

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko.

Dorota Kuczyńska-Wiśnik

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Tytuł magistra biologii – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, czerwiec 1992

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, wrzesień 2001. Tytuł rozprawy doktorskiej – „Regulacja transkrypcji operonu *lbpA* i rola białek *lbpA* i *lbpB*”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

1993 – 2001: asystent, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, Katedra Biochemii

2001 – chwila obecna: adiunkt, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Biochemii

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Białka *lbpA* i *lbpB*, jako elementy mechanizmu chroniącego komórki *Escherichia coli* przed stresem oksydacyjnym

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

- [1.] **Kuczyńska-Wiśnik D.**, Kędzierska S., Matuszewska E., Lund P., Taylor A., Lipińska B., Laskowska E. The *Escherichia coli* small heat-shock proteins *lbpA* and *lbpB* prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock (2002) *Microbiology* 148: 1757-1765 (MNiSW - 30 pkt; IF 2002 = 2.897)
- [2.] **Kuczyńska – Wiśnik D.**, Żurawa-Janicka D., Narkiewicz J., Kwiatkowska J., Lipińska B., Laskowska E. *E. coli* small heat shock proteins *lbpA/B* enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies (2004) *Acta Biochimica Polonica* 51: 925-932 (MNiSW - 15 pkt; IF 2004 = 1.032)
- [3.] Matuszewska E., Kwiatkowska J., **Kuczyńska-Wiśnik D.**, Laskowska E. *Escherichia coli* heat-shock proteins *lbpA/B* are involved in resistance to oxidative stress induced by copper (2008) *Microbiology* 154: 1739-1747 (MNiSW - 30 pkt; IF 2008 = 2.841)
- [4.] Matuszewska E., Kwiatkowska J., Ratajczak E., **Kuczyńska- Wiśnik D.**, Laskowska E. Role of *Escherichia coli* heat shock proteins *lbpA* and *lbpB* in protection of alcohol dehydrogenase *AdhE* against heat inactivation in the presence of oxygen (2009) *Acta Biochimica Polonica* 56: 55-61 (MNiSW - 15 pkt; IF 2009 = 1.262)
- [5.] **Kuczyńska-Wiśnik D.**, Matuszewska E., Laskowska E. *Escherichia coli* heat-shock proteins *lbpA* and *lbpB* affect biofilm formation by influencing the level of extracellular indole (2010) *Microbiology* 156:148-57 (MNiSW - 30 pkt; IF 2010 = 2.957)

- [6.] **Kuczyńska-Wiśnik D.**, Matuszewska E, Furmanek-Błaszczak B, Leszczyńska D, Grudowska A, Szczepaniak P, Laskowska E. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signaling (2010) *Research in Microbiology* 161: 847-853 (MNiSW = 25 pkt; IF 2010 = 2.405)

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Celem naukowym wyżej wymienionych prac było poszerzenie wiedzy na temat udziału małych białek szoku termicznego modelowej bakterii *Escherichia coli* - IbpA i IbpB w ochronie komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego.

IbpA i IbpB należą do rodziny małych białek szoku termicznego (sHsps) nazywanych też α -Hsp – szeroko reprezentowanej wśród prokariota i eukariota grupy białek opiekuńczych. Przedstawiciele sHsps charakteryzuje niewielka jak na białka szoku termicznego homologia (nieprzekraczająca 20%) a cechami typowymi dla tych białek jest niska masa cząsteczkowa (15-40 kDa), tworzenie dużych form hetero- lub homo-oligomerycznych, obecność domeny α -krystalinowej, czyli 100 aminokwasowej sekwencji występującej w części C-terminalnej tych białek, a przede wszystkim funkcja. sHsps uczestniczą w ochronie polipeptydów przed nieodwracalną denaturacją wiążąc substraty i utrzymując je w stanie kompetencji do fałdowania. Ponieważ nie posiadają aktywności ATPaz, to w procesie przywracania natywnej konformacji denaturowanym białkom współdziałają z innymi Hsp. Tym samym stanowią istotny element rozbudowanej sieci białek opiekuńczych (ClpB, Hsp70/Hsp40, Hsp60) oraz proteaz (prokariotyczne ClpXP, ClpAP, Lon), której zadaniem jest „kontrola jakości” procesu fałdowania nowo syntetyzowanych białek, renaturacja denaturowanych polipeptydów w warunkach stresowych lub ich degradacja, gdy uszkodzenie jest nieodwracalne. sHsps uważane są za pierwszą linię obrony komórki przed skutkami stresu, ponieważ nie wymagają ATP, substraty wiążą z dużą wydajnością a ich poziom po szoku rośnie znacząco (Laskowska i Kuczyńska-Wiśnik, 2008). Zainteresowanie małymi białkami szoku termicznego wzrosło, gdy pojawiły się doniesienia, że poza działaniem w warunkach stresowych, jako typowe białka opiekuńcze biorą one udział w licznych procesach fizjologicznych. W komórkach ssaczy uczestniczą w regulacji apoptozy, transformacji nowotworowej oraz procesie różnicowania się komórek i stabilizacji cytoszkieletu. Mutacje w genach ludzkich sHsps prowadzą do takich chorób jak zaćma, desminopatia czy neuropatia a ponadto stwierdzono, że sHsps wchodzą w skład agregatów białkowych powstających w przebiegu takich chorób, jak mukowiscydoza, stwardnienie rozsiane czy choroby o charakterze neurodegeneracyjnym (choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona) (Laskowska i wsp., 2010).

Moje zainteresowanie rolą białek IbpA i IbpB stanowi kontynuację badań rozpoczętych w trakcie realizacji tematu rozprawy doktorskiej, która dotyczyła regulacji ekspresji genów *ibpAibpB*. Z moich doświadczeń wynikało, że mechanizm tej regulacji jest inny niż u pozostałych poznanych bakteryjnych genów szoku termicznego i żaden z nich nie posiada takiego układu elementów regulatorowych jak gen *ibpB* (Kuczyńska-Wiśnik i wsp., 2001). Wskazywało to pośrednio, na ważną rolę białek IbpA IbpB w ochronie komórki przed skutkami stresu, ale wiedza na ten temat była niewielka.

Pierwsze prace pozwoliły mi na pozyskanie dodatkowych informacji o funkcji IbpA i IbpB w komórce. Z uwagi na to, brak IbpAB nie wpływał na obniżenie przeżywalności bakterii w warunkach umiarkowanego stresu termicznego, pomimo że są to najsilniej indukowane geny szoku termicznego u *E. coli*, skupiłam się na zbadaniu efektu fenotypowego mutacji $\Delta ibpA/B$. Wykazałam, że dopiero w warunkach ekstremalnego szoku (50°C) można zaobserwować efekt tej mutacji: obniżoną w porównaniu ze szczepem dzikim przeżywalność bakterii, wzmożoną agregację białek a także spowolnione usuwanie powstałych agregatów, widoczne po przeniesieniu bakterii do 37°C. Zaobserwowałam również, że nadprodukcja białek IbpA i/lub IbpB powodowała stabilizację agregatów. Wyniki te, uzyskane *in vivo*, stanowiły potwierdzenie zaproponowanego wówczas na podstawie doświadczeń *in vitro* modelu współdziałania małych białek szoku termicznego z systemem zależnych od ATP białek opiekuńczych z rodziny Hsp70 (Veigner i wsp., 1998). Zgodnie z tym obowiązującym do dziś modelem, w warunkach stresowych IbpAB wiążą nienatywne białka chroniąc je przed nieodwracalną agregacją i utrzymując w stanie kompetencji do refaldowania, które przeprowadzają zależne od ATP białka DnaK-DnaJ-GrpE. Uzyskałam również interesujące dane wskazujące po raz pierwszy, że białka IbpA i IbpB, choć wykazują blisko 48% homologię na poziomie sekwencji aminokwasowej to różnią się powinowactwem do substratów. Przy braku IbpA w komórce tylko niewielka część (ok. 2%) IbpB wiązała się z agregatami białek, natomiast większość IbpB znajdowała się we frakcji białek rozpuszczalnych. IbpB pojawiało się we frakcji agregatów, gdy nadprodukowane były oba białka Ibp. Natomiast IbpA, niezależnie od obecności lub braku IbpB, pozostawało zawsze związane z agregatami. Przedstawione powyżej wyniki złożyły się na pierwszą z **prac [1]**, opisującą działanie białek IbpAB *in vivo*.

W zespole prof. A. Taylor wykazano, że IbpAB wiążą się do powstałych po szoku termicznym agregatów endogennych białek bakterii (Laskowska i wsp., 1996) a dalsze prace, w których uczestniczyłam (Laskowska i wsp., 2003; Laskowska i wsp., 2004) wykazały, że IbpAB można traktować jako markery agregatów białkowych w komórkach *E. coli*. Po raz pierwszy jednak IbpA i IbpB opisano jako białka zasocjowane z ciałami inkluzyjnymi (Allen i wsp., 1992). Ciała inkluzyjne powstają w trakcie nadprodukcji w komórkach bakteryjnych rekombinowanych białek, gdy przy niedostatecznej ilości białek opiekuńczych dochodzi do nieswoistych oddziaływań hydrofobowych między polipeptydami. Wiadomo też, że ciała inkluzyjne zawierają białka o różnej konformacji, od całkowicie zdenaturowanych po natywne, a ponadto proces ich powstawania jest dynamiczny - w komórce cały czas zachodzą procesy z jednej strony uwalniania i refaldowania białek z ciał inkluzyjnych a z drugiej agregacja polipeptydów (Carrio i Villaverde, 2002). W kolejnej pracy skupiłam się na badaniu wpływu IbpAB na aktywność enzymów tworzących ciała inkluzyjne i stwierdziłam, że IbpAB chronią enzymy przed utratą aktywności. Wykorzystałam trzy systemy ekspresyjne umożliwiające nadprodukcję i akumulację w formie ciał inkluzyjnych trzech różnych białek: Cro- β -galaktozydazy, β -laktamazy oraz szczurzego białka rHtrA1. W żadnym z badanych układów brak białek IbpAB nie wpływał ani na poziom nadprodukcji rekombinowanych białek ani też tworzonych ciał inkluzyjnych. Stwierdziłam za to wyższą o ok. 40% aktywność enzymatyczną laktamazy i rHtrA1 w ciałach inkluzyjnych zawierających IbpAB. Uzyskane i opublikowane w **pracy [2]** wyniki wskazują, że IbpAB wiążąc się do swoich substratów nie tylko chronią je przed nieodwracalną agregacją, ułatwiając

tym samym ich późniejsze refaldowanie, ale również pomagają zachować tym białkom natywną konformację w agregatach.

Kontynuując badania nad rolą białek IbpAB skierowałam swoją uwagę na doniesienia wskazujące na udział tych białek w ochronie komórek bakteryjnych przed stresem oksydacyjnym. Organizmy żyjące w warunkach tlenowych są narażone na działanie reaktywnych form tlenu (RFT), które powstają w trakcie oddychania. RFT uszkadzają białka, lipidy w błonach oraz DNA, dlatego organizmy tlenowe wykształciły specyficzne mechanizmy antyoksydacyjne chroniące składniki komórki. Przede wszystkim jest to bariera antyoksydacyjna tworzona przez enzymy (dysmutaza ponadtlenkowa, katalazy, enzymy zależne od glutationu) oraz drobnocząsteczkowe antyoksydanty (glutation, kwas moczowy, witaminy C i E), które zapobiegają pojawianiu się RFT lub je neutralizują (Nystrom, 2003). Pojawiły się również doniesienia na temat ewentualnego udziału Hsp w ochronie białek przed oksydacją (Echave i wsp., 2002; Fredriksson i wsp., 2005; Winter i wsp., 2005). W odniesieniu do IbpAB wykazano, że ich nadprodukcja zwiększa oporność bakterii na działanie parakwatu (Kitagawa i wsp., 2000) a *in vitro* białka IbpAB chronią wybrane enzymy przed działaniem czynników utleniających (Kitagawa i wsp., 2002). W naszym zespole podjęliśmy się wyjaśnienia, na czym polega rola IbpAB w ochronie komórki bakteryjnej przed skutkami stresu oksydacyjnego. Zaobserwowaliśmy, że brak białek IbpA/B powoduje wzrost wrażliwości bakterii na jony Cu^{2+} . Miedź to jeden z metali przejściowych, niezbędny jako kofaktor licznych enzymów komórkowych, ale toksyczny nawet w niskim stężeniu. Toksyczność miedzi spowodowana jest między innymi tym, że jony Cu^{2+} reagując z ubocznymi produktami metabolizmu tlenowego, nadtlenkiem wodoru i anionem ponadtlenkowym, generują powstawanie wysoce toksycznych rodników hydroksylowych. Zaobserwowaliśmy, że w warunkach tlenowych komórki mutanta $\Delta ibpA/B$ wykazują podwyższoną wrażliwość na działanie jonów Cu^{2+} i zawierają podwyższony poziom utlenionych białek, wśród których najsilniej agregujące zidentyfikowaliśmy jako dehydrogenazę alkoholową (AdhE). Wykazaliśmy, że zarówno *in vivo* jak i *in vitro* IbpAB chronią AdhE przed oksydacją indukowaną przez Cu^{2+} . Opierając się na uzyskanych wynikach zaproponowaliśmy potencjalny mechanizm ochronny, zgodnie z którym udział IbpAB w ochronie białek *E. coli* przed stresem oksydacyjnym polega zarówno na bezpośrednim oddziaływaniu z uszkodzonymi białkami, jak i na zapobieganiu powstawaniu reaktywnych form tlenu poprzez wiązanie jonów miedzi. Omówione wyniki znalazły się w **pracy [3]**.

W dalszych badaniach nad rolą białek IbpAB w ochronie komórki przed skutkami stresu termicznego i oksydacyjnego posłużyliśmy się AdhE jako modelowym substratem. Badaliśmy agregację AdhE w komórkach *E. coli* w warunkach ekstremalnego szoku termicznego (50°C). Wykazaliśmy, że w warunkach tlenowych IbpAB chronią AdhE przed inaktywacją podczas szoku termicznego (**praca [4]**). Dane te potwierdziliśmy w doświadczeniach *in vitro*, w których użyliśmy oczyszczonego AdhE i białek opiekuńczych. Całkowita reaktywacja enzymu przy udziale systemu DnaK/DnaJ/GrpE zachodziła, gdy IbpAB były obecne w trakcie termicznej inaktywacji AdhE. Zaskakujące było jednak to, że nasilona inaktywacja i oksydacja AdhE po szoku termicznym w komórkach mutantu $\Delta ibpAibpB$ nie była powiązana z podwyższoną agregacją enzymu i opóźnionym usuwaniem powstałych po szoku agregatów AdhE. Bazując na wynikach wcześniejszych (praca [1]), które pokazywały, że brak IbpAB powoduje wzmożoną agregację i opóźnia usuwanie agregatów

spodziewaliśmy się innego wyniku. Przypuszczamy więc, że IbpA i/lub IbpB nie uczestniczą w usuwaniu z agregatów nieodwracalnie utlenionych białek przeznaczonych do degradacji. Ich działanie sprowadza się do ochrony AdhE przed oksydacją i inaktywacją a tym samym utrzymania enzymu w postaci rozpuszczalnej.

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się prace, w których donoszono, że geny *ibpAibpB* ulegają ekspresji w komórkach bakteryjnych tworzących biofilm (Schembri i wsp., 2003; Ren i wsp., 2004; Junker i wsp., 2007), jednakże nikt nie podjął się wyjaśnienia, jaką rolę białka IbpAB mogą odgrywać w tych warunkach stresowych. Biofilm jest naturalnym sposobem życia większości bakterii. Powstaje na skutek adhezji komórek do stałych powierzchni (biotycznych i abiotycznych) na granicy z fazą płynną i stanowi strategię obronną przed zmieniającymi się niekorzystnymi warunkami środowiska. Biofilmy bakteryjne występują powszechnie w przyrodzie i stanowią z jednej strony poważne zagrożenie w przemyśle a przede wszystkim w medycynie, gdzie są źródłem około 65% zakażeń bakteryjnych, z drugiej strony pojawiają się doniesienia o możliwościach wykorzystywania biofilmu w bioremediacji np. do oczyszczania ścieków. Tworzenie biofilmu to skomplikowany wieloetapowy proces a przejście bakterii planktonowych (wolno unoszących się) do tworzenia biofilmu wiąże się indukcją ekspresji ponad 100 genów (Harrison i wsp., 2007). O ile na temat roli białek powierzchniowych w powstawaniu biofilmu wiedza jest dość szeroka, to niewiele wiadomo jaką funkcję pełnią w tym procesie białka opiekuńcze, wśród nich IbpAB. Podjęłam się więc wyjaśnienia tego zagadnienia. Badania, które wykonałam pozwoliły stwierdzić, że brak IbpAB hamuje tworzenie biofilmu przez bakterie *E. coli* (szczep W3110, pożywka LB z MOPS (pH7,0) na powierzchni płytek PCV, choć nie wpływa na wzrost bakterii planktonowych. Ponadto w komórkach pozbawionych IbpAB indukowane jest białko o masie około 50 kDa, które zidentyfikowałam jako tryptofanazę, produkt genu *tnaA*. Tryptofanaza jest enzymem produkowanym w stacjonarnej fazie wzrostu i katalizującym rozkład tryptofanu do indolu, pirogronianu i mocznika. Indukcja syntezy tryptofanazy w komórkach Δ *ibpA/B* prowadziła do zwiększonej produkcji indolu, który jak podają dane literaturowe (Wang i wsp., 2001; Lee i wsp., 2008) jest jedną z międzygatunkowych cząsteczek sygnałowych, zaangażowaną w zjawisko *quorum sensing*, czyli proces komunikacji międzybakteryjnej oraz hamującą ruchliwość bakterii i powstawanie biofilmu. Wiadomo, że *tnaA* ulega ekspresji w obecności RFT (Zheng i wsp., 2001), przeanalizowałam więc poziom utlenionych białek oraz reaktywnych form tlenu i stwierdziłam, że komórki pozbawione IbpAB w warunkach powstawania biofilmu są narażone na stres oksydacyjny. Wynika to prawdopodobnie z tego, że IbpAB chronią przed inaktywacją katalazy – enzymy antyoksydacyjne uczestniczące w usuwaniu nadtlenu wodoru z komórek. W komórkach mutantu Δ *ibpAibpB* aktywność tych enzymów była o ok. 30% niższa niż w szczepie WT, co prowadziło do wzrostu poziomu RFT. Wyniki tych doświadczeń złożyły się na **pracę [5]**, w której wykazałam, że IbpAB przyspieszają powstawanie biofilmu *E. coli* chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym.

W ostatniej z cyklu prezentowanych tu prac wykazałam, że zjawisko hamowania przez indol tworzenia biofilmu przez komórki *E. coli* doświadczające stresu oksydacyjnego odnosi się nie tylko do szczepu pozbawionego IbpAB. Doniesienia literaturowe wskazywały, że wspólnym efektem działania na komórki bakteryjne wielu różnych antybiotyków jest indukowanie stresu oksydacyjnego (Kohanski i wsp., 2007). W kolejnej pracy (**praca[6]**) wykazałam, że trimetoprim, kwas nalidiksowy, rifampicyna,

kanamycyna i streptomycyna w stężeniach subletalnych hamują tworzenie biofilmu przez szczep *E. coli* W3110 na powierzchni PCV. Potwierdziłam, że w tych warunkach bakterie narażone są na endogenny stres oksydacyjny, co prowadziło do indukcji *tnaA* a w efekcie podwyższonego wydzielania indolu. Ponadto, brak tryptofanazy (szczep $\Delta tnaA$) lub obecność przeciwutleniaczy takich jak DMSO częściowo przywracały tworzenie biofilmu w obecności badanych antybiotyków. Tak więc hamowanie formowania biofilmu przez antybiotyki, które powodują wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w komórce bakteryjnej, jest procesem częściowo zależnym od indolu.

Podsumowując, najważniejsze odkrycia cyklu prac składających się na moje osiągnięcie naukowe to:

- Wykazanie, że białka opiekuńcze IbpAB chronią komórki *E. coli* przed skutkami ekstremalnego stresu termicznego gdyż hamują agregację białek i ułatwiają usuwanie agregatów denaturowanych białek po obniżeniu temperatury
- Stwierdzenie, że IbpAB ułatwiają zachowanie natywnej konformacji białek wewnątrz agregatów
- Wykazanie, że IbpAB chronią *E. coli* przed skutkami stresu oksydacyjnego; hamują oksydacyjną inaktywację białek wywołaną zarówno działaniem Cu^{2+} jak i w warunkach stresu termicznego zachodzącego w obecności tlenu. Ich funkcja ochronna polega prawdopodobnie na zapobieganiu inaktywacji katalazy
- Wykazanie, że IbpAB przyspieszają powstawanie biofilmu *E. coli* hamując pośrednio produkcję indolu - jednej z cząsteczek sygnałowych, która zapobiega adhezji komórek do podłoża. Brak IbpAB naraża komórki na endogenny stres oksydacyjny, co prowadzi do nadprodukcji tryptofanazy i wzrostu poziomu indolu. Stwierdzenie ponadto, że hamowanie przez indol tworzenia biofilmu przez komórki *E. coli* doświadczające stresu oksydacyjnego występuje również po działaniu niektórych antybiotyków

Wymienione rezultaty badań przyczyniły się do znacznie lepszego poznania roli małych białek szoku termicznego IbpAB w ochronie komórki przed stresem termicznym i oksydacyjnym oraz stanowią uzupełnienie wiedzy o molekularnych mechanizmach chroniących komórki bakteryjne w warunkach stresowych.

Literatura uzupełniająca (poza publikacjami tworzącymi osiągnięcie naukowe):

Allen S.P., Polazzi J.O., Gierse J.K., Easton A.M. (1992) „Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *E.coli*” *J. Bacteriol* 174: 6938-6947

Carrió M.M., Villaverde A.(2002) “Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies” *J Biotechnol* 96 (1): 3-12

Echave P., Esparza-Ceron M. A., Cabisco E., Tamarit J., Ros J., Membrillo-Hernandez J., Lin E. C. C. (2002) “DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*” *PNAS* 99: 4626-4631

Fredriksson A., Ballesteros M., Dukan S., Nystrom T. (2005) “Defence against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon” *J Bacteriol* 187: 4207-4213

Harrison J.J., Ceri H., Turner J.R. (2007) “Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms” *Nature Rev Microbiol* 5: 928-938

- Junker L.M., Toba F.A., Hay A.G. (2007) "Transcription in *Escherichia coli* PHL628 biofilms" *FEMS Microbiol Lett* 268: 237-243
- Kitagawa M., Matsumura Y., Tsuchido T. (2000) "Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*" *FEMS Microbiol Lett* 184(2): 165-71
- Kitagawa M., Miyakawa M., Matsumura Y., Tsuchido T. (2002) "*Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants" *Eur J Biochem* 269(12): 2907-17
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) "A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics" *Cell* 130(5): 797-810
- Kuczyńska-Wiśnik D.**, Laskowska E, Taylor A. (2001) "Transcription of the *ibpB* heat-shock gene is under control of sigma 32- and sigma 54- promoters, a third regulon of heat shock response" *Biochem Biophys Res Commun* 284: 57-64
- Laskowska E., Wawrzynów A., Taylor A. (1996) „IbpA and IbpB, the new heat shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock" *Biochimie* 78:117-122
- Laskowska E., **Kuczyńska-Wiśnik D.**, Bąk M., Lipińska B. (2003) "Trimethoprim induces heat shock proteins and protein aggregation in *E. coli* cells" *Curr Microbiol* 47: 286-288
- Laskowska E., Bohdanowicz J., **Kuczyńska-Wiśnik D.**, Matuszewska E., Kędzierska S., Taylor A. (2004) "Aggregation of heat shock denatured, endogenous proteins and distribution of the IbpA/B and Fda marker proteins in *E. coli* wt and *grpE280* cells" *Microbiol* 150: 247-259
- Laskowska E., **Kuczyńska-Wiśnik D.** (2008) "The small heat shock proteins: multifunctional chaperones in Bacteria, Archaea and Eucarya" str. 459-494, w "Heat shock proteins – new research" (ed.: E. Morel, C. Vincent) Nova Science Publishers, Inc.
- Laskowska E, Matuszewska E, **Kuczyńska-Wiśnik D.** (2010) "Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases" *Curr Pharm Biotechnol* 11: 146-57
- Lee J., Zhang X.S., Hegde M., Bentley W.E., Jayaraman A., Wood T.K. (2008) "Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*" *ISME J* 2 :1007-1023
- Nystrom T. (2003) "Conditional senescence in bacteria: death of the immortals" *Mol Microbiol* 48:17-23
- Ren D., Bedzyk L.A., Thomas S.M., Ye R.W., Wood T.K., (2004) "Gene expression in *Escherichia coli* biofilms" *Appl Microbiol Biotechnol* 64:515-24
- Schembri M.A., Kjaergaard K., Klemm P. (2003) "Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms" *Mol Microbiol* 48: 253-267
- Wang D., Ding X., Rather P.N. (2001) "Indole can act as extracellular signal in *Escherichia coli*" *J Bacteriol* 183: 4210-4216
- Winter J., Linke K., Jatzek A., Jakob U. (2005) "Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33" *Mol Cell* 17: 381-392
- Veinger L., Diamant S., Buchner J., Goloubinoff P. (1998) "The small heat shock protein from *E. coli* stabilizes stress denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network" *J Biol Chem* 273: 11032-11037
- Zheng M., Wang X., Templeton L.J., Smulski D.R., LaRossa R.A., Storz G. (2001) "DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide" *J Bacteriol* 183(15): 4562-70

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

W 1992 roku ukończyłam z wyróżnieniem studia biologiczne na Wydziale Biologii Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę magisterską pt. „Oczyszczanie białka RecA i jego lokalizacja we frakcjach błon komórkowych wybranych szczepów *Escherichia coli* w warunkach odpowiedzi SOS” wykonywałam w Katedrze Biochemii pod kierunkiem prof. dr hab. Aliny Taylor. W styczniu 1993 roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta w Katedrze Biochemii UG i rozpoczęłam swoją karierę naukową w zespole kierowanym przez prof. Alinę Taylor. W tym czasie wspólnie z mgr Hanną Szpilewską – opiekunem pracy magisterskiej, napisałam i przygotowałam do druku pracę przeglądową poświęconą budowie i roli białka RecA – przedmiotu mojej pracy magisterskiej (Szpilewska i Kuczyńska-Wiśnik, 1993 - **praca nr 1 pk. IID, załącznik 4**).

Pierwszy projekt naukowy, w którego realizacji uczestniczyłam dotyczył badań nad powstawaniem i usuwaniem z komórki agregatów zdenaturowanych termicznie białek - tzw. frakcji S. Stosując metodę ultrawirowania w gradiencie stężenia sacharozy można oddzielić frakcję S od błon

biologicznych. W toku wcześniejszych badań ustalono, że frakcja S osiąga maksimum 15 min po przeniesieniu bakterii z 30° do 45°C a zanika po 10 minutach w 37°C. Jednocześnie okazało się, że frakcja S jest stabilna w szczepie z mutacją w genie *rpoH*, czyli pozbawionym aktywnej podjednostki regulacyjnej σ^{32} (Kucharczyk i wsp., 1991). Założyliśmy, że za usuwanie frakcji S odpowiedzialne są białka szoku termicznego o funkcji białek opiekuńczych i proteaz, których geny znajdują się pod kontrolą σ^{32} . Właśnie wyjaśnieniem tego zagadnienia zajęłam się bezpośrednio po zatrudnieniu w Katedrze Biochemii. Badając proces powstawania i zanikania frakcji S w zmutowanych szczepach *E.coli* pozbawionych proteaz szoku termicznego: Lon, ClpP i HtrA oraz zależnych od ATP białek ClpA, ClpX i ClpB stwierdziliśmy, że charakteryzuje je podwyższony poziom zagregowanych białek oraz wyraźnie opóźnione usuwanie powstałych agregatów. Część wyników uzyskanych w badaniach *in vivo* potwierdziliśmy w doświadczeniach *in vitro* i wykazaliśmy, że zagregowane białka frakcji S są substratami HtrA - proteazy szoku termicznego. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane (Laskowska i wsp., 1996 a - **praca nr 1 pk. II-A, załącznik 4**). W tym samym czasie w Katedrze Biochemii zidentyfikowano dwa główne białka frakcji S – były to IbpA i IbpB (Laskowska i wsp., 1996 b), odkryte kilka lat wcześniej jako białka zasocjowane z ciałami inkluzyjnymi (Allen i wsp., 1992). W roku 1996, po powrocie z urlopu wychowawczego rozpoczęłam badania nad rolą i funkcją tych białek w komórkach bakteryjnych i z powodzeniem prowadzę te badania do dziś.

Początkowo prowadzone przeze mnie doświadczenia dotyczyły badań nad regulacją ekspresji genów *ibpA* i *ibpB*. Oba tworzą operon kontrolowany, tak jak i inne geny szoku termicznego *E. coli*, przez podjednostkę σ^{32} polimerazy RNA. Jednak z doświadczeń jakie prowadziłam wynikało, że nie jest to typowy operon szoku termicznego, ponieważ synteza białek IbpAB zachodziła również w obecności nieaktywnego białka σ^{32} . Analizując sekwencję nukleotydową operonu *ibpAibpB*, stwierdziłam w przestrzeni pomiędzy genami *ibpA* i *ibpB* obecność potencjalnego dodatkowego promotora rozpoznawanego przez inną podjednostkę polimerazy RNA – σ^{54} oraz charakterystycznych dla tego typu promotorów miejsc regulatorowych (wzmacniacza - *enhancera* i miejsca wiązania czynnika IHF). Udało mi się wykazać, że jest to czynny promotor a transkrypcja genu *ibpB* może rozpoczynać się z dwóch miejsc: $\rho\sigma^{32}$ - promotora wspólnego dla obu genów oraz $\rho\sigma^{54}$ - dodatkowego promotora występującego w przestrzeni międzycystronowej. Tym samym, gen *ibpB* stanowi drugi, po opisanym w 1991 roku (Weiner i wsp.) operonie *psp* (*phage shock proteins*), element regulonu szoku termicznego kontrolowanego przez σ^{54} . Wyniki tych badań zostały opublikowane (Kuczyńska-Wiśnik i wsp., 2001 - **praca nr 2, pk II-A, załącznik 4**) oraz przedstawione w pracy doktorskiej pt. „Regulacja transkrypcji operonu szoku termicznego *ibpAibpB* i funkcje białek IbpA i IbpB”, którą obroniłam we wrześniu 2001 roku na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii UG.

Po doktoracie kontynuowałam w Katedrze Biochemii badania nad funkcją białek IbpAB w ramach kolejnych projektów badawczych (załącznik 4, pk II-I 1-5), w których byłam głównym wykonawcą lub wykonawcą. Poza badaniami, których wyniki wchodzą w skład osiągnięcia naukowego uczestniczyłam również w realizacji innych projektów związanych z odpowiedzią komórki bakteryjnej na stres. Między innymi zajęliśmy się wyjaśnieniem efektu działania trimetoprimu na komórki *E. coli*. Trimetoprim stosowany w połączeniu z sulfonamidami to popularny antybiotyk, który blokuje metabolizm folianów a tym samym syntezę nukleotydów i białek. Wykazaliśmy, że w komórkach

bakteryjnych poddanych działaniu trimetoprimu dochodzi do indukcji syntezy białek szoku termicznego - w szczególności IbpAB. Ponieważ IbpAB wiążą się z agregatami białkowymi przypuszczaliśmy, że ich synteza w warunkach stresu folianowego świadczy o pojawieniu się agregatów uszkodzonych białek. Udało się nam takie agregaty wyizolować i stwierdziliśmy, że większość IbpAB pozostaje z nimi związana. Wykazaliśmy więc, że efektem działania trimetoprimu na komórki *E. coli* jest agregacja białek i indukcja syntezy białek szoku termicznego. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane (Laskowska i wsp., 2003 - **praca nr 3, pk II-A, załącznik 4**). W kolejnym projekcie wykorzystaliśmy IbpAB jako markery agregatów, tym razem w badaniu roli białka opiekuńczego GrpE w powstawaniu i usuwaniu zagregowanych białek. GrpE współdziała z białkami DnaK i DnaJ w procesie fałdowania białek a mutacje w genach kodujących te białka wykazują podobne efekty fenotypowe (Liberek i wsp., 1991). Jednak, o ile mutacje w genach *dnaK* czy *dnaJ* powodowały wzrost poziomu wewnątrzkomórkowej agregacji białek i stabilizację agregatów (Kędzierska i wsp., 1999), o tyle w szczepie *grpE280* po szoku termicznym nie byliśmy w stanie wykryć typowych agregatów stosując wcześniejsze metody czyli ultrawierowanie w gradiencie stężeń sacharozy oraz mikroskopię elektronową. Analizując lokalizację białek typowych dla frakcji agregatów czyli IbpAB oraz aldolazy fruktozo 1,6-bifosforanu (Fda) stwierdziliśmy, że w szczepie pozbawionym funkcjonalnego białka GrpE agregaty jednak występują, ale są mniejsze i kosedymentują z frakcją błony zewnętrznej. Jednocześnie w komórkach mutantu *grpE280* zaobserwowaliśmy po szoku termicznym wyższy poziom białek DnaK i DnaJ a także IbpAB, związanych głównie z agregatami. W publikacji zawierającej opisane wyniki (Laskowska i wsp., 2004 - **praca nr 4, pk II-A, załącznik 4**) wysunęliśmy przypuszczenie, że w szczepie *grpE280* powstawanie dużych agregatów jest hamowane przez nadprodukowane białka szoku termicznego, w tym IbpAB.

W trakcie badań nad rolą i właściwościami małych białek szoku termicznego IbpAB nawiązałam współpracę z zespołem prof. K. Liberka z Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, która zaowocowała dwiema wspólnymi pracami (Matuszewska i wsp., 2005 - **praca nr 5** i Ratajczak i wsp., 2010 - **praca nr 7 pk II-A, załącznik 4**). Skoncentrowaliśmy się na wyjaśnieniu mechanizmu współdziałania obu białek ze sobą oraz z systemem białek opiekuńczych DnaK/DnaJ/GrpE. W doświadczeniach *in vitro* wykazaliśmy, że proces refałdowania termicznie zdenaturowanych substratów modelowych przez zależny od ATP system Hsp100-Hsp70 wymaga obecności obu białek IbpAB w trakcie denaturacji. Ponadto pokazaliśmy, że *in vitro* oba białka IbpA i IbpB oddziałują ze sobą bezpośrednio tworząc mieszane kompleksy i modułują swoją aktywność. O ile wiązanie IbpA z substratami zachodziło niezależnie od obecności IbpB, to IbpB wymagało stymulacji przez IbpA. Podjęliśmy się również biochemicznej charakterystyki białka IbpA (Ratajczak i wsp., 2010 - **praca nr 7 pk II-A, załącznik 4**), którego właściwości, w przeciwieństwie do IbpB (Shearstone i Baneyx, 1998), nie były wcześniej badane z uwagi na trudności w oczyszczaniu. Wykazaliśmy, że oczyszczone białko IbpA tworzy protofilamenty, które składają się w dojrzałe fibryle. Tego typu struktury są nietypowe dla małych białek szoku termicznego a ich występowanie potwierdziliśmy również *in vivo*. Przypuszczamy, że fibryle tworzone przez IbpA to nieaktywna forma tego białka, gdyż nie powstawały one w obecności drugiego z małych białek szoku termicznego – IbpB lub substratów czyli zdenaturowanych białek.

Zagadnieniom związanym z budową i funkcją małych białek szoku termicznego ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w procesach chorobowych poświęcona jest praca przeglądowa (Laskowska i wsp., 2010 - **praca nr 8 pk II-A, załącznik 4**) oraz rozdział w książce (Laskowska i Kuczyńska-Wiśnik, 2008 - **praca nr 2 pk II-D, załącznik 4**), natomiast w pracy Skórko-Glonek i wsp., 2010 (**praca nr 3 pk II-D, załącznik 4**) przedstawiliśmy informacje o budowie i funkcji bakteryjnych białek opiekuńczych oraz proteaz.

Uczestniczyłam również we wstępnych pracach nad charakterystyką odpowiedzi szoku termicznego u małżoraczka *Candona rectangulata* występującego naturalnie w zbiornikach Spitsbergenu i charakteryzującego się szybkim przystosowywaniem się do zmiennych warunków termicznych (Wojtasik i Kuczyńska-Wiśnik, 2012 - **praca nr 9 pk II-A, załącznik 4**).

Obok głównego nurtu badań nad rolą białek IbpAB w ochronie komórek *E. coli* przed stresem uczestniczyłam też w innych projektach realizowanych w zespole dr hab. prof. UG Ewy Laskowskiej. Jeden z nich dotyczył badań nad komórkami bakteryjnymi w stacjonarnej fazie wzrostu. Konsekwencją wyczerpania się składników odżywczych jaka wówczas następuje, jest zahamowanie wzrostu bakterii. Towarzyszy temu między innymi obniżenie wierności translacji, co prowadzi do pojawienia się w komórkach nieprawidłowo zwiniętych białek podatnych na agregację (Ballesteros i wsp., 2001). Wykazaliśmy, że w zależności od warunków wzrostu i dostępności tlenu oraz glukozy w komórkach pojawiały się albo nierozpuszczalne kompleksy białka Dps z chromosomalnym DNA albo wieloskładnikowe agregaty nieprawidłowo zwiniętych białek. W agregatach zidentyfikowaliśmy białka uczestniczące w różnorodnych procesach komórkowych, takich jak translacja, metabolizm czy odpowiedź stresowa. Ustaliliśmy również, że w hodowlach buforowanych przez związek osmotycznie czynny, jakim jest kwas 3-N-morfolinopropanosulfonowy (MOPS) spada ilość agregujących białek i nierozpuszczalnych kompleksów Dps-DNA. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w pracy Kwiatkowska i wsp., 2008 (**praca nr 6, pk II-A, załącznik 4**) a także znalazły kontynuację w kolejnym projekcie, w którym analizowaliśmy rolę związków osmotycznie czynnych w powstawaniu i zanikaniu agregatów białkowych w stacjonarnej fazie wzrostu. Dodatkowo skupiliśmy się na komórkach typu *persisters*, czyli subpopulacji obejmującej bakterie o zwolnionym metabolizmie i podwyższonej tolerancji na antybiotyki, które jednak zachowują wrażliwość na leki po przeniesieniu do świeżej pożywki. Obecność patogennych bakterii *persisters* stanowi jedną z przyczyn nieskutecznych terapii antybiotykowych i nawracających zakażeń bakteryjnych, stąd poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów ich powstawania może pomóc w opracowywaniu nowych strategii zwalczania lekoopornych infekcji. Pojawianie się *persisters* to jeden z objawów starzenia się hodowli bakteryjnej (Klapper i wsp., 2007). My natomiast wykazaliśmy, że wzrost liczby *persisters* był skorelowany z poziomem agregatów białkowych pojawiających się w starzejących się hodowlach bakteryjnych. Jednocześnie uzupełnienie pożywki buforem MOPS lub innymi osmolitami, takimi jak trehaloza, betaina czy glicerol w niskich stężeniach hamowało agregację białek i wpływało na obniżenie poziomu komórek typu *persisters*. Odwrotny efekt czyli wzrost poziomu agregatów i *persisters* wywoływało dodanie do pożywki octanu lub wysokich stężeń osmolitów. Zbadaliśmy również wpływ osmolitów na poziom utlenionych białek, zdolność do tworzenia kolonii, poziom ATP i integralność błon, i nie zaobserwowaliśmy korelacji między tymi charakterystycznymi dla starzejących się hodowli

parametrami a poziomem *persisters*. Tak więc nasze wyniki wskazują, że kluczowym etapem w procesie powstawania *persisters* jest pojawianie się nieprawidłowo sfałdowanych białek i ich agregacja. Wyniki tych doświadczeń ukazały się w tym roku w pracy Leszczyńska i wsp., 2013 (**praca nr 10 pk II-A, załącznik 4**).

Obecnie kontynuuję badania nad *persisters* w ramach projektu „Rola acetylacji białek w procesie powstawania komórek *Escherichia coli* typu *persisters* charakteryzujących się tolerancją na antybiotyki” finansowanego przez NCN. Odwracalna acetylacja reszt lizyny to jedna z modyfikacji potranslacyjnych, jakiej ulega około 200 białek w komórkach *E. coli* (Zhang i wsp., 2009). Wpływ tej modyfikacji na procesy fizjologiczne zachodzące w komórkach bakteryjnych jest bardzo słabo poznany. Doświadczenia jakie wykonaliśmy wskazują, że warunki sprzyjające acetylacji, czyli obecność glukozy i octanu, powodują również znaczny wzrost poziomu agregatów białkowych oraz *persisters* w hodowlach stacjonarnych. Zakładamy, że acetylacja reszt lizyny powoduje, że białka stają się podatne na agregację, co prowadzi do ich odwracalnej inaktywacji, hamuje metabolizm i wprowadza komórki w stan uśpienia. Sądzymy również, że deacetylacja białek i usunięcie agregatów może prowadzić do wybudzenia *persisters* a tym samym uwrażliwienia ich na antybiotyki. Moje dalsze plany badawcze dotyczą wyjaśnienia tej hipotezy.

Literatura (wyróżniono prace wchodzące do dorobku habilitanta):

- Allen S.P., Polazzi J.O., Gierse J.K., Easton A.M. (1992) „Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *E. coli*” *J. Bacteriol* 174: 6938-6947
- Ballesteros, M., Fredriksson, A., Hendriksson, J., Nystrom, T. (2001) “Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes” *EMBO J.* 20: 5280-5289
- Kędzierska, S., Staniszevska, M., Węgrzyn, A. Taylor, A. (1999) “The role of DnaK/DnaJ and GroEL/GroES systems in removal of endogenous proteins aggregated by heat-shock from *Escherichia coli*” *FEBS Lett* 446:331–337
- Klapper I., Gilbert P., Ayati B.P., Dockery J., Stewart P.S. (2007) “Senescence can explain microbial persistence” *Microbiology* 153:3623–363
- Kwiatkowska J., Matuszewska E., Kuczyńska-Wiśnik D., Laskowska E. (2008)** “Aggregation of *Escherichia coli* proteins during stationary phase depends on glucose and oxygen availability” *Res Microbiol* 159: 651-657
- Kucharczyk, K., Laskowska, E., Taylor, A. (1991) “Response of *Escherichia coli* cell membranes to induction of lambda *cI857* prophage by heat shock” *Mol Microbiol* 5: 2935-2945
- Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E, Taylor A. (2001)** “Transcription of the *ibpB* heat-shock gene is under control of sigma 32- and sigma 54- promoters, a third regulon of heat shock response” *Biochem Biophys Res Commun* 284: 57-64
- Laskowska E., Kuczyńska-Wiśnik D., Skórko-Glonek J., Taylor A. (1996a)** “Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro” *Mol Microbiol* 22: 555-571
- Laskowska E., Wawrzynów A., Taylor A. (1996 b) „IbpA and IbpB, the new heat shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock” *Biochimie* 78:117-122
- Laskowska E., Kuczyńska-Wiśnik D., Bąk M., Lipińska B. (2003)** “Trimethoprim induces heat shock proteins and protein aggregation in *E. coli* cells” *Curr Microbiol* 47: 286-288
- Laskowska E., Bohdanowicz J., Kuczyńska-Wiśnik D., Matuszewska E., Kędzierska S., Taylor A. (2004)** “Aggregation of heat shock denatured, endogenous proteins and distribution of the IbpA/B and Fda marker proteins in *E. coli* wt and *grpE280* cells” *Microbiol* 150: 247-259
- Laskowska E., Kuczyńska-Wiśnik D. (2008)** “The small heat shock proteins: multifunctional chaperones in Bacteria, Archaea and Eucarya” str. 459-494, w “Heat shock proteins – new research” (ed.: E. Morel, C. Vincent) Nova Science Publishers, Inc.
- Laskowska E, Matuszewska E, Kuczyńska-Wiśnik D. (2010)** “Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases” *Curr Pharm Biotechnol* 11:146-57

- Leszczyńska, D., Matuszewska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., Furmanek-Błaszczak, B., Laskowska, E. (2013)** "The formation of persister cells in stationary-phase cultures of *Escherichia coli* is associated with the aggregation of endogenous proteins" *PLoS ONE* 8 (1), art. no. e54737
- Liberek, K., Marszałek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. Żylicz, M. (1991) "*Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK" *PNAS* 88:2874–2878.
- Matuszewska M., Kuczyńska-Wiśnik D., Laskowska E., Liberek K. (2005)** "The small heat shock protein IbpA of *E. coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state" *J Biol Chem* 280: 12292-8
- Ratajczak E, Stróżecka J, Matuszewska M, Ziętkiewicz S, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E, Liberek K. (2010)** "IbpA the small heat shock protein from *Escherichia coli* forms fibrils in the absence of its co chaperone IbpB" *FEBS Lett* 584:2253-7
- Shearstone J.R., Baneyx F. (1998) "Biochemical characterization of the small heat shock protein IbpB from *Escherichia coli*" *J Biol Chem* 274: 9937-9945
- Skórko-Głonek J., Kuczyńska-Wiśnik D., Żurawa-Janicka D., Matuszewska E., Figaj D., Lipińska B. (2010)** "Molecular chaperones and proteases as suppressors of protein aggregation in Gram-negative bacteria" w „Protein aggregation” (ed. D.A. Stein), Nova Science Publishers, Inc.
- Szpilewska H., Kuczyńska-Wiśnik D. (1993)** „Wielofunkcyjne białko RecA *Escherichia coli* – budowa i funkcje” *Postępy Biochemii* 39 (4) 259-264
- Tamarit J., Cabisco E., Ros J. (1998) "Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress" *J Biol Chem* 273: 3027-3032
- Weiner L., Brissette J.L., Model P. (1991) "Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on sigma54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms" *Genes Dev* 5(10):1912-23
- Wojtasik, B., Kuczyńska-Wiśnik, D. (2012)** "Temperature shock tolerance and heat shock proteins in Arctic freshwater ostracod *Candona rectangulata* - preliminary results" *Pol Polar Res* 33 (2): 199-206
- Zhang J., Sprung R., Pei J., Tan X., Kim S., Zhu H., Liu C.F., Grishin N.V., Zhao Y. (2009) "Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*" *Mol Cell Proteomics* 8(2):215-25

09. 09. 2013 D. Kuczyńska-Wiśnik