

Iwona Mruk

**Katedra Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański**

AUTOREFERAT

Gdańsk 2013

1. IMIĘ, NAZWISKO, ADRES DO KORESPONDENCJI

dr Iwona Mruk

Katedra Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
tel. 58-5236071
shamrock127@hotmail.com

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

październik 2004 **stopień doktora nauk biologicznych** w zakresie biologii
Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu
Gdańskiego (obecnie Wydział Biologii)

Tytuł rozprawy doktorskiej: "Struktura genetyczna i właściwości systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoVIII i jego izospecyficznych homologów".

Promotor – Prof. dr hab. Tadeusz Kaczorowski

Praca uzyskała wyróżnienie Rady Wydziału oraz Prezesa Rady Ministrów RP.

lipiec 1998 **tytuł magistra biotechnologii** w zakresie biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu
Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku.

Stypendium w ramach **programu TEMPUS**, Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, United Kingdom, od września 1996 do marca 1997.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

Od lutego 2005 adiunkt w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego

Od listopada 2005 do stycznia 2009 staż w laboratorium Prof. Roberta Blumenthala, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Toledo, Toledo, Ohio, USA

Od września 2000 do lutego 2005 asystent w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Gdańskiego

Od września 1998 do września 2000 uczestnik Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii, Uniwersytetu Gdańskiego

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO* WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST.2 Z DNIA 14 MARCA 2003 O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

* W PRZYPADKU, GDY OSIĄGNIĘCIEM TYM JEST PRACA/PRACE WSPÓLNE, NALEŻY PRZEDSTAWIĆ OŚWIADCZENIA WSZYSTKICH JEJ WSPÓLAUTORÓW, OKREŚLAJĄCE INDYWIDUALNY WKŁAD KAŻDEGO Z NICH W JEJ POWSTANIE (ZAŁĄCZNIK 5)

Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny stanowi monotematyczny cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych oraz jednej przeglądowej pod tytułem:

„Regulacja ekspresji bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II”.

1. **Mruk I.,** Rajesh P., Blumenthal R.M.: Regulatory circuit based on autogenous activation-repression: roles of C boxes and spacer sequences in control of the PvuII restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **35 (2007)** 6935-6952
(IF₂₀₀₇ =6,954; MNiSW₂₀₁₂ = 40)
2. **Mruk I.,** Blumenthal R.M.: Real-time kinetics of restriction-modification gene expression after entry into a new host cell. *Nucleic Acids Res.* **36 (2008)** 2581-93
(IF₂₀₀₈ =6,878; MNiSW₂₀₁₂ = 40)
3. **Mruk I.,** Blumenthal R.M.: Tuning the relative affinities for activating and repressing operators of a temporally regulated restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **37 (2009)** 983-98
(IF₂₀₀₉ =7,479; MNiSW₂₀₁₂ = 40)

4. **Mruk I.***, Liu Y.*, Ge L., Kobayashi I.: Regulation of a restriction-modification system by an antisense RNA. *Nucleic Acids Res.* **39** (2011) 5622-32

(IF₂₀₁₁ = **8,026**; MNiSW₂₀₁₂ = **40**)

*autorzy równorzędni

5. **Mruk I.** and Kobayashi I.: To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res.* (2013) 1-17

doi10.1093/nar/gkt711

(IF₂₀₁₂ = **8,278**; MNiSW₂₀₁₂ = **40**)

Omówienie osiągnięć naukowych przedłożonych do oceny

„Regulacja ekspresji bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II”.

Adaptacja mikroorganizmów do zmieniających się warunków środowiska często możliwa jest dzięki pozyskiwaniu nowych cech poprzez horyzontalny transfer genów. Mechanizmy przepływu materiału genetycznego pomiędzy bakteriami i czynniki ułatwiające pokonywanie barier międzygatunkowych są ciągle słabo poznane, mimo lepszego rozumienia samych procesów transferu genów na drodze transdukcji, transformacji, czy koniugacji. Ma to kluczowe znaczenie dla tak ważnych aspektów życia i zdrowia człowieka, jak chociażby problem rozprzestrzeniania się bakteryjnych czynników wirulencji, wysp patogenności, czy determinant oporności na antybiotyki.

Jednym z czynników odgrywających znaczną rolę w wymianie genetycznej pomiędzy bakteriami są **systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M)**. Ograniczają one znacznie napływ obcego DNA do komórek ich gospodarza poprzez restrykcję wnikającego DNA, czego przykładem jest ochrona przed wirulentnymi bakteriofagami. Uważa się również, że w pewnych warunkach pofragmentowane DNA staje się bardziej rekombinogenne i może zostać zintegrowane z genomem gospodarza przyczyniając się w ten sposób do zróżnicowania materiału genetycznego. Wiele systemów R-M jest kodowanych na plazmidowym DNA, ale nawet te zlokalizowane na chromosomowym DNA mogą zostać przeniesione do innych bakterii poprzez horyzontalny transfer genów. Do dziś odkryto ponad 3800 różnych systemów R-M, a

ponad 50% *Bacteria* i *Archaea* posiada przynajmniej jeden system z czterech wyróżnionych typów systemów R-M. Niektóre bakterie, jak *Helicobacter pylori* czy *Neisseria gonorrhoeae* posiadają ich dziesiątki, stając się bardzo trudne do manipulacji genetycznych.

Typ II systemów R-M, w przeciwieństwie do typu I czy III, stanowi najprostszy system, gdzie miejsca interakcji z DNA są ściśle zdefiniowane i wysoce specyficzne. Na system R-M typu II składają się aktywności dwóch niezależnych enzymów specyficznym rozpoznających tę samą sekwencję w obrębie DNA: **endonukleazy restrykcyjnej (ENazy)** oraz **metylotransferazy DNA (MTazy)**, której rola polega na ochronie komórkowego DNA przed degradacją przez pokrewną ENazę. Obie przeciwstawne aktywności (**jak toksyna i antytoksyna**) muszą podlegać procesom ścisłej regulacji na poziomie komórkowym w sposób niezależny od białek gospodarza, nie tylko by chronić genomowy DNA przed autodegradacją, ale także by umożliwić transfer systemów R-M do wnętrza bakterii. Ma to istotne znaczenie ze względu na toksyczność endonukleaz restrykcyjnych dla bakterii. Zrównoważenie tych dwóch procesów – restrykcji i modyfikacji jest kluczowe dla komórki bakteryjnej, gdyż przewaga aktywności restrykcyjnej zawsze prowadzi do śmierci komórki.

Aktywność modyfikacyjna jest swoistym antidotum w stosunku do endonukleazy restrykcyjnej. Jest ona szczególnie ważna podczas replikacji bakteryjnego DNA, kiedy nowosyntetyzowana nić może stać się celem ataku endonukleaz restrykcyjnych. Jest to możliwe dzięki precyzyjnej regulacji ekspresji genów kodujących obydwie enzymy, która nie może wynikać z samej tylko różnicy efektywności promotorów dla niezależnych genów ENazy i MTazy. Do tej pory wyróżniono kilka schematów regulacji aktywności systemów R-M. Wszystkie one dotyczą zasadniczo etapu transkrypcji. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą frakcji systemów R-M typu II, które posiadają trzeci komponent - białko regulatorowe C (C- controller), wyspecjalizowane do precyzyjnego kontrolowania ekspresji genów R-M.

Systemy R-M są niezwykle mobilne. Celem mojego pierwszego projektu było zbadanie, **jak system R-M stabilizuje się w nowym gospodarzu** i jak zmienia się ekspresja genów systemu R-M w trakcie ich transferu pełnego systemu do nowego gospodarza, którego DNA jest narażone na cięcie przez wnikającą toksyczną endonukleazę DNA. Jest oczywiste, że podczas takiego transferu mechanizmy regulacyjne muszą zapewnić przeżycie gospodarza poprzez opóźnienie pojawienia się aktywności restrykcyjnej. W trakcie tego opóźnienia MTaza musi ukończyć modyfikację genomowego DNA. Takie teoretyczne rozważania nigdy wcześniej nie były poparte szczegółowymi badaniami eksperymentalnymi. Zajął się tym problemem

[praca nr2]. Jako model dla transferu wybrałam łagodnego bakteriofaga M13 jako nośnika systemu R-M PvuII z białkiem regulatorowym C. Transfer metodą transformacji, czy koniugacji odrzuciłam, gdyż dawał małe szanse na precyzyjne monitorowanie ekspresji genów w czasie. Najpierw zoptymalizowałam infekcję komórek *E. coli* zrekombinowanymi fagami M13 w hodowli płynnej, by uzyskać maksymalną efektywność zakażenia. Fagi M13 nie dokonują lizy komórek. Fagi potomne uwalniane są stale poza komórkę i towarzyszy temu spowolnienie dynamiki podziałów komórek. Zbadałam wstępnie, jaki jest poziom ekspresji genów kontrolnych w komórkach *E. coli* np. genu fagowego gVIII oraz klonowanego do DNA faga genu *cat*. Zaobserwowałam, że transkrypty pochodzące z genów fagowych są wykrywane już w kilka minut po infekcji, a po 15-20 minutach można wykrywać aktywność produktów genów kontrolnych. We właściwym eksperymencie, do komórek *E. coli* w fazie logarytmicznej wzrostu dodawałam zrekombinowane fagi M13, niosące geny systemu R-M PvuII typu dzikiego (C+R+M+) lub kontrolnie z nieaktywnym wariantem genu C (C-R+M+). Co 5 minut pobierałam próbki hodowli w czasie do badania kinetyki: a) relatywnej ilości transkryptów; b) aktywności enzymatycznej ENazy c) poziomu zmetylowania genomu gospodarza. Wykazałam, że istotnie poziom mRNA genu MTazy zaczął gwałtownie wzrastać ok. 20 minut po infekcji fagowej, a wzrost ilości mRNA dla genu ENazy ujawnił się ok. 10 min. później. Różnice w relatywnej ilości mRNA MTazy w stosunku do ENazy wynoszą ok. 5:1 i poziom ten osiągany jest ok. 45 min po infekcji. Jest on porównywalny z poziomami stężeń mRNA dla komórek z ustabilizowanym systemem R-M PvuII, które badałam w niezależnym eksperymencie. Czas ten zatem uważam za „koniec fazy instalacji” systemu dla badanego systemu. Następnie analizowałam, czy obserwowane opóźnienie ujawnia się też w aktywności produktów genów MTazy i ENazy. Badałam poziom zmetylowania DNA w losowych miejscach na genomie *E. coli* i wykazałam, że istotnie ok. 25 min po infekcji obserwowałam obecność metylacji. Podobnie aktywność ENazy wykrywana była w lizatach komórkowych ok. 35 min po infekcji. W układzie z nieaktywnym wariantem genu C, wzrost ekspresji MTazy nastąpił później i nie obserwowałam wzrostu ekspresji genu ENazy. Jest to zgodne z oczekiwaniem, gdyż bicistronowy transkrypt dla C i ENazy jest pod kontrolą promotora i operatora genu C.

Aby zbadać udział białka C w generowaniu opóźnienia ekspresji ENazy, wykonałam eksperyment, w którym komórki *E. coli* wytwarzające białko C konstytutywnie (pod kontrolą naturalnego promotora), zakażano bakteriofagiem M13 niosącym dziki typ systemu R-M PvuII. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że pre-ekspresja białka C w komórkach uniemożliwia

transformację komórek *E. coli* plazmidem niosącym dziki typ systemu R-M PvuII, na skutek przedwczesnej indukcji ekspresji ENazy, która degradowała genom i w efekcie zabijała komórki. Ja również zaobserwowałam znaczną redukcję w wydajności zakażenia fagiem dla takiego układu w przeciwieństwie do komórek kontrolnych pozbawionych genu C.

Równolegle szukałam odpowiedzi na pytanie, **jaki jest molekularny mechanizm indukcji i kontroli aktywności ENazy przez białko C**. Najpierw skupiłam się na analizie elementów regulatorowych operatora genu C i podległego mu genu ENazy [**praca nr1**]. Organizacja genetyczna wielu genów C ujawnia obecność zakonserwowanego elementu, zwanego C-box, położonego przed genem C, który nakłada się na sekwencję dwóch promotorów: słabego (niezależnego od białka C) oraz silnego (C-zależnego). Sama struktura C-boxu dzieli geny C na kilka rodzin, a C-box genu *pvuIIC* zalicza się do najpowszechniej występujących. Wiadome było, że białko C.PvuII posiadające charakterystyczny dla białek oddziaływujących z DNA motyw H-T-H (ang.: helix-turn-helix), wiąże się do rejonu C-box obecnego w promotorze operonu dla własnego genu *pvuIIC* oraz genu endonukleazy *pvuIIR*. Na podstawie zestawienia wielu sekwencji rejonu C-box z różnych systemów ustalono, że sekwencja consensus jest palindromowa z dwoma parami odwrotnych powtórzeń mogącymi wiązać dwa dimery białka C (5'-GACT – AGTC – GACT – AGTC-3'). Poprzez wykonanie szeregu eksperymentów *in vivo* oraz *in vitro* ustaliłam, że tzw. operator lewy (O_L) związany jest z aktywacją transkrypcji i jest wystarczający do indukcji silnego promotora C-zależnego. Natomiast tzw. operator prawy (O_R) odpowiada za represję transkrypcji. Operator dzikiego typu różni się od sekwencji consensus dwoma zmianami nukleotydu (5'-TACT – AGTC – GATT – AGTC-3'). Zbadałam, że pomimo użycia w eksperymencie C-boxa o symetrycznej budowie, białko C nadal wiąże się do O_L z większym powinowactwem niż do O_R . Może to świadczyć o tym, że za wiązanie się białka C odpowiedzialna jest sama budowa tego rejonu, sekwencje łącznikowe lub flankujące, które warunkują optymalne przełączanie trybu transkrypcji: aktywacja/represja. Ponadto wykazałam, że to wiązanie się do DNA jest ściśle kooperatywne. Zbadałam, że mutacja w obrębie O_R (brak funkcji represji białka C) w kontekście całego systemu R-M PvuII prowadzi do znacznego obniżenia „instalowania się” tego systemu w nowym gospodarzu. Dzieje się to najprawdopodobniej na skutek zaburzenia działania sprzężenia zwrotnego (aktywacja-represja).

Niedawno poznano strukturę kryształu dla homologa C.PvuII, białka C.Esp1396I wraz z rejonem operatorowym (McGeehan i inni, 2008). Otrzymano tetramer, gdzie dwa dimery zajmują przeciwległe domeny tej samej sekwencji DNA. Zupełnym zaskoczeniem był jednak

brak bezpośrednich oddziaływań między resztami aminokwasowymi białka C w obrębie krótkich odwróconych powtórzeń sekwencji „consensus” GACT/AGTC. Oddziaływania zaobserwowano natomiast w łącznikach (tzw. ang. spacer) regionu C-box i zaproponowano alternatywną symetrię rozpoznawania operatora DNA dla białek C poprzez sekwencje łączników „TATA” (McGeehan i inni, 2008). Postanowiłam zbadać, **jaka jest rola tych rejonów łącznikowych w operatorze** na modelu białka C.PvuII oraz operatora C-box z symetrycznymi sekwencjami consensus w badaniach *in vivo* oraz *in vitro* [**praca nr 3**]. Wykazałam, że w przeciwieństwie do wyników analizy kryształu C.Esp1396I, mutacja tej kluczowej sekwencji „TATA” na „CGCA” nie prowadzi do zaburzenia wiązania się C.PvuII do tak zmienionego operatora w badaniach *in vitro*. Wykazałam, że ich rola, a w szczególności w obrębie O_L, polega na modulacji powinowactwa C.PvuII do C-boxu w zależności od kombinacji sekwencyjnej 3-nt. W pewnych wariantach sekwencji powinowactwo jest wyższe niż w typie dzikim i prowadzi do włączenia się C-zależnej aktywności transkrypcyjnej w niższych stężeniach białka C niż w typie dzikim. Skutkuje to do zbyt wczesną ekspresją genu endonukleazy restrykcyjnej. W testach biologicznych z użyciem pełnego systemu R-M na plazmidzie wykazałam, że z powodu tak zmienionych sekwencji operatora, system nie może się zainstalować w komórce, gdyż aktywność endonukleazy restrykcyjnej pojawia się zanim zakończy się proces modyfikacji DNA. Prowadzi to do śmierci komórki gospodarza. Z badań tych wynika, że dla mobilnych systemów R-M zależnych od regulatora C, utrzymanie optymalnej sekwencji operatora C-box, a także optymalnego wiązania białka C, jest jednym z ważnych elementów, które decydują o równowadze w aktywności systemów R-M, a tym samym o utrzymaniu się komórki gospodarza przy życiu.

Badania nad regulacją systemów R-M przy udziale regulatorowego białka C wykonywałam w laboratorium Prof. Roberta Blumenthala na Uniwersytecie w Toledo, Ohio, USA w ramach stażu podoktorskiego.

Równolegle do badań regulacji aktywności z wyspecjalizowanym genem C, interesowało mnie, jak w innych systemach R-M bez tego genu przebiega kontrola ekspresji ENazy i MTazy. Zwłaszcza ciekawy wydawał mi się system R-M EcoRI, gdzie w obrębie operonu, gen toksycznej ENazy poprzedzał gen MTazy. Taki układ nie występuje często w organizacji genów systemów R-M. Do współpracy w badaniach zostałam zaproszona przez Prof. Ichizo Kobayashi z Uniwersytetu w Tokio. Spędziłam w jego laboratorium w sumie 6 miesięcy, które zaowocowały pracą eksperymentalną [**praca 4**], a potem przygotowaniem pracy przeglądowej [**praca 5**].

W obrębie operonu EcoRI zidentyfikowano kilka promotorów związanych z genem endonukleazy: główny promotor P_R dla obu genów ENazy i MTazy, tandem promotorów P_{M1} i P_{M2} dla genu MTazy, a także parę promotorów P_{REV1} i P_{REV2} zlokalizowanych na komplementarnej nici DNA przeciwstawnie do promotora P_R (Liu i inni, 2007; Liu & Kobayashi, 2007). Postanowiłam zbadać, **jak poszczególne promotory wpływają na ekspresję i funkcjonowanie systemu EcoRI [praca nr 4]**. W trakcie moich badań udało się potwierdzić obecność kolejnego promotora P_{REV0} przeciwnie zorientowanego do promotorów P_{M1} i P_{M2} dla genu MTazy. W sumie operon systemu EcoRI składa się z co najmniej sześciu funkcjonalnych promotorów przez co sieć zależności regulacyjnych jest bardzo złożona. Udało mi się wykazać w operonie obecność dwóch „pętli” regulatorowych o negatywnym sprzężeniu zwrotnym (ang. negative feed-back loop), gdzie w jednej z nich ekspresja MTazy z promotorów P_{M1} i P_{M2} jest negatywnie regulowana poprzez transkrypcję z promotora P_{REV0} , podobnie jak w drugiej pętli ekspresja z głównego promotora P_R jest negatywnie regulowana przez parę promotorów P_{REV1} i P_{REV2} . Ponadto, produktem transkrypcji z promotora P_{REV0} jest krótki 88 nt antysensowny RNA. Postanowiłam zbadać, jak inaktywacja promotora P_{REV0} wpływa na funkcjonowanie całego operonu EcoRI. Okazało się, że pełna inaktywacja nie jest możliwa i nie udało mi się otrzymać żywotnych komórek. Jednakże, gdy obniżyłam aktywność tego promotora do jednej trzeciej jego normalnej aktywności to komórki niosące taki wariant systemu EcoRI były żywe, a poziom względnej restrykcyjności wskazał na wzrost ekspresji ENazy ponad 8-razy. Druga ciekawa obserwacja dotyczy aktywności antysensownego RNA *in trans* na obniżenie zjawiska tzw. śmierci komórkowej po utracie systemu R-M (ang. post-segregational host killing). Do tej pory nie udało się jeszcze poznać dokładnego mechanizmu regulacji aktywności ENazy i MTazy w operonie EcoRI. Prawdopodobnie kluczowe jest zbadanie roli antysensownego RNA, które może interferować z odcinkiem liderowym jednego z transkryptów operonu z promotorów P_{M1} i P_{M2} .

Ponadto, badając mechanizmy regulacji wśród systemów R-M typu II znalazłam wiele analogii i podobieństw do regulacji bakteryjnych systemów toksyna-antytoksyna, co dotąd nie było gruntownie analizowane. Zawarłam je w pracy przeglądowej **[praca nr5]**.

Podsumowując, moje najważniejsze osiągnięcia zaprezentowane w cyklu prac to wykazanie, że:

- białko regulatorowe C odpowiedzialne jest za opóźnienie toksycznej ekspresji endonukleazy w stosunku do ekspresji metylotransferazy podczas transferu systemu R-M do nowego gospodarza. Jego rola wydaje się kluczowa dla procesu ustabilizowania się

systemu w nowym gospodarzu, gdzie zbyt wczesne włączenie genu endonukleazy, zanim ochronna metylaza zdąży zmodyfikować genom bakterii, może się kończyć śmiercią gospodarza.

- wiązanie białka regulatorowego C do sekwencji DNA operatora: O_L jest związane z aktywacją transkrypcji, a wiązanie do O_R powoduje jej represję. Ponadto wiązanie białka C do DNA jest ściśle kooperatywne. Stwierdziłam również w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro*, że białko C ma większą preferencję do wiązania się do operatora O_L w sekwencjach symetrycznych C-boxa, co wskazuje, że sama budowa tego rejonu, sekwencje łącznikowe lub flankujące warunkują modulację powinowactwa białka C do C-boxu w zależności od 3-nt kombinacji sekwencyjnej. Pozwala to na optymalne przełączanie trybu transkrypcji: aktywacja vs. represja.
- jako pierwsi wykazaliśmy, że istnieją nowe mechanizmy regulacji aktywności systemu R-M oparte o antysensowny RNA, (system R-M EcoRI). Regulacja ekspresji toksycznej ENazy z silnego promotora odbywa się poprzez mechanizm interferencji inicjacji transkrypcji głównego mRNA z krótkimi RNA powstającymi w obrębie ENazy z promotorów na nici dolnej, w przeciwnym kierunku
- transkrypcja krótkiego 88 nt antysensownego RNA z promotora P_{REV0} wydaje się być niezbędna do przeżycia komórek gospodarza niosącego system R-M EcoRI, gdyż obniżenie efektywności takiego promotora prowadzi do zwiększenia ekspresji ENazy i toksyczności systemu R-M.
- pomimo braku podobieństw w strukturze białek i motywów DNA, systemy R-M typu II wykazują wiele analogii do bakteryjnych systemów toksyna-antytoksyna, na poziomie biologii, funkcji i regulacji ekspresji.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Studia rozpoczęłam w 1993 roku na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) w Gdańsku. Już w trakcie studiów, na trzecim roku rozpoczęłam pierwsze eksperymenty pod opieką Dr Stanisława Piechuli i Prof. dr hab. Anny Podhajskiej. Pracowałam wtedy nad izolacją, oczyszczaniem oraz określaniem właściwości enzymów restrykcyjnych z sinic. Porównanie właściwości biochemicznych wskazuje, że mimo tego, że sinice bytują w środowisku o temperaturze 15-40°C, to wiele z izolowanych z nich enzymów restrykcyjnych wymaga do optymalnego cięcia DNA temperatur znacznie przewyższających optimum wzrostu gospodarza (np. 60-80°C) (**Piechula i inni, 2001**). Te badania pozwoliły mi zdobyć pierwsze doświadczenie naukowe i opanować metody biologii molekularnej. Następnie pod opieką Prof. dr hab. Tadeusza Kaczorowskiego zajęłam się swoim projektem związanym z oczyszczaniem i charakterystyką endonukleazy restrykcyjnej EcoVIII z *Escherichia coli* 1585-68. Tytuł magistra ze specjalnością biotechnologia uzyskałam w lipcu 1998 r. z wynikiem bardzo dobrym. Tytuł pracy brzmiał: „Klonowanie i nadekspresja endonukleazy restrykcyjnej EcoVIII z *Escherichia coli* 1585-68”. Promotorem był wspomniany Pan Prof. dr hab. Tadeusz Kaczorowski.

Następnie zostałam słuchaczem Środowiskowego Studium Doktoranckiego z Biologii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Kontynuowałam prace z tematyki genetyki i roli bakteryjnych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II. Celem moich badań była biochemiczna i genetyczna analiza zjawiska izospecyficzności czyli zjawiska wysepowania różnic biochemicznych i strukturalnych dla systemów R-M rozpoznających identyczne, specyficzne sekwencje nukleotydowe. Jako modelu w badaniach użyłam systemów izospecyficznych wobec prototypowego systemu R-M HindIII z *Haemophilus influenzae* Rd; tj. LlaCI z *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15 oraz EcoVIII z *E. coli* E1585-68. Wymienione systemy rozpoznają specyficzną sekwencję nukleotydową 5'-AAGCTT-3'/3'-TTCGAA-5'. W wyniku przeprowadzonych badań udało mi się zcharakteryzować plazmid pEC156 niosący geny systemu R-M EcoVIII (**Mruk i inni, 2001**) oraz wyizolować i zsekwencjonować geny dwóch systemów R-M: BstZ1II z *Bacillus stearothermophilus* 14P oraz Csp231I z *Citrobacter* sp. RFL231. Ich sekwencje zdeponowałam w bazie danych NCBI GenBank. W strukturze genetycznej systemu Csp231I odkryłam występowanie dodatkowego elementu w postaci genu kodującego regulatorowe białko C. Analogiczne białka takich systemów, jak PvuII czy BamHI, biorą udział w regulowaniu

ekspresji genów kodujących poszczególne elementy systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego. Analiza sekwencji tego białka wskazuje, że enzym ten jest przedstawicielem nowej ciekawej rodziny białek, dotąd niebadanej.

W przypadku klonowania systemów BstZ1II oraz Csp231I wypracowałam oryginalną procedurę, w której selekcja klonów niosących gen określonej metylotransferazy była przeprowadzana z wykorzystaniem wektora samobójczego (**Mruk i Kaczorowski, 2007**).

Analiza struktury genetycznej badanych systemów R-M pozwoliła na wykazanie na poziomie sekwencji aminokwasowych dużego podobieństwa pomiędzy izospecyficznymi metylotransferazami oraz braku takiego podobieństwa w przypadku izospecyficznych endonukleaz restrykcyjnych (**Mruk i Kaczorowski, 2003**). Wyniki te znalazły swoje potwierdzenie w przeprowadzonych badaniach serologicznych. W strukturze izospecyficznych endonukleaz zaobserwowałam występowanie charakterystycznego motywu katalicznego DXDXK, którego lokalizacja została zweryfikowana w oparciu o model molekularny cząsteczki endonukleazy HindIII. Przeprowadzona analiza sugeruje obecność wspólnej architektury centrum aktywnego wszystkich analizowanych w niniejszej pracy izospecyficznych endonukleaz restrykcyjnych. Istotność tego motywu katalicznego została również potwierdzona eksperymentalnie z użyciem technik mutagenyzy losowej. W strukturze metylotransferazy BstZ1II stwierdziłam występowanie w części centralnej enzymu regionu, którego sekwencja aminokwasowa nie występowała w innych izospecyficznych metylotransferazach (M.EcoVIII, M.HindIII, M.LlaCI, M.Csp231I). Wykazałam, że brak tego regionu nie wpływa na funkcję modyfikacyjną enzymu, gdyż skonstruowany mutant delecyjnego M.BstZ1II pozbawiony tego regionu (60 aminokwasów) nadal zachowywał pełną aktywność. Opracowałam wydajną procedurę oczyszczania enzymów (R.EcoVIII, R.HindIII oraz M.EcoVIII, M.HindIII, M.Csp231I, M.BstZ1II), a następnie przeprowadziłam ich analizę biochemiczną. Oczyszczanie białek było ułatwione dzięki zastosowaniu układów ekspresyjnych opartych o elementy regulatorowe faga T7. Generalnie właściwości badanych homologów MTaz były podobne. Interesujące było, że różniły się one wrażliwością na jony dwuwartościowe. Wykazałam, że jony te, a w szczególności jony Mg^{2+} , w stężeniach fizjologicznych (1–4 mM) wpływają hamująco na niektóre z analizowanych metylotransferaz (M.LlaCI, M.EcoVIII, M.HindIII) (**Mruk i inni, 2003**). W przypadku M.Csp231I efekt hamowania był słabszy, zaś dla M.BstZ1II zaobserwowałam nieznaczną stymulację aktywności enzymu. Z drugiej strony jony te są niezbędne w reakcji cięcia DNA przez pokrewne enzymy restrykcyjne. Przymuszczałam obniżoną aktywność

metylotransferazy może powodować zwiększoną zdolność pokrewnej endonukleazy do restrykcji obcego DNA.

Obrona rozprawy doktorskiej zatytułowanej "Struktura genetyczna i właściwości systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoVIII i jego izospecyficznym homologów" odbyła się 08.10.2004 r. Recenzentami byli Pan Prof. dr hab. Andrzej Piekarowicz z Uniwersytetu Warszawskiego oraz Pan Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn z Uniwersytetu Gdańskiego. Praca uzyskała również wyróżnienie Rady Naukowej Wydziału Biologii UG. Otrzymałam także nagrodę Prezesa Rady Ministrów RP za rozprawę doktorską oraz nagrodę Gdańskiego Towarzystwa Naukowego za rozprawę doktorską oraz osiągnięcia naukowe w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych w 2004 r.

Wyniki mojej pracy były prezentowane na kilku konferencjach. Otrzymałam dwukrotnie wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w konkursie im. Prof. Wł. Mozołowskiego, w 1999 i 2003 roku.

Ponadto praca „Genetic organization and molecular analysis of the EcoVIII restriction-modification system of *Escherichia coli* E1585-68 and its comparison with isospecific homologs” opublikowana w czasopiśmie Applied and Environmental Microbiology otrzymała wyróżnienie Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk w konkursie im. Prof. K. Bassalika, na najlepszą pracę eksperymentalną z zakresu mikrobiologii wykonaną w kraju i opublikowaną w 2003 roku.

Wyniki badań nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny opublikowałam w następujących czasopismach naukowych:

1. **Mruk I.,** Kaczorowski T.: A rapid and efficient method for cloning genes of type II restriction-modification systems by use of a killer plasmid. ***Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007)** 4286-93.
IF₂₀₀₇= **4.004**; MNiSW= **40**
2. **Mruk I.,** Cichowicz M., Kaczorowski T.: Characterization of the LlaCI methyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15 provides new insights into the biology of type II restriction-modification systems. ***Microbiology SGM* 149 (2003)** 3331-3341.
IF₂₀₀₃= **3.044**; MNiSW= **40**
3. **Mruk I.,** Kaczorowski T.: Genetic organization and molecular analysis of the EcoVIII restriction-modification system of *Escherichia coli* E1585-68 and its comparison with isospecific homologs. ***Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003)** 2638-2650.
IF₂₀₀₃= **3.829**; MNiSW= **40**

4. **Mruk I.**, Sektas M., Kaczorowski T.: Characterization of pEC156, a ColE1-type plasmid from *Escherichia coli* E1585-68 that carries genes of the EcoVIII restriction-modification system. ***Plasmid* 46 (2001)** 128-39
IF₂₀₀₁ = **1.463**; MNiSW= **20**
5. Piechula S., Waleron K., Świątek W., **Biedrzycka I.***, Podhajska A.J.: Mesophilic cyanobacteria producing thermophilic restriction endonucleases. ***FEMS Microbiol Lett* 198 (2001)** 135-40.
IF₂₀₀₁ = **1.673**; MNiSW= **20**
* moje nazwisko panieńskie

6. PLANY BADAWCZE

Obecnie jako kierownik grantu NCN7241/B/P01/2011/40 kontynuuję badania na temat regulacji ekspresji systemów R-M z udziałem białka C nowej, niebadanej dotąd rodziny białek regulatorowych. Gen C oraz podległe mu geny systemu R-M Csp231I zostały sklonowane w naszym laboratorium (Mruk & Kaczorowski, 2007; GenBank AY787793). Z analizy sekwencji tego systemu oraz badań *in vitro* wynika, że białko C posiada odmienną sekwencję specyficzną miejsca wiązania z DNA. Ponadto jego struktura (McGeehan i inni, 2011) różni się od jego homologów. Badamy, jak te różnice przekładają się na kontrolę ekspresji toksycznej endonukleazy restrykcyjnej w stosunku do lepiej zbadanego modelu regulacji ekspresji systemów R-M z udziałem białka C.PvuII.

Iwona Mruk
30.09.2013