPQ	QYNEPP	MD--FDDIPE	: 183	
PtoSSB	:	-----	VTPQPPTQV	SAPQQQTASK	PKSTKPAIEE	EEEDDIPE		: 151	
SwoSSB	:	QQA	-----	APQQAPQ	RPAPQPPQQA	APQNF	PLDDGWDDIPE	: 225	
EcoSSB	:	FSG	-----	GAQSR--	PQSS--	APAAPS	---	NEPPMD--FDDIPE	: 178
BsuSSB	:	-----	NQNNQRN	QGNFND	DFPANDG	-KPIDIS	DDIPE	: 172	
TteSSB3	:	-----	KLFE	IPDDFDG	FTPIE	-SEDDIPE		: 150	
TmaSSB	:	-----	SDT	---	FSEDE	PEEPE		: 141	

Rys. 33 Porównanie sekwencji białek DpsSSB *D. psychrophila* (NCBI: WP\_011189820.1), FpsSSB *F. psychrophilum* (NCBI: WP\_011963776.1), ParSSB *P. arcticus* (NCBI: AAZ19531.1), PcrSSB *P. cryohalolentis* (NCBI: ABE75735.1), PhaSSB *P. haloplanktis* (NCBI: WP\_011329350.1), PinSSB *P. ingrahamii* (NCBI: WP\_011771629.1), PprSSB *P. profundum* (NCBI: WP\_011219846.1), PtoSSB *P. torquis* (NCBI: WP\_015023871.1), SwoSSB *S. woodyi* (NCBI: WP\_012323283.1), EcoSSB *E. coli* (NCBI: WP\_001311307.1), BsuSSB *B. subtilis* (NCBI: NP\_391970.1), TteSSB3 *T. tengcongensis* (NCBI: AAM25884.1) i TmaSSB *T. maritima* (NCBI: WP\_004081225.1). Czerwoną ramką zaznaczono sekwencje domen OB, natomiast niebieską – sekwencje kilku ostatnich reszt aminokwasowych.



<b>SSB</b>	<b><i>DpsSSB</i></b>	<b><i>FpsSSB</i></b>	<b><i>ParSSB</i></b>	<b><i>PcrSSB</i></b>	<b><i>PhaSSB</i></b>	<b><i>PinSSB</i></b>	<b><i>PprSSB</i></b>	<b><i>PtoSSB</i></b>
<b>Identyczność do <i>SwoSSB</i></b>	34%	21%	47%	46%	45%	53%	53%	30%
<b>Podobieństwo do <i>SwoSSB</i></b>	42%	38%	55%	55%	55%	66%	63%	42%
<b>Identyczność do <i>BsuSSB</i></b>	28%	21%	31%	31%	24%	28%	30%	21%
<b>Podobieństwo do <i>BsuSSB</i></b>	46%	37%	47%	47%	37%	40%	48%	38%
<b>Identyczność do <i>TteSSB3</i></b>	36%	29%	23%	22%	18%	21%	22%	29%
<b>Podobieństwo do <i>TteSSB3</i></b>	53%	42%	39%	39%	30%	36%	40%	41%
<b>Identyczność do <i>TmaSSB</i></b>	31%	25%	20%	21%	15%	19%	25%	23%
<b>Podobieństwo do <i>TmaSSB</i></b>	52%	46%	34%	34%	28%	34%	43%	41%

Tab. 7 Podobieństwo i identyczność białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* do *SwoSSB*, *BsuSSB*, *TteSSB3* i *TmaSSB*.

Białka *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* największą homologię (26-70% identyczności, 46-75% podobieństwa) wykazują w stosunku do białka SSB *E. coli*, mimo że pochodzą z organizmów odległych taksonomicznie i zasiedlających odmienne środowiska (Tab. 8). Wysoka homologia do SSB *E. coli* dotyczy w szczególności sekwencji domeny OB (38-82% identyczności i 62-90% podobieństwa) oraz kilku ostatnich reszt aminokwasowych, co świadczy o tym, iż są to elementy silnie zakonserwowane ewolucyjnie (Rys. 33, Tab. 8). Szczególnie wysoką homologię do domeny wiążącej ssDNA *EcoSSB* wykazują białka *PhaSSB*, *PinSSB* i *PprSSB*, dla których identyczność wynosi odpowiednio: 75%, 61% i 82%, a podobieństwo – 90%, 82% i 90%.

SSB	Identyczność do <i>EcoSSB</i>	Podobieństwo do <i>EcoSSB</i>	Identyczność do domeny OB <i>EcoSSB</i>	Podobieństwo do domeny OB <i>EcoSSB</i>
<i>DpsSSB</i>	41%	56%	55%	75%
<i>FpsSSB</i>	26%	46%	38%	62%
<i>ParSSB</i>	49%	57%	57%	73%
<i>PcrSSB</i>	45%	56%	58%	74%
<i>PhaSSB</i>	48%	57%	75%	90%
<i>PinSSB</i>	45%	58%	61%	82%
<i>PprSSB</i>	70%	75%	82%	90%
<i>PtoSSB</i>	33%	49%	42%	62%

Tab. 8 Podobieństwo i identyczność białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* do *EcoSSB* oraz domeny wiążącej ssDNA *EcoSSB*.

W domenie wiążącej OB badanych białek SSB znajdują się reszty aminokwasowe analogiczne do tych, które odpowiadają za wiązanie z jednoniciowym DNA u *EcoSSB* (Tab. 9). Lokalizacja tych reszt jest precyzyjnie zachowana (*PinSSB*, *PprSSB*) lub przesunięta o jedną resztę aminokwasową (*FpsSSB*, *PhaSSB*, *PtoSSB*), ewentualnie o dwie reszty aminokwasowe (*ParSSB*, *PcrSSB*), a w jednym przypadku nawet o pięć reszt aminokwasowych (*DpsSSB*). W badanych białkach niemal wszystkie pozycje reszt aminokwasowych istotnych dla wiązania z ssDNA mają charakter aromatyczny, z wyjątkiem pozycji 59 w białkach *FpsSSB* i *PtoSSB*, w której znajduje się reszta argininy. Stanowi to potwierdzenie, iż aromatyczne reszty aminokwasowe są silnie zakonserwowane i istotne dla funkcjonowania białek SSB.

Obecne w białku *EcoSSB* reszty lizyny w pozycjach 43, 62, 73 i 87, odpowiedzialne za elektrostatyczne oddziaływania z kwasem nukleinowym, występują również w badanych psychrofilnych białkach SSB (Tab. 9). Oprócz obserwowanego przesunięcia tych reszt aminokwasowych względem pozycji w sekwencji *EcoSSB* o jedną (*FpsSSB*, *PhaSSB*, *PtoSSB*), dwie (*ParSSB*, *PcrSSB*) lub pięć (*DpsSSB*) reszt aminokwasowych, występują także podstawienia innymi resztami aminokwasowymi. W przypadku białka *DpsSSB* w pozycji 39 występuje reszta glutaminy, a w pozycji 58 – reszta argininy, natomiast w pozycji 86 białka *FpsSSB* zamiast lizyny również występuje reszta glutaminy. W pozycji 62 białek *ParSSB*, *PcrSSB* i *PinSSB* oraz w pozycji 61 białka *FpsSSB* reszta lizyny została zastąpiona resztą argininy.

	<i>EcoSSB</i>	<i>DpsSSB</i>	<i>FpsSSB</i>	<i>ParSSB</i>	<i>PcrSSB</i>	<i>PhaSSB</i>	<i>PinSSB</i>	<i>PprSSB</i>	<i>PtoSSB</i>
<b>A</b>	Trp-40	Trp-36	Tyr-39	Trp-38	Trp-38	Tyr-39	Trp-40	Trp-40	Tyr-39
	Trp-54	Trp-49	Trp-53	Trp-52	Trp-52	Trp-53	Trp-54	Trp-54	Trp-53
	Phe-60	Trp-55	Arg-59	Phe-58	Phe-58	Phe-59	Phe-60	Phe-60	Arg-59
	Trp-88	Trp-83	Trp-87	Tyr-86	Tyr-86	Trp-87	Trp-88	Trp-88	Trp-87
<b>B</b>	Lys-43	Gln-39	Lys-42	Lys-41	Lys-41	Lys-42	Lys-43	Lys-43	Lys-42
	Lys-62	Arg-58	Lys-61	Arg-62	Arg-62	Lys-61	Arg-62	Lys-62	Lys-61
	Lys-73	Lys-68	Lys-72	Lys-71	Lys-71	Lys-72	Lys-73	Lys-73	Lys-72
	Lys-87	Lys-82	Gln-86	Lys-85	Lys-85	Lys-86	Lys-87	Lys-87	Lys-86
<b>C</b>	His-55	His-50	His-54	His-53	His-53	His-54	His-55	His-55	His-54
	Gln-76	Arg-71	Lys-75	Lys-74	Lys-74	Gln-75	Lys-76	Gln-76	Lys-75
	Gln-110	Lys-102	Thr-106	Gln-105	Gln-105	Gln-110	Asp-110	Gln-111	Thr-106

Tab. 9 Reszty aminokwasowe w białkach *EcoSSB*, *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* istotne dla: wiązania z ssDNA (A), oddziaływania elektrostatycznego z ssDNA (B) oraz tworzenia tetrameru SSB (C).

Analizując sekwencję badanych białek SSB poszukiwano również reszt aminokwasowych analogicznych do reszt odpowiedzialnych za tworzenie tetrameru u *EcoSSB*: His-55, Gln-76, Gln-110 (Tab. 9). We wszystkich badanych białkach występuje, analogiczna do His-55 *EcoSSB*, reszta histydyny w pozycji 55 (*PinSSB*, *PprSSB*), w pozycji 54 (*FpsSSB*, *PhaSSB*, *PtoSSB*), w pozycji 53 (*ParSSB*, *PcrSSB*) lub w pozycji 50 (*DpsSSB*). Zaobserwowano liczne podstawienia obu reszt glutaminy, takimi resztami jak arginina (*DpsSSB*), lizyna (*DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PinSSB*, *PtoSSB*), treonina (*FpsSSB*, *PtoSSB*) i kwas asparaginowy (*PinSSB*). Podstawienie reszt glutaminy resztami lizyny prawdopodobnie nie obniża zdolności monomerów badanych białek SSB do tworzenia tetramerów, wręcz przeciwnie – takie substytucje mogą nawet stabilizować utworzone tetramery, jak to jest w przypadku mutantów białek *EcoSSB*, w których reszty Gln-76 i Gln-110 zastąpiono resztami lizyny lub tyrozyny [99].

Badane białka SSB posiadają monomery o bardzo zróżnicowanej masie cząsteczkowej w zakresie od 15,6 do 26,2 kDa (Tab. 10). Białka *DpsSSB* i *FpsSSB* o masach monomeru wynoszących odpowiednio 15,6 i 15,9 kDa są najmniejszymi opisanymi do tej pory białkami SSB, natomiast *PhaSSB* o masie monomeru 26,2 kDa jest prawdopodobnie największym jednodomenowym (tzn. posiadającym jedną domenę OB w monomerze) białkiem SSB. Poza domeną OB, o długości sekwencji (105-110 aa) równej bądź zbliżonej do domeny OB *EcoSSB* (105 aa), w badanych białkach występuje charakterystyczny dla właściwych białek SSB C-terminalny koniec o charakterze kwaśnym, o bardzo zróżnicowanej długości, od zaledwie 31 aż do 138 reszt aminokwasowych. Na końcu domeny C-terminalnej analizowanych białek znajdują się silnie zakonserwowane dla mezofilnych i termofilnych białek SSB reszty

aminokwasowe, bardzo podobne lub identyczne do *EcoSSB* (DIPF), biorące udział w oddziaływaniach z innymi białkami. Obliczony punkt izoelektryczny białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PhaSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* przyjmuje typowe dla białek SSB wartości w granicach 5-6, natomiast pI dla białka *PinSSB* jest o wiele wyższy i wynosi 7,79. Ponadto, punkt izoelektryczny badanych białek SSB przyjmuje wyższe wartości w porównaniu do białek *TteSSB3* i *TmaSSB* z termofili (Tab. 10).

SSB	wielkość monomeru SSB [kDa]	długość sekwencji SSB [aa]	długość domeny OB [aa]	długość domeny C-końcowej [aa]	sekwencja C-końca	pI	ilość reszt C
<b><i>DpsSSB</i></b>	15,6	142	105	37	DVPPF	5,46	1
<b><i>FpsSSB</i></b>	15,9	140	109	31	DLPPF	5,94	2
<b><i>ParSSB</i></b>	22,8	213	108	105	DIPF	5,91	0
<b><i>PcrSSB</i></b>	23,3	219	108	111	DIPF	5,70	0
<b><i>PhaSSB</i></b>	26,2	244	106	138	DIPF	5,15	1
<b><i>PinSSB</i></b>	25,1	222	110	112	DIPF	7,79	1
<b><i>PprSSB</i></b>	20,4	183	107	76	DIPF	5,43	0
<b><i>PtoSSB</i></b>	17,1	151	108	43	DLPPF	5,67	3
<b><i>SwoSSB</i></b>	24,9	225	110	115	DIPF	5,86	0
<b><i>EcoSSB</i></b>	18,9	178	105	73	DIPF	5,44	0
<b><i>BsuSSB</i></b>	18,7	172	103	69	DLPPF	5,02	1
<b><i>TteSSB3</i></b>	17	150	103	47	DLPPF	4,49	1
<b><i>TmaSSB</i></b>	16,3	141	106	35	EPPF	4,80	0

Tab. 10 Analizowane parametry badanych i odnośnikowych białek SSB.

Na ogół mostki disiarczkowe nie występują w białkach SSB (brak odpowiedniej liczby reszt cystein potrzebnej do utworzenia takich wiązań). W sekwencji aminokwasowej białek *FpsSSB* i *PtoSSB* stwierdzono obecność odpowiednio 2 i 3 reszt cysteinowych (Tab. 10), co pozwala przypuszczać możliwość powstawania mostka disiarczkowego w tych białkach. Istnienie takich wiązań można sprawdzić poprzez badania struktury krystalograficznej białek SSB *F. psychrophilum* i *P. torquis*.

Analiza składu aminokwasowego psychrofilnych białek SSB nie wykazała drastycznych różnic w zawartości poszczególnych reszt aminokwasowych w stosunku do mezofilnych i termofilnych odpowiedników (Tab. 11). Pod względem zawartości reszt fenyloalaniny, asparaginy, kwasu asparaginowego oraz alaniny psychrofilne białka SSB nie wykazują

odstępstw w stosunku do ich mezofilnych odpowiedników (*EcoSSB* i *BsuSSB*), z wyjątkiem białka *FpsSSB*, które zawiera 4,3% alaniny, co odpowiada ilości tego aminokwasu w termofilnych białkach SSB. Psychrofilne białka SSB charakteryzuje skład aminokwasów Trp, Pro i Lys podobny do mezofilnych i termofilnych białek SSB. Wyjątek stanowią trzy białka: *FpsSSB*, które wykazuje niską zawartość reszt proliny (2,1%) i wysoką zawartość reszt lizyny (10%), *PinSSB* posiadające wysoką zawartość proliny (9,9%) oraz *PtoSSB*, które zawiera największą ilość lizyny w stosunku do porównywanych białek SSB, wynoszącą 10,6%. Badane białka SSB wykazują tendencję do zwiększonej ilości reszt tyrozyny i glutaminy w porównaniu do modelowych białek SSB, z wyjątkiem białek *DpsSSB*, *FpsSSB* i *PtoSSB*, dla których zawartość Gln przyjmuje wartości pośrednie między białkami *TteSSB3* i *BsuSSB*. Tendencję do zwiększonej ilości reszt serynowych w stosunku do mezofilnych i termofilnych SSB zaobserwowano jedynie w przypadku białek *DpsSSB*, *FpsSSB* i *PcrSSB*. Pod względem zawartości histydyn jedynie w *FpsSSB*, *ParSSB* i *PtoSSB* jest ona wyższa niż w modelowych białkach SSB. Procentowa zawartość leucyny w *DpsSSB*, *FpsSSB* i *PtoSSB* jest zbliżona, a w pozostałych psychrofilnych białkach mniejsza od ilości reszt tego aminokwasu w mezofilnych białkach SSB. Zbliżona do mezofilnych odpowiedników zawartość reszt glicyny występuje w białkach *ParSSB*, *PcrSSB* i *PhaSSB*, natomiast pozostałe analizowane białka wykazują mniejszą zawartość reszt tego aminokwasu w stosunku do *EcoSSB* i *BsuSSB*. Ponadto, ilość glicyny w *FpsSSB*, *PinSSB* i *PtoSSB* jest podobna do ilości tego aminokwasu w termofilnym białku *TteSSB3*. Psychrofilne SSB wykazują podobną zawartość metioniny do ich termofilnych odpowiedników, z wyjątkiem białka *PinSSB*, w którym ilość tych reszt aminokwasowych (3,6%) jest wyższa niż w termofilnych i mezofilnych białkach wiążących ssDNA. Białka *DpsSSB*, *FpsSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB* i *PtoSSB* wykazują zbliżoną albo nawet większą zawartość procentową izoleucyny niż termofilne białka *TteSSB3* i *TmaSSB*. Wśród psychrofilnych białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PinSSB* i *PtoSSB* wykazują zbliżoną do termofilnych białek zawartość reszt treoniny. Zaobserwowano tendencję do zmniejszonej ilości reszt waliny i argininy w psychrofilnych białkach SSB w stosunku do ich mezofilnych i termofilnych analogów, z wyjątkiem białka *DpsSSB*, w którym zawartość argininy jest równa zawartości tego aminokwasu w *BsuSSB* (7%). Badane białka SSB wykazują zróżnicowanie pod względem zawartości kwasu glutaminowego. Białka *ParSSB*, *PcrSSB* i *PhaSSB* zawierają mniej, a białka *PinSSB* i *PprSSB* prawie tyle samo reszt tego aminokwasu co mezofilne SSB, natomiast w białkach *DpsSSB*, *FpsSSB* i *PtoSSB* procentowa zawartość Glu osiąga poziom termofilnych białek SSB.

SSB	Ala	Ile	Leu	Val	Met	Gly	Pro	Lys	Arg	Asp
<i>DpsSSB</i>	7	6,3	4,9	3,5	2,8	11,3	4,2	4,2	7	4,9
<i>FpsSSB</i>	4,3	7,9	5	6,4	2,1	6,4	2,1	10	2,9	5
<i>ParSSB</i>	8	5,2	3,3	2,8	1,9	16,4	4,7	4,2	4,7	5,6
<i>PcrSSB</i>	6,8	4,6	2,7	2,7	1,8	16,9	4,6	3,7	4,6	5
<i>PhaSSB</i>	5,7	2,9	2,5	4,9	2,5	15,6	7	4,1	2,5	4,5
<i>PinSSB</i>	7,7	1,8	3,6	4,5	3,6	6,8	9,9	5,9	4,5	4,5
<i>PprSSB</i>	7,7	3,3	3,8	6,6	2,7	10,4	7,1	3,8	4,4	3,8
<i>PtoSSB</i>	5,3	5,3	4,6	6	2,6	6	7,3	10,6	2,6	5,3
<i>EcoSSB</i>	7,3	2,8	4,5	7,3	3,4	16,3	6,7	3,4	5,6	4,5
<i>BsuSSB</i>	5,8	1,7	5,8	7	0,6	14	4,1	2,9	7	6,4
<i>TteSSB3</i>	4	5,3	7,3	8,7	2	6	6	5,3	6	10,7
<i>TmaSSB</i>	5	4,3	5,7	9,2	2,8	4,3	7,1	3,5	10,6	6,4

SSB	Glu	Gln	Asn	Ser	Thr	His	Trp	Phe	Tyr	Cys
<i>DpsSSB</i>	7,7	4,9	6,3	9,2	7	0,7	2,8	1,4	2,8	0,7
<i>FpsSSB</i>	9,3	2,1	7,1	8	10,7	2,1	1,4	4,3	3,6	1,4
<i>ParSSB</i>	4,2	12,2	8	5,6	4,2	1,4	0,9	3,3	3,3	0
<i>PcrSSB</i>	4,1	12,8	10	7,3	4,1	0,9	0,9	3,2	3,2	0
<i>PhaSSB</i>	3,3	18,9	6,6	6,1	4,5	0,4	0,8	2,9	4,1	0,4
<i>PinSSB</i>	5,4	17,6	6,3	3,6	6,3	0,9	1,8	2,3	2,7	0,5
<i>PprSSB</i>	5,5	21,3	4,4	3,8	3,8	0,5	2,2	2,2	2,7	0
<i>PtoSSB</i>	9,9	5,3	4,6	3,3	9,3	2	1,3	3,3	3,3	2
<i>EcoSSB</i>	5,6	10,1	4,5	5,6	5	0,6	2,2	2,2	2,2	0
<i>BsuSSB</i>	5,2	7,6	12,2	4,7	5,2	0	0,6	6,4	2,3	0,6
<i>TteSSB3</i>	8	1,3	4	6,7	8	0,7	2	6	1,3	0
<i>TmaSSB</i>	1,28	0,7	2,1	5	10,6	0	0,7	7,8	1,4	0

Tab. 11 Procentowa zawartość reszt aminokwasowych w badanych białkach SSB bakterii psychrofilnych, białkach *EcoSSB* i *BsuSSB* bakterii mezofilnych oraz białkach *TteSSB3* i *TmaSSB* bakterii termofilnych.

Psychrofilne białka SSB wykazują mniejszą zawartość aromatycznych oraz niepolarnych reszt aminokwasowych niż ich mezofilne i termofilne analogi (Tab. 11). Prawdopodobnie jest to efekt adaptacji tych białek do funkcjonowania w niskich temperaturach. Mniejsza ilość aromatycznych reszt tyrozyny, fenyloalaniny i tryptofanu przyczynia się do obniżenia polarnych oddziaływań pomiędzy pierścieniami tych reszt aminokwasowych, a mniejsza zawartość niepolarnych aminokwasów powoduje obniżenie indeksu hydrofobowości badanych białek

SSB. Obie te właściwości mogą wpływać na wzrost giętkości cząsteczek psychrofilnych białek SSB umożliwiając im prawidłowe funkcjonowanie w niskiej temperaturze. Ponadto białka *FpsSSB*, *PhaSSB*, *PinSSB* oraz *PtoSSB* wykazują niższy stosunek (Arg/Arg+Lys) w porównaniu z mezofilnymi i termofilnymi białkami SSB (Tab. 11), co przypuszczalnie również jest związane z adaptacją tych białek do niskich temperatur. Zawartość naładowanych reszt aminokwasowych w psychrofilnych białkach wiążących jednoniciowy DNA utrzymuje się na poziomie mezofilnych białek SSB, a w przypadku białek *FpsSSB* (29,3%) i *PtoSSB* (30,4%) jest bliska ilości charakteryzującej termofilne białka SSB (Tab. 11). Właściwością zaadaptowanych do zimna enzymów jest zwiększona zawartość reszt aminokwasowych o krótkich lub małych łańcuchach bocznych w stosunku do mezofilnych analogów. W psychrofilnych białkach SSB nie zaobserwowano zwiększonej zawartości małych reszt aminokwasowych w porównaniu do *EcoSSB* i *BsuSSB*. Wręcz przeciwnie: zachodzi tendencja do zmniejszenia ilości tych reszt, a w białkach *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PinSSB*, *PprSSB* i *PtoSSB* zawartość ta jest zbliżona do termofilnych białek SSB (Tab. 11). Skład aminokwasowy psychrofilnych białek SSB stanowi więc pewien kompromis między strukturą wynikającą z adaptacji do zimna a silnie zakonserwowaną strukturą domeny OB i sekwencją C-końca, charakterystyczną dla mezofilnych i termofilnych białek SSB.

Ponadto, psychrofilne białka SSB wykazują ciekawe odstępstwa w sekwencji aminokwasowej domeny C-końcowej od modelowego białka *E. coli* oraz innych opisanych w literaturze białek SSB. Białka *PtoSSB* i *PinSSB* zawierają półtora, a nawet dwa razy więcej reszt proliny, a *FpsSSB* i *DpsSSB* trzy oraz cztery razy więcej reszt seryny we fragmencie C-końcowym niż *EcoSSB*. Znacznie większą zawartość reszt treoniny w stosunku do mezofilnych i termofilnych białek wykazują *FpsSSB* i *PtoSSB*. Białka SSB *D. psychrophila*, *F. psychrophilum* i *P. torquis* wykazują ponad dwu- a nawet niemal trzykrotnie (19,4%) większą zawartość reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego w porównaniu do SSB *E. coli*, dzięki czemu domena C-końcowa posiada silnie kwasowy charakter, prawie jak w przypadku białek SSB termofilnych bakterii. Zaobserwowano również, że fragment C-końcowy jest bardziej hydrofilowy niż analogiczny fragment *EcoSSB* i pod tym względem psychrofilne białka SSB są bardziej zbliżone do swoich termofilnych analogów. Poza tym charakterystyczną cechą białek *PhaSSB*, *PinSSB* i *PprSSB* jest duża zawartość reszt glutaminy. Aż 40 reszt tego aminokwasu z 46 obecnych w *PhaSSB*, 34 z 39 obecnych w *PinSSB* i 29 z 39 obecnych w *PprSSB* znajduje się w domenie C-końcowej, co stanowi odpowiednio aż 29%, 30,4% i 38,2% sekwencji tej domeny. Ponadto, fragment C-końcowy białka SSB *P. profundum* zawiera niebywałą ilość powtórzeń reszt glutaminy, nawet po 9 reszt tego aminokwasu obok siebie (Rys. 33), co nadaje hydrofilowy charakter tej części białka, zresztą zawsze eksponowany na zewnątrz cząsteczki u poznanych

strukturalnie białek SSB. Rejony bogate w reszty glicyny mogą brać udział w oddziaływaniach między sąsiednimi cząsteczkami białek SSB związanymi z nicią DNA. Te elastyczne regiony zmieniają w obecności DNA swoją konformację uwydatniając w ten sposób inne reszty aminokwasowe (np. Arg), które mogą tworzyć wiązania wodorowe między sąsiadującymi ze sobą cząsteczkami SSB [234]. Z drugiej strony, zazwyczaj takie obszary zawierające ogromne ilości reszt glutaminy określa się sformułowaniem „rejony bogate w glutaminę” (z *ang.* Q-rich lub glutamine-rich regions) i tworzą one tzw. układ zamka (z *ang.* polar zipper), z którym w specyficzny sposób oddziałują różne podjednostki białkowe. Żadne opisane dotychczas w literaturze białko SSB nie posiada wyżej wymienionych cech. W domenie C-końcowej psychrofilnych białek wiążących jednoniciowy DNA zawartość małych reszt aminokwasowych jest zbliżona do ich mezofilnych i termofilnych odpowiedników, wyjątek stanowią białka *DpsSSB* i *PcrSSB*, w których ilość tych reszt (odpowiednio 83,7% i 70,2%) jest znacznie większa niż w *EcoSSB* (65,8%). Zwiększona ilość reszt aminokwasowych o małych i krótkich łańcuchach bocznych nadaje domenie C-końcowej lokalną giętkość, która prawdopodobnie ma istotne znaczenie w oddziaływaniach białek *DpsSSB* i *PcrSSB* z innymi białkami biorącymi udział w procesach metabolizmu DNA w niskich temperaturach.



## 9. Podsumowanie

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dotyczące otrzymania i charakterystyki białek SSB z ośmiu bakterii psychrofilnych są pionierskie w skali światowej.

1. Po raz pierwszy wyizolowano geny *ssb* *D. psychrophila*, *F. psychrophilum*, *P. profundum*, *P. haloplanktis*, *P. arcticus*, *P. cryohalolentis*, *P. ingrahamii* i *P. torquis* oraz skonstruowano systemy ekspresji tych genów w *E. coli* umożliwiające wydajną produkcję białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PprSSB*, *PhaSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PinSSB* i *PtoSSB*.
2. Wykazano zdolność wiązania jednoniciowego DNA przez białka *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PprSSB*, *PhaSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PinSSB* i *PtoSSB*.
3. Określono masę cząsteczkową i wykazano homotetrameryczną budowę białek *DpsSSB*, *FpsSSB*, *PprSSB*, *PhaSSB*, *ParSSB*, *PcrSSB*, *PinSSB* i *PtoSSB*. Białka *DpsSSB* i *FpsSSB* są najmniejszymi opisanymi do tej pory białkami SSB, natomiast *PhaSSB* jest prawdopodobnie największym jednodomenowym białkiem SSB.
4. Określono długość miejsca wiązania ssDNA przez badane białka SSB, która wynosi 30-32 nt i ma stałą wartość w szerokim zakresie stężeń NaCl. Wyjątek stanowią białka: *FpsSSB* oraz *PhaSSB*.
5. Zaproponowano modele wiązania, jakie wykazują badane białka SSB. Białko *PhaSSB* tworzy analogiczne do *EcoSSB* typy wiązania: podstawowe ( $(SSB)_{35}$ ) i ( $(SSB)_{65}$ ) oraz przejściowy typ ( $(SSB)_{56}$ ). Wśród pozostałych psychrofilnych białek SSB istnieje model wiązania ( $(SSB)_{35}$ ), w którym wszystkie domeny OB biorą udział w wiązaniu jednoniciowego DNA.
6. Badając aktywność białek SSB psychrofilnych bakterii w wysokich temperaturach stwierdzono, że są one bardziej termostabilne niż białka SSB bakterii należących do rodzaju *Deinococcus* oraz *Thermus*. Najbardziej termostabilnym białkiem SSB pochodzącym z psychrofilnego organizmu jest *PcrSSB*.
7. Badając zdolność otrzymanych białek SSB do destabilizacji dwuniciowego DNA wykazano, że badane białka obniżają temperaturę denaturacji dsDNA w różnym stopniu, a w przypadku białek *PtoSSB* i *PhaSSB* efekt ten jest silniejszy niż dla białek *EcoSSB*, *TaqSSB* czy *TthSSB*.
8. Wyznaczono temperaturę denaturacji badanych psychrofilnych białek SSB, która jest zbliżona, a w przypadku białek *DpsSSB* i *FpsSSB* wyższa niż dla *EcoSSB*.
9. Przeprowadzono analizę składu aminokwasowego psychrofilnych białek SSB i stwierdzono, że wykazują one zarówno cechy białek zaadaptowanych do zimna, jak i właściwości białek SSB bakterii mezofilnych i termofilnych.

## 10. Skróty nazw stosowanych w pracy

**ang.:** z angielskiego

**AFP:** białka zapobiegające zamarzaniu (ang. anti-freeze proteins)

**ATP:** adenozynotrifosforan

**BSA:** albumina surowicy wołowej (ang. bovine serum albumin)

**BsuSSB:** białko SSB-podobne *Bacillus subtilis* kodowane przez gen *ssb*

**CAP:** białka aklimatyzacji do zimna (ang. cold-acclimation proteins)

**cDNA:** (ang. complementary DNA) komplementarny DNA

**CSP:** białka szoku zimna (ang. cold-shock proteins)

**d-:** 2'-deoksyrybo-

**Da:** dalton (jednostka masy cząsteczkowej)

**DBD:** określenie domen OB w białkach RPA

**DgeSSB:** białko SSB-podobne *Deinococcus geothermalis*

**DgrSSB:** białko SSB-podobne *Deinococcus grandis*

**DmuSSB:** białko SSB-podobne *Deinococcus murrayi*

**DNA:** kwas deoksyrybonukleinowy

**dNTP:** trójfosforan deoksyrybonukleozydu

**DprSSB:** białko SSB-podobne *Deinococcus proteolyticus*

**DpsSSB:** białko SSB-podobne *Desulfotalea psychrophila*

**DraSSB:** białko SSB-podobne *Deinococcus radiodurans*

**DrpSSB:** białko SSB-podobne *Deinococcus radiopungans*

**DSC:** skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. differential scanning calorimetry)

**dsDNA:** dwuniciowa cząsteczka DNA

**E<sub>a</sub>:** energia aktywacji

**EcoSSB:** białko SSB *Escherichia coli*

**EDTA:** sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego

**EMSA:** opóźnienie ruchliwości elektroforetycznej (ang. electrophoresis mobility shift assays)

**FpsSSB:** białko SSB-podobne *Flavobacterium psychrophilum*

**gp 32:** produkt genu 32 faga T4

**HsmtSSB:** ludzkie mitochondrialne białko SSB-podobne

**hsRPA:** ludzkie jądrowe białko RPA

**INP:** białka nukleocyjne lodu (ang. ice nucleic proteins)

**m.in.:** między innymi

**M:** stężenie molowe (mol dm<sup>-3</sup>)

**mRNA:** informacyjny RNA

**MtuSSB:** białko SSB-podobne *Mycobacterium tuberculosis*

**NCBI:** Narodowe Centrum Biotechnologicznej Informacji (ang. National Center for Biotechnology Information)

**np.:** na przykład

**nt:** nukleotyd

**OB-fold:** domena wiążąca ssDNA (ang. oligonucleotide/oligosaccharide binding fold)

**ori:** miejsce inicjacji replikacji DNA

**ParSSB:** białko SSB-podobne *Psychrobacter arcticus*

**PCR:** łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

**PcrSSB:** białko SSB-podobne *Psychrobacter cryohalolentis*

**PDB:** Protein Data Bank

**PhaSSB:** białko SSB-podobne *Pseudoalteromonas haloplanktis*

**PinSSB:** białko SSB-podobne *Psychromonas ingrahamii*

**PNA:** kwas peptydonukleinowy (ang. peptide nucleic acid)

**PprSSB:** białko SSB-podobne *Photobacterium profundum*

**PtoSSB:** białko SSB-podobne *Psychroflexus torquis*

**pz:** pary zasad

**RNA:** kwas rybonukleinowy

**RPA:** białko SSB-podobne archeonów i organizmów eukariotycznych (ang. Replication Protein A)

**RT-PCR:** reakcja amplifikacji cDNA na matrycy mRNA (ang. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

**SDS:** dodecylosiarczan sodu

**SDS-PAGE:** elektroforeza poliakrylamidowa (ang. polyacrylamide gel electrophoresis) w warunkach denaturujących

**SSB:** białko wiążące jednoniciowy DNA (ang. single stranded DNA – binding protein)

**SsbA:** białko SSB-podobne *Streptococcus pneumoniae* kodowane przez gen *ssbA*

**SsbB:** białko SSB-podobne *Streptococcus pneumoniae* kodowane przez gen *ssbB*

**ssDNA:** jednoniciowy DNA (ang. single stranded DNA)

**SsoSSB:** białko SSB-podobne *Sulfolobus solfataricus*

**STR:** krótkie tandemowe sekwencje repetytywne (ang. Short Tandem Repeats)

**ShoSSB:** białko SSB-podobne *Shewanella woodyi*

**TaqSSB:** białko SSB-podobne *Thermus aquaticus*

**TEMED:** N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina

**THP:** białka termicznej histerezy (ang. thermal hysteresis proteins)

**TmaSSB:** białko SSB-podobne *Thermotoga maritima*

**TneSSB:** białko SSB-podobne *Thermotoga neapolitana*

**Tris:** trihydroksymetyloaminometan

**TteSSB3:** białko SSB-podobne *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 kodowane przez gen *ssb3*

**TthSSB:** białko SSB-podobne *Thermus thermophilus*

**UDG:** glikozylaza uracylowa

**v/v:** objętość do objętości (ang. volume to volume)

**w/v:** masa do objętości (ang. weight to volume)

**w/w:** masa do masy (ang. weight to weight)

**YwpH:** białko SSB-podobne *Bacillus subtilis* kodowane przez gen *ywpH*

## 11. Literatura

1. Turkiewicz M. Drobnoustroje psychrofilne i ich biotechnologiczny potencjał. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*. 2006; 55(273): 307–320.
2. Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*. 2011; 162(3): 346–61.
3. Casanueva A, Tuffin M, Cary C, Cowan DA. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of “omic” technologies. *Trends Microbiol*. 2010; 18(8): 374–81.
4. Ingraham J, Stokes JL. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*. 1959; 23: 97–108.
5. Morita R. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*. 1975; 39(2): 144–167.
6. MacLeod R. The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriol Rev*. 1965; 29(1): 9–23.
7. Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol*. 2003; 1(3): 200–8.
8. Knoblauch C, Jørgensen BB. Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments. *Environ Microbiol*. 1999; 1(5): 457–67.
9. Rabus R, Ruepp A, Frickey T, Rattei T, Fartmann B, Stark M, et al. The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold Arctic sediments. *Environ Microbiol*. 2004; 6(9): 887–902.
10. Barton LL, Fauque GD. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Adv Appl Microbiol*. 2009; 68: 41–98.
11. Duchaud E, Boussaha M, Loux V, Bernardet JF, Michel C, Kerouault B, et al. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(7): 763–9.
12. Barnes M, Brown M. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *Open Fish Sci J*. 2011; 4: 1–9.
13. Alvarez B, Secades P, McBride M, Guijarro J. Development of genetic techniques for the psychrotrophic fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microb*. 2004; 70(1): 581–587.
14. Secades P, Alvarez B, Guijarro J. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microb*. 2001; 67(6): 2436–2444.
15. Castillo D, Higuera G, Villa M, Middelboe M, Dalsgaard I, Madsen L, et al. Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *J Fish Dis*. 2012; 35(3): 193–201.
16. Bakermans C, Ayala-del-Río HL, Ponder MA, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D, Thomashow MF, et al. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Micr*. 2006; 56: 1285–91.
17. Ayala-del-Río HL, Chain PS, Grzymiski JJ, Ponder MA, Ivanova N, Bergholz PW, et al. The genome sequence of *Psychrobacter arcticus* 273-4, a psychroactive Siberian permafrost bacterium, reveals mechanisms for adaptation to low-temperature growth. *Appl Environ Microb*. 2010; 76(7): 2304–12.
18. Novototskaya-Vlasova K, Petrovskaya L, Yakimov S, Gilichinsky D. Cloning, purification, and characterization of a cold-adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012; 82(2): 367–75.
19. Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. *Int J Syst Bacteriol*. 1995; 45(4): 755–761.

20. Médigue C, Krin E, Pascal G, Barbe V, Bernsel A, Bertin P, et al. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res.* 2005; 15(10): 1325–1335.
21. Lanoil B, Ciuffetti L, Giovannoni S. The marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* has a complex genome structure composed of two separate genetic units. *Genome Res.* 1996; 6: 1160–69.
22. Papa R, Parrilli E, Sannia G. Engineered marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: a promising micro-organism for the bioremediation of aromatic compounds. *J Appl Microbiol.* 2009; 106: 49–56.
23. Corsaro M, Lanzetta R, Parrilli E, Parrilli M, Tutino M, Ummarino S. Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *J Bacteriol.* 2004; 186(1): 29–34.
24. Ivanova EP, Mikhailov VV. A New Family, *Alteromonadaceae* fam. nov., Including Marine Proteobacteria of the Genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, and *Colwellia*. *Microbiology.* 2001; 70(1): 10–17.
25. Hayashida-Soiza G, Uchida A, Mori N, Kuwahara Y, Ishida Y. Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *J Appl Microbiol.* 2008; 105(5): 1672–7.
26. Cusano AM, Parrilli E, Marino G, Tutino ML. A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Microb Cell Fact.* 2006; 5: 40.
27. Parrilli E, De Vizio D, Cirulli C, Tutino ML. Development of an improved *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 strain for recombinant protein secretion at low temperature. *Microb Cell Fact.* 2008; 7(1): 2.
28. Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure.* 1998; 6(12): 1503–16.
29. Van Petegem F, Collins T, Meuwis MA, Gerday C, Feller G, Van Beeumen J. The Structure of a Cold-adapted Family 8 Xylanase at 1.3 Å Resolution. Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *J Biol Chem.* 2003; 278(9): 7531–9.
30. Violot S, Aghajari N, Czjzek M, Feller G, Sonan GK, Gouet P, et al. Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *J Mol Biol.* 2005; 348(5): 1211–24.
31. Merlino A, Russo Krauss I, Castellano I, De Vendittis E, Rossi B, Conte M, et al. Structure and flexibility in cold-adapted iron superoxide dismutases: the case of the enzyme isolated from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Struct Biol.* 2010; 172(3): 343–52.
32. Alterio V, Aurilia V, Romanelli A, Parracino A, Saviano M, D’Auria S, et al. Crystal structure of an S-formylglutathione hydrolase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Biopolymers.* 2010; 93(8): 669–77.
33. Auman AJ, Breezee JL, Gosink JJ, Kämpfer P, Staley JT. *Psychromonas ingrahamii* sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice. *Int J Syst Evol Micr.* 2006; 56: 1001–7.
34. Breezee J, Cady N, Staley JT. Subfreezing Growth of the Sea Ice Bacterium “*Psychromonas ingrahamii*”. *Microb Ecol.* 2004; 47(3): 300–4.
35. Roman EA, Faraj SE, Cousido-Siah A, Mitschler A, Podjarny A, Santos J. Frataxin from *Psychromonas ingrahamii* as a model to study stability modulation within the CyaY protein family. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1834(6): 1168–1180.
36. Riley M, Staley JT, Danchin A, Wang TZ, Brettin TS, Hauser LJ, et al. Genomics of an extreme psychrophile, *Psychromonas ingrahamii*. *BMC Genomics.* 2008; 9: 210.
37. Nogi Y, Masui N, Kato C. *Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extremophiles.* 1998; 2: 1–7.

38. Bartlett D, Wright M, Yayanos AA, Silverman M. Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature*. 1989; 342(6249): 572–4.
39. Vezzi A, Campanaro S, D'Angelo M, Simonato F, Vitulo N, Lauro FM, et al. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science*. 2005; 307: 1459–61.
40. Allen EE, Facciotti D, Bartlett DH. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Appl Environ Microb*. 1999; 65(4): 1710–20.
41. Bowman J, McCammon S, Lewis T, Skerratt J, Brown J, Nichols D, et al. *Psychroflexus torquis* gen. nov., sp. nov. a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et al. 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. *Microbiology*. 1998; 144: 1601–1609.
42. Hamana K, Niitsu M. Large production of an aromatic amine, 2-phenylethylamine, in a psychrophilic marine bacterium, *Psychroflexus torquis*. *J Gen Appl Microbiol*. 2001; 47(2): 103–105.
43. Hamana K, Niitsu M. Production of 2-phenylethylamine by decarboxylation of L-phenylalanine in alkaliphilic *Bacillus cohnii*. *J Gen Appl Microbiol*. 1999; 45(4): 149–153.
44. D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*. 2006; 7(4): 385–9.
45. Russell N, Nichols D. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiology*. 1999; 145: 767–779.
46. Russell NJ. Psychrophilic bacteria - molecular adaptations of membrane lipids. *Comp Biochem Phys A*. 1997; 118(3): 489–93.
47. Duman JG, Olsen TM. Thermal Hysteresis Protein Activity in Bacteria, Fungi, and Phylogenetically Diverse Plants. *Cryobiology*. 1993; 30(3): 322–328.
48. De Pascale D, De Santi C, Fu J, Landfald B. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Mar Genom*. 2012; 8: 15–22.
49. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. *J Biosci Bioeng*. 2002; 94(6): 492–6.
50. D'Amico S, Claverie P, Collins T, Georgette D, Gratia E, Hoyoux A, et al. Molecular basis of cold adaptation. *Philos T Roy Soc B*. 2002; 357(1423): 917–25.
51. Feller G. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(4): 648–662.
52. Feller G. Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica*. 2013; 2013: 1–28.
53. Russell NJ. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*. 2000; 4(2): 83–90.
54. Nichols D, Bowman J, Sanderson K, Nicols C, Lewis T, McMeekin T, et al. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr Opin Struc Biol*. 1999; 10: 240–246.
55. Metpally RPR, Reddy BVB. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC Genomics*. 2009; 10: 11.
56. Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa J, Claverie P, Collins T, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2000; 18: 103–107.
57. Oikawa T, Kazuoka T, Soda K. Paradoxical thermostable enzymes from psychrophile: molecular characterization and potentiality for biotechnological application. *J Mol Catal B-Enzym*. 2003; 23(2-6): 65–70.
58. Kazuoka T, Oikawa T, Muraoka I, Kuroda S, Soda K. A cold-active and thermostable alcohol dehydrogenase of a psychrotolerant from Antarctic seawater, *Flavobacterium frigidimaris* KUC-1. *Extremophiles*. 2007; 11(2): 257–67.

59. Fedøy AE, Yang N, Martinez A, Leiros HKS, Steen IH. Structural and functional properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability. *J Mol Biol.* 2007; 372(1): 130–49.
60. Feller G, Arpigny J, Narinx E, Gerday C. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comp Biochem Phys A.* 1997; 118(3): 495–499.
61. Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53(10): 830–41.
62. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemia.* Warszawa, 2002. Wydawnictwo Naukowe PWN.
63. Alberts B, Frey L. T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA. *Nature.* 1970; 227: 1313–18.
64. Alberts B, Herrick G. DNA-cellulose chromatography. *Method Enzymol.* 1971; 21: 198–217.
65. Delius H, Mantell NJ, Alberts B. Characterization by electron microscopy of the complex formed between T4 bacteriophage gene 32-protein and DNA. *J Mol Biol.* 1972; 67(3): 341–350.
66. Sigal N, Delius H, Kornberg T, Gefter M, Alberts B. A DNA-Unwinding Protein Isolated from *Escherichia coli*: Its Interaction with DNA and with DNA Polymerases. *P Natl Acad Sci USA.* 1972; 69(12): 3537–3541.
67. Molineux IJ, Friedman S, Gefter ML. Purification and Properties of the *Escherichia coli* Deoxyribonucleic Acid-unwinding Protein. EFFECTS ON DEOXYRIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS IN VITRO. *J Biol Chem.* 1974; 249(19): 6090–6098.
68. Mackay V, Linn S. Selective inhibition of the dnase activity of the recBC enzyme by the DNA binding protein from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1976; 251(12): 3716–9.
69. Molineux IJ, Gefter ML. Properties of the *Escherichia coli* DNA-binding (unwinding) protein interaction with nucleolytic enzymes and DNA. *J Mol Biol.* 1975; 98(4): 811–825.
70. Molineux IJ, Pauli A, Gefter ML. Physical studies of the interaction between the *Escherichia coli* DNA binding protein and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 1975; 2(10): 1821–1838.
71. Jensen DE, Kelly RC, von Hippel PH. DNA “melting” proteins. II. Effects of bacteriophage T4 gene 32-protein binding on the conformation and stability of nucleic acid structures. *J Biol Chem.* 1976; 251(22): 7215–7228.
72. Kelly RC, Jensen DE, von Hippel PH. DNA “melting” proteins. IV. Fluorescence measurements of binding parameters for bacteriophage T4 gene 32-protein to mono-, oligo-, and polynucleotides. *J Biol Chem.* 1976; 251(22): 7240–7250.
73. Alberts B, Sternglanz R. Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature.* 1977; 269(5630): 655–661.
74. Meyer RR, Glassberg J, Kornberg A. An *Escherichia coli* Mutant Defective in Single-Strand Binding Protein is Defective in DNA Replication. *P Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(4): 1702–1705.
75. Ruyechan W, Wetmur J. Studies on the noncooperative binding of the *Escherichia coli* DNA unwinding protein to single-stranded nucleic acids. *Biochemistry.* 1976; 15(23): 5057–5064.
76. Kim YT, Tabor S, Bortner C, Griffith JD, Richardson CC. Purification and characterization of the bacteriophage T7 gene 2.5 protein. A single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem.* 1992; 267(21): 15022–15031.
77. Lehnerr H, Bendtsen JD, Preuss F, Ilyina TV. Identification and Characterization of the Single-Stranded DNA-Binding Protein of Bacteriophage P1. *J Bacteriol.* 1999; 181(20): 6463–6468.
78. Tsurumi T, Kishore J, Yokoyama N, Fujita M, Daikoku T, Yamada H, et al. Overexpression, purification and helix-destabilizing properties of Epstein-Barr virus ssDNA-binding protein. *J Gen Virol.* 1998; 79(5): 1257–1264.
79. Mapelli M, Panjkar S, Tucker PA. The crystal structure of the herpes simplex virus 1 ssDNA-binding protein suggests the structural basis for flexible, cooperative single-stranded DNA binding. *J Biol Chem.* 2005; 280(4): 2990–7.
80. Steffen SE, Bryant FR. Purification and characterization of the single-stranded DNA binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 388(1): 165–70.



81. Grove DE, Willcox S, Griffith JD, Bryant FR. Differential single-stranded DNA binding properties of the paralogous SsbA and SsbB proteins from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2005; 280(12): 11067–73.
82. Genschel J, Litz L, Thole H, Roemling U, Urbanke C. Isolation, sequencing and overproduction of the single-stranded DNA binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Gene*. 1996; 182: 137–143.
83. Purnapatre K, Varshney U. Cloning, over-expression and biochemical characterization of the single-stranded DNA binding protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem*. 1999; 264(2): 591–8.
84. Dąbrowski S, Olszewski M, Piątek R, Kur J. Novel thermostable ssDNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *T. aquaticus* - expression and purification. *Protein Express Purif*. 2002; 26(1): 131–8.
85. Dąbrowski S, Olszewski M, Piątek R, Brillowska-Dąbrowska A, Konopa G, Kur J. Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* - new arrangement of binding domains. *Microbiology*. 2002; 148: 3307–15.
86. Eggington J, Haruta N, Wood E, Cox M. The single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*. *BMC Microbiol*. 2004; 4: 2.
87. Olszewski M, Grot A, Wojciechowski M, Nowak M, Mickiewicz M, Kur J. Characterization of exceptionally thermostable single-stranded DNA-binding proteins from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana*. *BMC Microbiol*. 2010; 10(1): 260.
88. Wold MS, Kelly T. Purification and Characterization of Replication Protein A, a Cellular Protein Required for in vitro Replication of Simian Virus 40 DNA. *P Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(8): 2523–2527.
89. Mitsis P, Kowalczykowski S, Lehman I. Single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila melanogaster*: Characterization of the heterotrimeric protein and its interaction with single-stranded DNA. *Biochemistry*. 1993; 32(19): 5257–5266.
90. Jong AY, Aebersold R, Campbell JL. Multiple species of single-stranded nucleic acid-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1985; 260(30): 16367–16374.
91. Mignotte B, Barat M, Mounolou JC. Characterization of a mitochondrial protein binding to single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*. 1985; 13(5): 1703–1716.
92. Komori K, Ishino Y. Replication protein A in *Pyrococcus furiosus* is involved in homologous DNA recombination. *J Biol Chem*. 2001; 276(28): 25654–60.
93. Haseltine CA, Kowalczykowski SC. A distinctive single-strand DNA-binding protein from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol*. 2002; 43(6): 1505–15.
94. Kelly TJ, Simanek P, Brush GS. Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *P Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(25): 14634–9.
95. Shereda RD, Kozlov AG, Lohman TM, Cox MM, Keck JL. SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit Rev Biochem Mol*. 2009; 43(5): 289–318.
96. Weiner JH, Bertsch LL, Kornberg A. The deoxyribonucleic acid unwinding protein of *Escherichia coli*. Properties and functions in replication. *J Biol Chem*. 1975; 250(6): 1972–1980.
97. Curth U, Genschel J, Urbanke C, Greipel J. *In Vitro* and *In Vivo* Function of the C-Terminus of *Escherichia Coli* Single-Stranded DNA Binding Protein. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24(14): 2706–2711.
98. Williams K, Spicer E, LoPresti M, Guggenheimer R, Chase J. Limited proteolysis studies on the *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein. Evidence for a functionally homologous domain in both the *Escherichia coli* and T4 DNA binding proteins. *J Biol Chem*. 1983; 258(5): 3346–3355.
99. Carlini L, Curth U, Kindler B, Urbanke C, Porter R. Identification of amino acids stabilizing the tetramerization of the single stranded DNA binding protein from *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 1998; 430(3): 197–200.
100. Raghunathan S, Ricard CS, Lohman TM, Waksman G. Crystal structure of the homo-tetrameric DNA binding domain of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein determined by

- multiwavelength x-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9-Å resolution. *P Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(13): 6652–7.
101. Kelman Z, Yuzhakov A, Andjelkovic J, O'Donnell M. Devoted to the lagging strand—the subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly. *EMBO J*. 1998; 17(8): 2436–49.
  102. Lu D, Keck JL. Structural basis of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein stimulation of exonuclease I. *P Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(27): 9169–74.
  103. Handa P, Acharya N, Varshney U. Chimeras between single-stranded DNA-binding proteins from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* reveal that their C-terminal domains interact with uracil DNA glycosylases. *J Biol Chem*. 2001; 276(20): 16992–7.
  104. Arad G, Hendel A, Urbanke C, Curth U, Livneh Z. Single-stranded DNA-binding protein recruits DNA polymerase V to primer termini on RecA-coated DNA. *J Biol Chem*. 2008; 283: 8274–8282.
  105. Shereda R, Bernstein D, Keck J. A central role for SSB in *Escherichia coli* RecQ DNA helicase function. *J Biol Chem*. 2007; 282: 19247–19258.
  106. Lecointe F, Sérène C, Velten M, Costes A, McGovern S, Meile JC, et al. Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *EMBO J*. 2007; 26(19): 4239–51.
  107. Hobbs MD, Sakai A, Cox MM. SSB protein limits RecOR binding onto single-stranded DNA. *J Biol Chem*. 2007; 282(15): 11058–67.
  108. Cadman CJ, McGlynn P. PriA helicase and SSB interact physically and functionally. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(21): 6378–87.
  109. Webster G, Genschel J, Curth U, Urbanke C, Kang C, Hilgenfeld R. A common core for binding single-stranded DNA: structural comparison of the single-stranded DNA-binding proteins (SSB) from *E. coli* and human mitochondria. *FEBS Lett*. 1997; 411(2-3): 313–316.
  110. Wadsworth R, White M. Identification and properties of the crenarchaeal single-stranded DNA binding protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(4): 914–920.
  111. Rolfsmeier M, Haseltine C. The Single-Stranded DNA Binding Protein of *Sulfolobus solfataricus* Acts in the Presynaptic Step of Homologous Recombination. *J Mol Biol*. 2010; 397: 31–45.
  112. Kerr ID, Wadsworth RIM, Cubeddu L, Blankenfeldt W, Naismith JH, White MF. Insights into ssDNA recognition by the OB fold from a structural and thermodynamic study of *Sulfolobus* SSB protein. *EMBO J*. 2003; 22(11): 2561–70.
  113. Jędrzejczak R, Dauter M, Dauter Z, Olszewski M, Długołęcka A, Kur J. Structure of the single-stranded DNA-binding protein SSB from *Thermus aquaticus*. *Acta Crystallogr D*. 2006; 62: 1407–12.
  114. Fedorov R, Witte G, Urbanke C, Manstein DJ, Curth U. 3D structure of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA-binding protein gives insight into the functioning of SSB proteins. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(22): 6708–17.
  115. Eggington JM, Kozlov AG, Cox MM, Lohman TM. Polar destabilization of DNA duplexes with single-stranded overhangs by the *Deinococcus radiodurans* SSB protein. *Biochemistry*. 2006; 45(48): 14490–502.
  116. Filipkowski P, Kur J. Identification and properties of the *Deinococcus grandis* and *Deinococcus proteolyticus* single-stranded DNA binding proteins (SSB). *Acta Biochim Pol*. 2007; 54(1): 79–87.
  117. Filipkowski P, Koziatek M, Kur J. A highly thermostable, homodimeric single-stranded DNA-binding protein from *Deinococcus radiopugnans*. *Extremophiles*. 2006; 10(6): 607–14.
  118. Filipkowski P, Duraj-Thatte A, Kur J. Identification, cloning, expression, and characterization of a highly thermostable single-stranded-DNA-binding protein (SSB) from *Deinococcus murrayi*. *Protein Express Purif*. 2007; 53(1): 201–8.
  119. Filipkowski P, Duraj-Thatte A, Kur J. Novel thermostable single-stranded DNA-binding protein (SSB) from *Deinococcus geothermalis*. *Arch Microbiol*. 2006; 186(2): 129–37.
  120. Witte G, Urbanke C, Curth U. Single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*: a biophysical characterization. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(5): 1662–70.

121. Bernstein DA, Eggington JM, Killoran MP, Mistic AM, Cox MM, Keck JL. Crystal structure of the *Deinococcus radiodurans* single-stranded DNA-binding protein suggests a mechanism for coping with DNA damage. *P Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(23): 8575–80.
122. Fan J, Pavletich N. Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. *Gene Dev*. 2012; 26: 2337–2347.
123. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*. 1997; 66: 61–92.
124. Bochkarev A, Pfuetzner R, Edwards A, Frappier L. Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature*. 1997; 385: 176–181.
125. Iftode C, Daniely Y, Borowiec J. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Mol*. 1999; 34(3): 141–80.
126. Brill SJ, Bastin-Shanower S. Identification and Characterization of the Fourth Single-Stranded-DNA Binding Domain of Replication Protein A. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(12): 7225–7234.
127. Bochkarev A. Replication Protein A. CHARACTERIZATION AND CRYSTALLIZATION OF THE DNA BINDING DOMAIN. *J Biol Chem*. 1997; 272(1): 430–434.
128. Lin Y-L, Shivji M, Chen C, Kolodner R, Wood R, Dutta A. The Evolutionarily Conserved Zinc Finger Motif in the Largest Subunit of Human Replication Protein A Is Required for DNA Replication and Mismatch Repair but Not for Nucleotide Excision Repair. *J Biol Chem*. 1998; 273(3): 1453–1461.
129. Bujalowski W, Overman L, Lohman T. Binding mode transitions of *Escherichia coli* single strand binding protein-single-stranded DNA complexes. Cation, anion, pH, and binding density effects. *J Biol Chem*. 1988; 263(10): 4629–4640.
130. Lohman TM, Overman LB. Two Binding Modes in *Escherichia coli* Single Strand Binding Protein-Single Stranded DNA Complexes. *J Biol Chem*. 1985; 260(6): 3594–3603.
131. Kozlov AG, Lohman TM. *E. coli* SSB tetramer binds the first and second molecules of (dT)(35) with heat capacities of opposite sign. *Biophys Chem*. 2011; 159(1): 48–57.
132. Raghunathan S, Kozlov A, Lohman T, Waksman G. Structure of the DNA binding domain of *E. coli* SSB bound to ssDNA. *Nat Struct Biol*. 2000; 7(8): 648–652.
133. Kozlov A, Lohman T. Kinetic mechanism of direct transfer of *Escherichia coli* SSB tetramers between single-stranded DNA molecules. *Biochemistry*. 2002; 41: 11611–11627.
134. Hatch K, Danilowicz C, Coljee V, Prentiss M. Measurement of the salt-dependent stabilization of partially open DNA by *Escherichia coli* SSB protein. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(1): 294–9.
135. Bujalowski W, Lohman TM. *Escherichia coli* single-strand binding protein forms multiple, distinct complexes with single-stranded DNA. *Biochemistry*. 1986; 25(24): 7799–7802.
136. Lohman T, Bujalowski W. Effects of base composition on the negative cooperativity and binding mode transitions of *Escherichia coli* SSB-single-stranded DNA complexes. *Biochemistry*. 1994; 33: 6167–6176.
137. Pestryakov PE, Lavrik OI. Mechanisms of single-stranded DNA-binding protein functioning in cellular DNA metabolism. *Biochemistry-Moscow*. 2009; 73(13): 1388–1404.
138. Bujalowski W, Lohman T. Negative co-operativity in *Escherichia coli* single strand binding protein-oligonucleotide interactions: I. Evidence and a quantitative model. *J Mol Biol*. 1989; 207(1): 249–268.
139. Curth U, Greipel J, Urbanke C, Maass G. Multiple binding modes of the single-stranded DNA binding protein from *Escherichia coli* as detected by tryptophan fluorescence and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. 1993; 32(10): 2585–91.
140. Khamis M, Casas-Finet J, Maki A. Investigation of the role of individual tryptophan residues in the binding of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein to single-stranded polynucleotides. *J Biol Chem*. 1987; 262(23): 10938–10945.
141. Merrill B, Williams K, Chase J, Konigsberg W. Photochemical cross-linking of the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein to oligodeoxynucleotides. Identification of phenylalanine 60 as the site of. *J Biol Chem*. 1984; 259(17): 10850–10856.

142. Casas-Finet J, Khamis M, Maki A, Chase J. Tryptophan 54 and phenylalanine 60 are involved synergistically in the binding of *E. coli* SSB protein to single-stranded polynucleotides. *FEBS Lett.* 1987; 220(2): 347–352.
143. Bayer I, Fliess A, Greipel J, Urbanke C, Maass G. Modulation of the affinity of the single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli* (*E. coli* SSB) to poly (dT) by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem.* 1989; 179(2): 399–404.
144. Bujalowski W, Lohman TM. Negative co-operativity in *Escherichia coli* single strand binding protein-oligonucleotide interactions. II. Salt, temperature and oligonucleotide length effects. *J Mol Biol.* 1989; 207(1): 269–288.
145. Overman L, Bujalowski W, Lohman T. Equilibrium binding of *Escherichia coli* single-strand binding protein to single-stranded nucleic acids in the (SSB)65 binding mode. Cation and anion effects and polynucleotide specificity. *Biochemistry.* 1988; 27(1): 456–471.
146. Chen J, Smith D, Griep M. The role of the 6 lysines and the terminal amine of *Escherichia coli* single-strand binding protein in its binding of single-stranded DNA. *Protein Sci.* 1998;7(8):1781–1788.
147. Chase J, L'italien J, Murphy J, Spicer E, Williams K. Characterization of the *Escherichia coli* SSB-113 mutant single-stranded DNA-binding protein. Cloning of the gene, DNA and protein sequence analysis, high pressure liquid chromatography peptide mapping, and DNA-binding studies. *J Biol Chem.* 1984; 259: 805–814.
148. Bochkareva E, Korolev S, Lees-Miller SP, Bochkarev A. Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J.* 2002; 21(7): 1855–63.
149. Bochkareva E, Belegu V, Korolev S, Bochkarev A. Structure of the major single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. *EMBO J.* 2001; 20: 612–618.
150. Lavrik O, Kolpashchikov D, Weisshart K, Nasheuer H, Khodyreva S, Favre A. RPA subunit arrangement near the 3'-end of the primer is modulated by the length of the template strand and cooperative protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(21): 4235–4240.
151. Bastin-Shanower SA, Brill SJ. Functional analysis of the four DNA binding domains of replication protein A. The role of RPA2 in ssDNA binding. *J Biol Chem.* 2001; 276(39): 36446–53.
152. Pestryakov P, Weisshart K, Schlott B, Khodyreva S, Kremmer E, Grosse F, et al. Human Replication Protein A THE C-TERMINAL RPA70 AND THE CENTRAL RPA32 DOMAINS ARE INVOLVED IN THE INTERACTIONS WITH THE 3'-END OF A PRIMER-TEMPLATE. *J Biol Chem.* 2003; 278: 17515–17524.
153. Pestryakov P, Krasikova Y. The role of p14 subunit of replication protein A in binding to single-stranded DNA. *Dokl Biochem Biophys.* 2007; 412(1): 4–7.
154. Oka A, Sugimoto K, Takanami M, Hirota Y. Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: the size and structure of the minimum DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol Gen Genet.* 1980; 178(1): 9–20.
155. Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A. The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell.* 1984; 38(3): 889–900.
156. Matsui M, Oka A, Takanami M, Yasuda S, Hirota Y. Sites of dnaA protein-binding in the replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Mol Biol.* 1985; 184(3): 529–533.
157. Baker TA, Wickner SH. Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet.* 1992; 26: 447–77.
158. Bakker A, Smith DW. Methylation of GATC sites is required for precise timing between rounds of DNA replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989; 171(10): 5738–5742.
159. Bramhill D, Kornberg A. Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell.* 1988; 52(5): 743–755.
160. Funnell BE, Baker TA, Kornberg A. In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* 1987; 262(21): 10327–10334.
161. Sekimizu K, Bramhill D, Kornberg A. Sequential early stages in the in vitro initiation of replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* 1988; 263(15): 7124–7130.

162. Wahle E, Lasken R, Kornberg A. The dnaB-dnaC replication protein complex of *Escherichia coli*. I. Formation and properties. *J Biol Chem*. 1989; 264(5): 2463–2468.
163. Wahle E, Lasken R, Kornberg A. The dnaB-dnaC replication protein complex of *Escherichia coli*. II. Role of the complex in mobilizing dnaB functions. *J Biol Chem*. 1989; 264(5): 2469–2475.
164. Wickner S, Hurwitz J. Interaction of *Escherichia coli* dnaB and dnaC(D) Gene Products *in vitro*. *P Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(3): 921–925.
165. Benz E, Reinberg D, Vicuna R, Hurwitz J. Initiation of DNA replication by the dnaG protein. *J Biol Chem*. 1980; 255(3): 1096–1106.
166. Węgleński P. Genetyka molekularna. Warszawa, 2006. Wydawnictwo Naukowe PWN.
167. Baj J, Markiewicz Z. Biologia molekularna bakterii. Warszawa, 2006. Wydawnictwo Naukowe PWN.
168. [http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large\\_fig/c\\_fig07\\_02.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/c_fig07_02.html)
169. Biswas EE, Chen P, Biswas S. Modulation of enzymatic activities of *Escherichia coli* DnaB helicase by single-stranded DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(13): 2809–2816.
170. LeBowitz JH, McMacken R. The *Escherichia coli* dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem*. 1986; 261(10): 4738–4748.
171. Arai K, Kornberg A. Mechanism of dnaB protein action. II. ATP hydrolysis by dnaB protein dependent on single-or double-stranded DNA. *J Biol Chem*. 1981; 256(10): 5253–5259.
172. Canceill D, Viguera E, Ehrlich S. Replication Slippage of Different DNA Polymerases Is Inversely Related to Their Strand Displacement Efficiency. *J Biol Chem*. 1999; 274(39): 27481–27490.
173. Rigler M, Romano L. Differences in the Mechanism of Stimulation of T7 DNA Polymerase by Two Binding Modes of *Escherichia coli* Single-stranded DNA-binding Protein. *J Biol Chem*. 1995; 270(15): 8910–8919.
174. Romano LJ, Richardson CC. Requirements for synthesis of ribonucleic acid primers during lagging strand synthesis by the DNA polymerase and gene 4 protein of bacteriophage T7. *J Biol Chem*. 1979; 254(20): 10476–10482.
175. Myers TW, Romano LJ. Mechanism of stimulation of T7 DNA polymerase by *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (SSB). *J Biol Chem*. 1988; 263(32): 17006–17015.
176. Szuts D, Kitching L, Christov C, Budd A, Peak-Chew S. RPA is an initiation factor for human chromosomal DNA replication. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(6): 1725–1734.
177. Cui S, Klima R, Ochem A, Arosio D, Falaschi A, Vindigni A. Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein A. *J Biol Chem*. 2003; 278(3): 1424–32.
178. Brown T. Genomy. Warszawa, 2009. Wydawnictwo Naukowe PWN.
179. Kowalczykowski S, Dixon D, Eggleston A, Lauder S, Rehrauer W. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1994; 58(3): 401–465.
180. Cox MM, Soltis DA, Livneh Z, Lehman IR. On the role of single-stranded DNA binding protein in recA protein-promoted DNA strand exchange. *J Biol Chem*. 1983; 258(4): 2577–2585.
181. Cox M, Lehman I. RecA protein of *Escherichia coli* promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange. *P Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(6): 3433–3437.
182. Cox M, Lehman I. Directionality and polarity in recA protein-promoted branch migration. *P Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(10): 6018–6022.
183. Egglar AL, Lusetti SL, Cox MM. The C terminus of the *Escherichia coli* RecA protein modulates the DNA binding competition with single-stranded DNA-binding protein. *J Mol Biol*. 2003; 278(18): 16389–96.
184. Umezu K, Chi N, Kolodner R. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *P Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(9): 3875–3879.

185. Umezu K, Kolodner R. Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*. 1994; 269(47): 30005–30013.
186. Roy R, Kozlov AG, Lohman TM, Ha T. SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation. *Nature*. 2009; 461(7267): 1092–7.
187. Parsons C, Stasiak A, West S. The *E. coli* RuvAB proteins branch migrate Holliday junctions through heterologous DNA sequences in a reaction facilitated by SSB. *EMBO J*. 1995; 14(22): 5736–5744.
188. Umezu K, Nakayama H. RecQ DNA Helicase of *Escherichia coli*: Characterization of the Helix-unwinding Activity with Emphasis on the Effect of Single-stranded DNA-binding Protein. *J Mol Biol*. 1993; 230(4): 1145–1150.
189. Han E, Cooper D, Persky N, Sutera V, Whitaker R, Montello M, et al. RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(4): 1084–1091.
190. Lieberman H, Witkin E. DNA degradation, UV sensitivity and SOS-mediated mutagenesis in strains of *Escherichia coli* deficient in single-strand DNA binding protein: effects of mutations and treatments that alter levels of Exonuclease V or recA protein. *Mol Gen Genet*. 1983; 190(1): 92–100.
191. Meyer R, Laine P. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1990; 54: 342–380.
192. Shinagawa H. SOS response as an adaptive response to DNA damage in prokaryotes. *EXS*. 1995; 77: 221–235.
193. O'Reilly E, Kreuzer K. Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004; 186(21): 7149–7160.
194. Sarov-Blat L, Livneh Z. The mutagenesis protein MucB interacts with single strand DNA binding protein and induces a major conformational change in its complex with single-stranded DNA. *J Biol Chem*. 1998; 273: 5520–5527.
195. Friedberg E. DNA damage and repair. *Nature*. 2003; 421: 436–440.
196. Truglio J, Croteau D, Van Houten B, Kisker C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev*. 2006; 106: 233–253.
197. Zhou R, Kozlov AG, Roy R, Zhang J, Korolev S, Lohman TM, et al. SSB functions as a sliding platform that migrates on DNA via reptation. *Cell*. 2011; 146(2): 222–32.
198. Wang H, Lu M, Tang M, Van Houten B, Ross A, Weinfeld M, et al. DNA wrapping is required for DNA damage recognition in the *Escherichia coli* DNA nucleotide excision repair pathway. *P Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(31): 12849–12854.
199. Modrich P. Methyl-directed DNA mismatch correction. *J Biol Chem*. 1989; 264(12): 6597–6600.
200. Lahue R, Au K, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*. 1989; 245: 160–164.
201. Su S, Modrich P. *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *P Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(14): 5057–5061.
202. Cooper D, Lahue R, Modrich P. Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem*. 1993; 268(16): 11823–11829.
203. Grilley M, Griffith J, Modrich P. Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem*. 1993; 268: 11830–11837.
204. Lu A, Welsh K, Clark S, Su S, Modrich P. Repair of DNA base-pair mismatches in extracts of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Sym*. 1984; 49: 589–596.
205. <http://www.genome.jp/kegg/pathway/ecc/ecc03430.png>
206. Purnapatre K, Handa P, Venkatesh J, Varshney U. Differential effects of single-stranded DNA binding proteins (SSBs) on uracil DNA glycosylases (UDGs) from *Escherichia coli* and mycobacteria. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(17): 3487–3492.

207. Lindner C, Nijland R, van Hartkamp M, Bron S, Hamoen LW, Kuipers OP. Differential Expression of Two Paralogous Genes of *Bacillus subtilis* Encoding Single-Stranded DNA Binding Protein. *J Bacteriol.* 2004; 186(4): 1097–1105.
208. Attaiech L, Olivier A, Mortier-Barrière I, Soulet A-L, Granadel C, Martin B, et al. Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity. *PLoS Genet.* 2011; 7(6): e1002156.
209. Kur J, Olszewski M, Długołęcka A, Filipkowski P. Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs)-sources and applications in molecular biology. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52(3): 569–574.
210. Rapley R. Enhancing PCR amplification and sequencing using DNA-binding proteins. *Mol Biotechnol.* 1994; 2(3): 295–8.
211. Dąbrowski S, Kur J. Cloning, overexpression, and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. *Protein Expres Purif.* 1999; 16: 96–102.
212. Schwarz K, Hansen-Hagge T, Bartram C. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(4): 1079.
213. Perales C, Cava F, Meijer WJJ, Berenguer J. Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(22): 6473–6480.
214. Olszewski M, Rebała K, Szczerkowska Z, Kur J. Application of SSB-like protein from *Thermus aquaticus* in multiplex PCR of human Y-STR markers identification. *Mol Cell Probe.* 2005; 19(3): 203–5.
215. Pawłowski R, Dettlaff-Kakol A, Maciejewska A, Paszkowska R, Reichert M, Jezierski G. Population genetics of 9 Y-chromosome STR loci w Northern Poland. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii.* 2002; 52(4): 261–77.
216. Myers T, Gelfand D. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 1991; 30: 7661–7666.
217. Drabovich A, Krylov SN. Single-stranded DNA-binding protein facilitates gel-free analysis of polymerase chain reaction products in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2004; 1051(1-2): 171–175.
218. Berezovski M, Krylov SN. Using DNA-binding proteins as an analytical tool. *J Am Chem Soc.* 2003; 125(44): 13451–4.
219. Ishizuka T, Komiyama M. Single-strand binding protein enhances invasion of a PNA strand to double-stranded DNA. *Nucl Acid S.* 2008; 52: 141–2.
220. Shakeel S, Karim S, Ali A. Peptide nucleic acid (PNA)—a review. *J Chem Technol Biot.* 2006; 81: 892–899.
221. Uhlmann E, Peyman A, Breipohl G, Will D. PNA: synthetic polyamide nucleic acids with unusual binding properties. *Angew Chem Int Edit.* 1998; 37: 2796–2823.
222. Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem.* 2000; 286(2): 282–8.
223. Gharizadeh B, Akhras M, Nourizad N, Ghaderi M, Yasuda K, Nyrén P, et al. Methodological improvements of pyrosequencing technology. *J Biotechnol.* 2006; 124(3): 504–11.
224. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* 2006; 363(1-2): 83–94.
225. Sharon M. Pyrosequencing Protocols. New Jersey, 2006 Humana Press.
226. Sambrook J, Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. New York, 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
227. Schwarz G, Watanabe F. Thermodynamics and kinetics of co-operative protein-nucleic acid binding: I. General aspects of analysis of data. *J Mol Biol.* 1983; 163(3): 467–84.

228. Chilukuri LN, Bartlett DH. Isolation and characterization of the gene encoding single-stranded-DNA-binding protein (SSB) from four marine *Shewanella* strains that differ in their temperature and pressure optima for growth. *Microbiology*. 1997; 143: 1163–74.
229. Reddy MS, Guhan N, Muniyappa K. Characterization of single-stranded DNA-binding proteins from Mycobacteria. The carboxyl-terminal of domain of SSB is essential for stable association with its cognate RecA protein. *J Biol Chem*. 2001; 276(49): 45959–68.
230. Witte G, Fedorov R, Curth U. Biophysical analysis of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA binding protein. *Biophys J*. 2008; 94(6): 2269–79.
231. Kozlov AG, Eggington JM, Cox MM, Lohman TM. Binding of the dimeric *Deinococcus radiodurans* single-stranded DNA binding protein to single-stranded DNA. *Biochemistry*. 2010; 49(38): 8266–75.
232. Vries J, Genschel J, Urbanke C, Thole H, Wackernagel W. The Single-stranded-DNA-binding Proteins (SSB) of *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*. *Eur J Biochem*. 1994; 224(2): 613–622.
233. Olszewski M, Mickiewicz M, Kur J. Two highly thermostable paralogous single-stranded DNA-binding proteins from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Arch Microbiol*. 2008; 190(1): 79–87.
234. Witte G, Fedorov R, Curth U. Biophysical analysis of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA binding protein. *Biophys J*. 2008; 94(6): 2269–79.