

AUTOREFERAT**1. Imię, nazwisko.**

Beata Furmanek-Blaszk

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, listopad 1986

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii, kwiecień 1996. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka bakteriocynty wytwarzanej przez *Staphylococcus sp.* T”.

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

1986 - 1990 - asystent, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii Geografii i Oceanologii, Katedra Biochemii

1990 - 1996 - słuchaczka studium doktoranckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

1996 (czerwiec - wrzesień) - specjalista, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii Geografii i Oceanologii, Katedra Mikrobiologii,

1996 - 2010 - adiunkt, Uniwersytet Gdański Wydział Biologii Geografii i Oceanologii, Katedra Mikrobiologii,

2010 - do chwili obecnej - starszy wykładowca, Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Katedra Mikrobiologii,

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego* 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.):

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić Oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie (załącznik 8)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Struktura genetyczna i właściwości trzech systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu IIS rozpoznających asymetryczne pięcionukleotydowe sekwencje specyficzne.

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

1. **Furmanek B.**, Gromek K., Sektas M., Kaczorowski T. (2001) Isolation and characterization of type IIS restriction endonuclease from *Neisseria cuniculi* ATCC 14688. FEMS Microbiology Letters, 196:171-176 (MNiSW₂₀₁₅ – 20 pkt; IF₂₀₀₁ = 1.806)
2. **Furmanek B.**, Sektas M., Wons E., Kaczorowski T. (2007) Molecular characterization of the methyltransferase M1.NcuI from *Neisseria cuniculi* ATCC 14688. Research in Microbiology, 158:164-174 (MNiSW₂₀₁₅ – 30 pkt; IF₂₀₀₇ = 2.219)
3. **Furmanek-Blaszczak B.**, Boratynski R., Zolcinska N., Sektas M. (2009) M1.MboII and M2.MboII type II methyltransferases: different specificities, the same target. Microbiology, 155:1111-1121 (MNiSW₂₀₁₅ – 30 pkt; IF₂₀₀₉ = 3.025)
4. Katna A., Boratynski R., **Furmanek-Blaszczak B.**, Zolcinska N., Sektas M. (2010) Unbalanced restriction impairs SOS-induced DNA repair effects. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20:30-38 (MNiSW₂₀₁₅ – 20 pkt; IF₂₀₁₀ = 1.224)
5. **Furmanek-Blaszczak B.**, Sektas M. (2015) The SfaNI restriction-modification system from *Enterococcus faecalis* NEB215 is located on a putative mobile genetic element. FEMS Microbiology Letters, 362:fnv028 (MNiSW₂₀₁₅ – 20 pkt; IF₂₀₁₅ = 1.858)

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

Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne (R-M) występują powszechnie w świecie organizmów prokariotycznych. W ich skład wchodzi enzymy o dwóch aktywnościach: endonukleaza restrykcyjna, która rozpoznaje i przecina specyficzne sekwencje DNA oraz metylotransferaza, która chroni przed cięciem DNA poprzez metylację adeniny lub cytozyny w obrębie sekwencji rozpoznawanej (Wilson i Murray, 1991). Genomowy DNA gospodarza jest modyfikowany zaraz po replikacji dzięki aktywności metylotransferazy, co tym samym nadaje oporność na działanie pokrewnej endonukleazy restrykcyjnej. Wnikający do bakterii obcy DNA, nieposiadający specyficznej dla danej komórki metylacji, staje się substratem dla endonukleazy restrykcyjnej. Pomimo faktu, że obydwa enzymy składające się na określony system R-M rozpoznają i wiążą się z taką samą sekwencją specyficzną, analiza porównawcza ich sekwencji aminokwasowych wykazuje niewielki stopień ich podobieństwa (Chandrasegaran i in., 1998). Sugeruje to, że enzymy tworzące dany system R-M wiążą się z DNA w odmienny sposób, tak więc powstały w wyniku niezależnych procesów ewolucyjnych. Główna funkcja, jaką przypisuje się systemom R-M, polega na ochronie bakterii przed wnikającym DNA. Oprócz funkcji ochronnych postuluje się również ich wpływ na zmienność genetyczną bakterii, a także tworzenie barier promujących specjację (Vasu i Nagaraja, 2013).

W oparciu o różnice dotyczące struktury podjednostek, wymagania co do kofaktorów i miejsce cięcia, rozróżnia się cztery podstawowe typy systemów R-M (Roberts i in., 2003). Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą są enzymy systemów R-M klasy II. Do tej pory opisano ponad 3800 endonukleaz należących do tej klasy, rozpoznających około 300 sekwencji specyficznych (Roberts i in., 2015). Systemy R-M klasy II składają się, z nielicznymi wyjątkami, z dwóch strukturalnie i funkcjonalnie niezależnych enzymów: endonukleazy restrykcyjnej i metylotransferazy. Endonukleaza rozpoznaje specyficzną sekwencję nukleotydową, zwykle o długości 4-8 par zasad, i w obecności jonów Mg^{2+} dokonuje cięcia w jej obrębie lub w ściśle określonej od niej odległości. Drugi składnik systemu R-M, metylotransferaza DNA, katalizuje reakcję przeniesienia grupy metylowej z S-adenozylu-L-metioniny na reszty adeniny lub cytozyny, przekształcając je w N⁶-metyloadeninę, N⁴-metylocytozynę lub C⁵-metylocytozynę (Dryden, 1999). Ze względu na dużą różnorodność enzymów R-M typu II podzielono je na podtypy. Jako pierwszą podgrupę wyodrębniono enzymy klasy IIS rozpoznające asymetryczne sekwencje specyficzne. Endonukleaza restrykcyjna przecina DNA w miejscu oddalonym od sekwencji rozpoznawanej o ściśle określoną liczbę par zasad (Roberts i in., 2003). Wśród metylotransferaz klasy IIS można wyróżnić dwie grupy enzymów: (i) duże białka posiadające dwie kopie domen odpowiedzialnych za modyfikację obydwu nici DNA oraz (ii) dwie niezależne metylotransferazy, z których każda modyfikuje jedną nić. Enzymy wchodzące w skład drugiej grupy nie są produktem duplikacji genów, ale zostały nabyte lub podlegały niezależnym procesom ewolucyjnym. Świadczy o tym niewielki stopień podobieństwa tych białek na poziomie struktury pierwszorzędowej (Madhusoodanan i Rao, 2010).

Moje badania prowadzone w Katedrze Mikrobiologii koncentrują się między innymi na systemach R-M typu IIS. Enzymy wchodzące w ich skład mają zdolność do niezwykle precyzyjnego rozpoznawania krótkich, asymetrycznych sekwencji specyficznych. W mojej pracy skupiłam się na izospecyficznych enzymach składających się na system R-M MboII z bakterii *Moraxella bovis* ATCC 10900 oraz system R-M NcuI z bakterii *Neisseria cuniculi* ATCC14688. Systemy te pochodzą z różnych mikroorganizmów ale enzymy, które wchodzą w ich skład rozpoznają identyczną sekwencję nukleotydową 5'-GAAGA-3'/3'-CTTCT-5'. Analiza porównawcza białek tworzących badane systemy R-M miała na celu znalezienie w ich budowie wspólnych elementów strukturalnych i funkcjonalnych jak i wykrycie różnic na poziomie biochemicznym i genetycznym.

Pierwsze badania dotyczyły porównania endonukleazy NcuI (**praca nr 1**) z poznanym wcześniej izoschizomerem MboII (Sektas i in., 1992). W tym celu R.NcuI oczyszczono do

stanu jednorodności stosując standardowe techniki chromatograficzne. Wyznaczona względna masa cząsteczkowa R.NcuI jest zbliżona do masy R.MboII i wynosi około 48 kDa. Ustalono, że R.NcuI podobnie jak R.MboII rozpoznaje pięcionukleotydową sekwencję specyficzną 5'-GAAGA-3'/3'-CTTCT-5' i przecina DNA w odległości 8 i 7 nukleotydów odpowiednio na nici górnej i dolnej. Ze względu na fakt, że endonukleazy restrykcyjne R.MboII i R.NcuI mają podobne właściwości biochemiczne, a także wykazują identyczną specyficzność względem rozpoznawanej sekwencji nukleotydowej, przeprowadzono doświadczenie mające na celu stwierdzenie, czy zachodzi reakcja krzyżowa pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciwko R.MboII a R.NcuI. W tym celu badane enzymy inkubowano z poliklonalnymi przeciwciałami anty-R.MboII. Stwierdzono, że surowica anty-R.MboII jest specyficzna zarówno w stosunku do R.MboII, jak i R.NcuI, co wskazuje na obecność wspólnych determinant antygenowych, a co za tym idzie, na podobieństwo strukturalne badanych białek. Dodatkowym potwierdzeniem tego założenia było porównanie sekwencji aminokwasowej N-terminalnych fragmentów R.NcuI oraz R.MboII wskazujące na wysoki stopień ich identyczności (85%).

Kolejny etap badań polegał na scharakteryzowaniu drugiego elementu systemu R-M NcuI - metylotransferazy M1.NcuI (**praca nr 2**). W tym celu, stosując standardowe techniki chromatograficzne, enzym M1.NcuI został oczyszczony zarówno z bakterii *Neisseria cuniculi* 14688 jak i z bakterii *Escherichia coli* BL21(DE3) zawierających plazmid umożliwiający nadprodukcję metylotransferazy dzięki wykorzystaniu elementów regulatorowych faga T7. Obydwa białka mają podobne właściwości biochemiczne. Stwierdzono, że kationy dwuwartościowe - w tym jony Mg^{2+} - hamują aktywność M1.NcuI, jednakże enzym natywny różni się wrażliwością na jony magnezowe ($IC_{50} = 0.35$ mM) w porównaniu z jego formą zrekombinowaną ($IC_{50} = 10$ mM). Wynika to najprawdopodobniej z faktu, iż białka rekombinowane często ulegają nieprawidłowemu fałdowaniu, co pociąga za sobą powstawanie polipeptydów o obniżonej aktywności. Otrzymane wyniki wskazują, że aktywność restrykcyjna w komórce może być regulowana przez dwuwartościowe jony metali a w szczególności jony magnezu. Z wcześniejszych badań wynika, że endonukleaza restrykcyjna NcuI do przeprowadzenia reakcji cięcia wymaga obecności jonów Mg^{2+} , a z drugiej strony te same jony są silnym inhibitorem M1.NcuI. Wrażliwość enzymu na jony Mg^{2+} może powodować przesunięcie stanu równowagi systemu R-M w kierunku restrykcji DNA, co z kolei zapewnia komórce bakteryjnej skuteczną obronę przed egzogennym DNA. Badania porównawcze wykazały, że M1.NcuI podobnie jak M1.MboII (McClelland i in., 1985) katalizuje reakcję metylacji zewnętrznej adeniny w rozpoznawanej sekwencji

nukleotydowej 5'-GAAG^{m6}A-3'/3'-CTTCT-5'. Obydwa enzymy mają podobne właściwości biochemiczne a ich względne masy cząsteczkowe są zbliżone i wynoszą 32 kDa. Przeprowadzono doświadczenie mające na celu stwierdzenie, czy zachodzi reakcja krzyżowa pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciwko M1.MboII a M1.NcuI. W tym celu jednorodny preparat M1.MboII posłużył jako antygen do szczepienia królików w celu otrzymania poliwalentnej surowicy zawierającej przeciwciała anty-M1.MboII. Stwierdzono, że surowica anty-M1.MboII jest specyficzna zarówno w stosunku do M1.MboII jak i M1.NcuI, co wskazuje na strukturalne podobieństwo badanych enzymów. Biorąc po uwagę zdolność bakterii z rodzaju *Neisseria* jak i *Moraxella* do spontanicznego osiągnięcia stanu kompetencji nie można wykluczyć, iż obecne w nich systemy R-M zostały nabyte z innych gatunków na drodze transferu horyzontalnego.

Równolegle prowadzone były badania mające na celu poznanie struktury genetycznej systemu R-M NcuI. Biorąc pod uwagę częściowo poznaną sekwencję nukleotydową genów tworzących system R-M MboII (Bocklage i in., 1991) a także podobne właściwości biochemiczne badanych enzymów zaprojektowano primery, które wykorzystano w reakcji amplifikacji genu *ncuIR*. Jako matryca posłużył genomowy DNA wyizolowany z bakterii *Neisseria cuniculi* ATCC 14688. Zastosowane podejście pozwoliło na poznanie fragmentu genu *ncuIR*. Do określenia sekwencji pozostałych genów tworzących system R-M NcuI, a także rejonów przylegających, wykorzystano technikę PCR. Geny kodujące enzymy systemów R-M NcuI i MboII są położone blisko siebie w tej samej orientacji w następującej kolejności: *ncuIM2*→*ncuIM1*→*ncuIR* oraz *mboIIM2*→*mboIIM1*→*mboIIR*. Jednakże, według bazy danych enzymów restrykcyjnych REBASE (<http://rebase.neb.com>), w przypadku systemu R-M MboII pomiędzy genami kodującymi metylotransferazy znajduje się fragment DNA o długości 683 pary zasad. Białka wchodzące w skład systemów R-M MboII i NcuI wykazują wysoką identyczność rzędu 90% dla M1.MboII/M1.NcuI, 88% dla M2.MboII/M2.NcuI oraz 87% dla R.MboII/R.NcuI na poziomie sekwencji aminokwasowej. W strukturze metylotransferaz M1.MboII i M1.NcuI stwierdzono obecność dziewięciu wysoce konserwowanych motywów aminokwasowych oraz przypuszczalnej domeny TRD (*ang.* target recognition domain). Organizacja motywów wskazuje na przynależność badanych białek do grupy metylotransferaz N⁶-adeninowych typu β. Zaobserwowano także obniżoną zawartość procentową par G+C genów kodujących enzymy zarówno systemu R-M MboII (32%) jak i NcuI (31.6%) w porównaniu do genomowego DNA *Moraxella bovis* (45%) i *Neisseria cuniculi* (44.5%), co sugeruje nabycie badanych systemów R-M na drodze horyzontalnego transferu genów.

Następny etap obejmował charakterystykę metylotransferaz M2.MboII oraz M2.NcuI (**praca nr 3**). Białka nadprodukowano posługując się prokariotycznym systemem ekspresyjnym wykorzystującym elementy regulatorowe faga T7. M2.MboII oraz M2.NcuI mają podobne właściwości biochemiczne a ich masy cząsteczkowe są zbliżone i wynoszą 32 kDa. Obydwa enzymy katalizują reakcję metylacji wewnętrznej cytozyny w rozpoznawanej sekwencji 5'-GAAGA-3'/3'-CTT^{m4}CT-5'. Jednakże, w przeciwieństwie do metylotransferaz M1.MboII i M1.NcuI, obydwa enzymy posiadają unikalną cechę polegającą na modyfikacji specyficznej sekwencji nukleotydowej znajdującej się na jednoniciowym DNA. Właściwość ta została dotychczas opisana jedynie dla niewielkiej grupy metylotransferaz DNA. Co ciekawe modyfikacja ta odbywa się z wydajnością porównywalną do dwuniciowego substratu. Biologiczne znaczenie tego zjawiska może polegać na umożliwieniu przekazywania plazmidowego DNA pomiędzy bakteriami w formie jednoniciowej, a co za tym idzie kształtowaniu struktury genomów bakteryjnych. Analiza bioinformatyczna M2.MboII i M2.NcuI wykazała obecność wysoce konserwowanych motywów aminokwasowych, których organizacja wskazuje na przynależność badanych białek do grupy metylotransferaz N⁴-cytozynowych typu β. Pomimo faktu, iż M1.MboII i M2.MboII oraz M1.NcuI i M2.NcuI rozpoznają i wiążą się z taką samą sekwencją DNA, analiza porównawcza ich sekwencji aminokwasowych wykazała niewielki stopień podobieństwa (14%) na poziomie sekwencji aminokwasowej. Potwierdzeniem różnic w budowie obydwu metylotransferaz MboII był brak reakcji krzyżowej pomiędzy surowicą anti-M1.MboII a metylotransferazą M2.MboII. Podobny rezultat otrzymano w przypadku metylotransferaz NcuI. Uzyskane wyniki wskazują, iż enzymy te nie są produktem duplikacji genów ale zostały nabyte lub podlegały ewolucji niezależnie.

Cechą wyraźnie odróżniającą system R-M MboII od systemu R-M NcuI jest jego organizacja genetyczna. Nasze badania wykazały, iż pomiędzy genami *mboIIM2* a *mboIIM1* znajduje się fragment DNA o długości 684 pary zasad. Wcześniejsze dane dostępne w bazie REBASE wskazywały, iż rejon ten jest o jeden nukleotyd krótszy. Analiza sekwencji nukleotydowej tego fragmentu DNA ujawniła obecność dwóch otwartych ramek odczytu o długości 654 oraz 375 par zasad charakteryzujących się obniżoną w stosunku do genomowego DNA *M. bovis* ATCC 10900 zawartością procentową par G+C (31%). Za pomocą techniki PCR stwierdzono, iż identyczny fragment DNA znajduje się, w innych szczepach *M. bovis* pochodzących z odległych geograficznie obszarów. Lokalizacja genu *orf654* pomiędzy genami kodującymi metylotransferazy M1.MboII oraz M2.MboII, a także jego występowanie w różnych szczepach *M. bovis* sugeruje, że może mieć on związek z

regulacją ekspresji genów systemu R-M MboII. Odmierna struktura genetyczna badanych systemów wskazuje, że determinanty genetyczne tych metylotransferaz mogły zostać niezależnie od siebie, stopniowo nabyte na drodze horyzontalnego transferu genów.

Większość informacji na temat systemów R-M dotyczy mechanizmów działania i właściwości endonukleaz restrykcyjnych oraz towarzyszących im metylotransferaz, a także ich budowy przestrzennej czy częstości występowania w mikroorganizmach. Niewiele natomiast wiadomo na temat mechanizmów odpowiedzialnych za stabilne utrzymywanie ich aktywności enzymatycznych na zrównoważonym poziomie niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórki. Z tego względu podjęto badania mające na celu poznanie wpływu niepełnego systemu R-M MboII, złożonego z endonukleazy restrykcyjnej MboII i jednej z metylotransferaz MboII, na stabilność genetyczną i żywotność gospodarza (**praca nr 3**). Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja genu *mboIIM1* z własnego promotora zapewnia całkowitą protekcję miejsc rozpoznawanych przez R.MboII, natomiast w przypadku genu *mboIIM2* własny promotor nie wystarcza do pełnej ochrony miejsc rozpoznawanych przez R.MboII. Uzyskuje się ją dopiero poprzez fuzję genu z dodatkowym konstytutywnym promotorem. Ponadto wykazano, że nadprodukcja endonukleazy restrykcyjnej MboII w komórkach *E. coli* jest możliwa jedynie w obecności obydwu metylotransferaz systemu R-M MboII. Brak jednej z aktywności modyfikacyjnej prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy restrykcją a modyfikacją co prowadzi do śmierci komórki.

System R-M MboII składa się z trzech genów kodujących: endonukleazę restrykcyjną oraz dwie metylotransferazy. Metylotransferaza M1.MboII zabezpiecza przed autorestrykcją nić górną, natomiast M2.MboII nić dolną. Konsekwencją braku jednej z metylotransferaz jest stan permanentnej hemimetylacji sekwencji w jednej z kopii potomnych DNA oraz całkowity brak metylacji sekwencji specyficznych w drugiej kopii potomnej po każdej rundzie replikacji. Struktura systemu R-M MboII stwarza możliwość badania wpływu niepełnej metylacji sekwencji specyficznej na poziom autorestrykcji wewnątrzkomórkowej po usunięciu jednej z metylotransferaz. Doświadczenia opisane w **pracy 4** miały na celu zbadanie wpływu niepełnego systemu R-M MboII na zdolność komórki do naprawy uszkodzeń DNA wywołanych działaniem mitomycyny C. Jako źródło niezrównoważonego systemu R-M MboII wykorzystano plazmidy niosące geny *mboIIM2* i *mboIIR* pod kontrolą promotorów P_{lac} , dzięki czemu można było indukować ich ekspresję dodając do hodowli IPTG. Do badań wykorzystano bakterie *E. coli* ER1992 zawierające gen reporterowy *dinD1::lacZ⁺*, którego ekspresja jest uzależniona od komórkowej odpowiedzi SOS. Ponadto, szczep ten jest pozbawiony endonukleaz odpowiedzialnych za restrykcję zmetylowanego

DNA. Zastosowanie niepełnego systemu R-M MboII znajdującego się pod kontrolą indukowanego promotora P_{lac} pozwoliło zbadać wpływ obecności systemu R-M na proces po-replikacyjnej naprawy DNA na skutek uszkodzeń wywołanych działaniem mitomycyny C. W wyniku usuwania i naprawy rejonów DNA zawierających nieuprawnione wiązania kowalencyjne, powstałych pod wpływem działania mitomycyny C, liczba niezmetylowanych rejonów DNA ulegała zwiększeniu co z kolei powodowało większy stopień śmiertelności komórek zawierających system R-M MboII poprzez restrykcję chromosomowego DNA. W miarę upływu czasu wartość współczynnika indukcji SOS zmniejszała się, co wskazywało na zachodzącą naprawę i stopniowo zmniejszającą się liczbę uszkodzonych rejonów DNA. Barwienie preparatów komórek bakteryjnych DAPI oraz analiza stopnia degradacji DNA chromosomowego potwierdziły, że za śmierć komórek odpowiedzialna jest endonukleaza restrykcyjna MboII. Aby zbadać czy zjawisko to ma charakter unikatowy czy uniwersalny, podobny eksperyment wykonano na bakteriach zawierających różne warianty systemu R-M EcoRI, hodując je w warunkach subletalnego stężenia mitomycyny C. Stwierdzono, że naprawa DNA w czasie komórkowej odpowiedzi SOS jest bardziej efektywna w przypadku szczepów pozbawionych systemów R-M klasy II lub zawierających system R-M klasy I, a mniej efektywna w przypadku bakterii ze zlokalizowanym na chromosomie systemem R-M EcoRI, gdzie poziom stężenia obu komponentów białkowych jest bardzo niski. Z naszych badań wynika, że obecność aktywnego systemu R-M typu II może powodować obniżenie wydajności naprawy DNA wywołanej czynnikiem mutagennym (mitomycyna C), a w konsekwencji zmniejszać konkurencyjność takich komórek w stosunku do bakterii pozbawionych systemów R-M klasy II w obecności związków uszkadzających strukturę DNA.

Kontynuując badania nad charakterystyką systemów R-M typu IIS skierowałam swoją uwagę na enzymy wchodzące w skład systemu R-M SfaNI z bakterii *Streptococcus faecalis* NEB215 (**praca nr 5**). Rozpoznają one asymetryczną sekwencję specyficzną 5'-GCATC-3'/3'-CGTAG-5'. Enzym R.SfaNI od wielu lat jest stosowany w biologii molekularnej, a mimo to jego właściwości były słabo poznane. Dodatkową przesłanką do podjęcia badań nad endonukleazą restrykcyjną SfaNI było opracowanie przez pracowników Katedry Mikrobiologii UG metody sekwencjonowania DNA przez kroczenie indeksami wykorzystującej do tego celu enzymy klasy IIS (Gromek i Kaczorowski, 2005). R.SfaNI została oczyszczona z bakterii *Streptococcus faecalis* NEB215 do stanu jednorodności stosując standardowe techniki chromatograficzne. Względna masa cząsteczkowa enzymu wynosi 70 kDa, a jego właściwości biochemiczne są charakterystyczne dla klasycznych

endonukleaz restrykcyjnych klasy II. Preparat R.SfaNI posłużył do oznaczenia pierwszych dwudziestu pięciu aminokwasów N-terminalnej części białka, został również wykorzystany do klonowania systemu R-M SfaNI. Sekwencję genów wchodzących w skład systemu R-M SfaNI oraz rejonów przylegających poznano wykorzystując (i) metodę polegającą na selekcji plazmidów zawierających gen metylotransferazy a więc opornych na trawienie R.SfaNI oraz (ii) technikę PCR. M.SfaNI posiada dwa centra katalityczne, każde prawdopodobnie odpowiedzialne za modyfikację jednej z nici w obrębie rozpoznawanej sekwencji specyficznej. Organizacja motywów wskazuje na przynależność M.SfaNI do grupy metylotransferaz N⁶-adeninowych typu α . Ponadto, w części N-terminalnej M.SfaNI stwierdzono obecność nietypowego dla metylotransferaz motywu helisa-skręt-helisa (*ang.* helix-turn-helix) charakterystycznego dla białek regulatorowych oddziaływujących ze specyficznymi sekwencjami DNA. Analiza sekwencji aminokwasowej R.SfaNI wskazuje na obecność motywu PD-(D/E)XK charakterystycznego dla centrów katalitycznych endonukleaz restrykcyjnych zależnych od jonów Mg²⁺. Do systemu R-M SfaNI od końca 5' przylega gen transpozazy natomiast od końca 3' kompleks genów *ccr* kodujących rekombinazy serynowe CcrA oraz CcrB. Enzymy te umożliwiają wycinanie i specyficzną integrację z chromosomem bakteryjnym kaset SCCmec - mobilnych elementów genetycznych zwykle zawierających gen *mecA* warunkujący oporność gronkowców na metycylinę. Fakt występowania w sąsiedztwie systemu R-M SfaNI ruchomych elementów genetycznych może sprzyjać jego rozprzestrzenianiu się za pomocą horyzontalnego transferu genów. Innym argumentem przemawiającym za obcym pochodzeniem systemu R-M SfaNI w bakteriiach *Streptococcus faecalis* NEB215 jest niższa w porównaniu z genomowym DNA gospodarza zawartość procentowa par G+C rejonów kodujących.

Najważniejsze odkrycia cyklu prac składających się na moje osiągnięcie naukowe to:

- wykazanie wysokiego stopnia podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego pomiędzy enzymami wchodzącymi w skład systemów R-M MboII oraz NcuI
- określenie specyficzności M2.MboII oraz M2.NcuI; oba enzymy należą do nielicznej grupy metylotransferaz zdolnych do modyfikacji jednoniciowego DNA
- poznanie organizacji genetycznej trzech systemów R-M typu IIS wraz z rejonami przylegającymi; w obrębie systemu R-M MboII zidentyfikowano gen *orf654*, którego produkt białkowy może mieć związek z regulacją ekspresji i/lub funkcjonowania genów systemu R-M MboII
- wykazanie różnic w procentowej zawartości par G+C genów kodujących enzymy badanych systemów R-M w stosunku do genomowego DNA; sugeruje to, że ich sekwencje nie

ewoluowały jednocześnie z genomem gospodarza, w którym obecnie występują, a najprawdopodobniej zostały nabyte z otoczenia w wyniku transferu horyzontalnego

- wykazanie, że ekspresja genu *mboIIM1* z własnego promotora zapewnia całkowitą protekcję sekwencji 5'-GAAGA-3'/3'-CTTCT-5', natomiast w przypadku genu *mboIIM2* własny promotor nie wystarcza do zainicjowania ekspresji zapewniającej pełną ochronę sekwencji specyficznej; naprawa uszkodzeń DNA wywołanych działaniem mitomycyny C w komórkach zawierających niepełny system R-M MboII, składający się z genów *mboIIM2* oraz *mboIIR*, powoduje zwiększenie liczby niezmetylowanych miejsc wrażliwych na endonukleazę MboII i podniesienie poziomu autorestrykcji

- wykrycie w sąsiedztwie systemu R-M SfaNI genów kodujących rekombinazy serynowe CcrA i CcrB które umożliwiają horyzontalny transfer DNA opisany dotychczas jedynie dla kaset SCCmec; lokalizacja systemu R-M SfaNI może ułatwiać jego rozprzestrzenianie się wśród bakterii

Przeprowadzone przeze mnie badania porównawcze pozwoliły na odnalezienie w budowie enzymów tworzących systemy R-M wspólnych specyficznych elementów strukturalnych i funkcjonalnych, co w rezultacie prowadzi do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie białek o identycznej specyficzności. Uzyskane wyniki wskazują na kluczowe znaczenie horyzontalnego transferu genów w kształtowaniu struktury genomów bakteryjnych.

LITERATURA

- Bocklage H., Heeger K., Muller-Hill B. (1991) Cloning and characterization of the MboII restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* 19:1007-1013
- Chandrasegaran S., Smith H.O. (1988) Amino acid sequence homologies among twenty-five restriction endonucleases and methylases. In *Structure & expression, vol. 1: From proteins to ribosomes* Sarma R.H. and Sarma M.H.(Eds.) Adenine Press, New York
- Dryden D.T.F. (1999) Bacterial DNA methyltransferases. In *S-adenosyl Methionine Dependent Methyltransferases: Structure and Function*. Cheng X. and Blumenthal R.M. (Eds),. World Scientific Publishing, New York, NY
- Gromek K., Kaczorowski T. (2005) DNA sequencing by indexer walking. *Clin. Chem.* 51:1612-1618
- Madhusoodanan U.K, Rao D.N. (2010) Diversity of DNA methyltransferases that recognize asymmetric target sequences. 45:125-145
- McClelland M., Nelson M., Cantor C.R. (1985) Purification of MboII metylase (GAAGmA) from *Moraxella bovis*: site specific cleavage of DNA at nine and ten base pair sequences. *Nucleic Acids Res.* 13: 7171-7182
- Roberts R.J., Belfort M., Bestor T et al., (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 31:1805-1812

Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2015) REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. 42:D298-D299

Sektas M., Kaczorowski T., Podhajska A. (1992) Purification and properties of the MboII, a class-IIS restriction endonuclease. Nucleic Acids Res. 20:433-438

Vasu K., Nagaraja V. (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77:53-72

Wilson G.G., Murray N.E. (1991) Restriction and modification systems. Annu. Rev. Genet. 25:585-627

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

W roku 1986 ukończyłam studia biologiczne na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę magisterską „Wpływ rifampicyny na replikację plazmidów lambda i pSC101 w mutantach *dnaA*ts *Escherichia coli*” wykonałam w Katedrze Biologii Molekularnej po kierunkiem prof. dr hab. Karola Taylora. Wyniki pracy magisterskiej były prezentowane na IX Zjeździe Polskiego Towarzystwa Genetycznego w 1986 roku w Gdańsku. W tym samym roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta w Katedrze Biochemii UG i rozpoczęłam badania w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Alinę Taylor. Celem mojej pracy było opracowanie wydajnej metody oczyszczania bakteryjnej alkalicznej fosfatazy, otrzymanie koniugatu alkalicznej fosfatazy z kozimi przeciwciałami, a także sprawdzenie przydatności enzymu w teście immunodiagnostycznym ELISA. W efekcie alkaliczna fosfataza znalazła się w ofercie handlowej Domu Handlowego Nauki, a sprzedaż enzymu wspierała finanse Katedry Biochemii.

W roku 1990 zostałam słuchaczką Studium Doktoranckiego Chemii UG i pod opieką kierownika Katedry Mikrobiologii UG prof. dr hab. Anny Podhajskiej rozpoczęłam badania nad bakteriocyną gronkowcową – stafylokokcyną T wytwarzaną przez szczep *Staphylococcus cohnii* T. Oczyszczony do stanu jednorodności preparat bakteriocyny posłużył do poznania jej właściwości, mechanizmu działania oraz spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane (**praca nr 3, pkt. IIA, załącznik 4**) oraz przedstawione w pracy doktorskiej pod tytułem „Charakterystyka bakteriocyny wytwarzanej przez *Staphylococcus sp. T*”, którą obroniłam w kwietniu 1996 roku na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii. Prowadzone w tym czasie badania pozwoliły mi zdobyć wiedzę i doświadczenie naukowe oraz opanować metody biologii molekularnej, co zaowocowało powstaniem dwóch publikacji (**praca nr 1, praca nr 2, pkt. IIA, załącznik 4**). Badania dotyczące opracowania wydajnej metody oczyszczania stafylokokcyny T są nadal kontynuowane we współpracy z pracownikami Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Gdańskiej.

W roku 1998 zmieniłam przedmiot moich zainteresowań naukowych i rozpoczęłam badania nad zjawiskiem izospecyficzności enzymów wchodzących w skład systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu IIS. Obok głównego nurtu badań mających na celu porównanie systemów R-M MboII i NcuI realizowałam kolejny projekt dotyczący ich lokalizacji genetycznej. Geny niektórych systemów R-M są położone na mobilnych elementach genetycznych takich jak naturalne plazmidy. Z danych literaturowych wynika, że większość szczepów *M. bovis* posiada kilka plazmidów, aczkolwiek niewiele jest dostępnych informacji na temat genów, które kodują. W trakcie badań prowadzonych nad *M. bovis* ATCC 10900 stwierdzono, że szczep ten posiada przynajmniej dwa plazmidy; jeden o dużej masie cząsteczkowej, natomiast drugi o wielkości 4658 par zasad został nazwany pMbo4.6 (**praca nr 5, pkt. IIA, załącznik 4**). W sekwencji plazmidu pMbo4.6 można wyróżnić moduł odpowiedzialny za transfer koniugacyjny oraz moduł replikacyjny. Otrzymane wyniki sugerują, że plazmid pMbo4.6 może mobilizować do transferu koniugacyjnego drugi plazmid znajdujący się w komórkach *M. bovis* ATCC10900, którego struktura nie została jeszcze poznana.

Badania związane z klonowaniem genów systemu R-M MboII pozwoliły na opracowanie metody klonowania za pomocą której możliwe jest wizualne odróżnienie powstałych rekombinantów od pseudorekombinantów w których wektor uległ odtworzeniu do pierwotnej formy (**praca nr 7, pkt. IIA, załącznik 4**). Polega ona na umieszczeniu w miejscu wielokrotnego klonowania genu metylotransferazy *mboIIM2*, którego ekspresja jest letalna dla bakterii. Dzieje się to na skutek częściowej degradacji chromosomu za sprawą uaktywniania się endonukleaz metylazo-zależnych przecinających DNA w obrębie sekwencji ze zmetylowanymi nukleotydami. W metodzie tej gen *mboIIM2* pod nieobecność polimerazy T7 nie ulega pełnej ekspresji, wywołując efekt subletalny, przejawiający się spowolnionym wzrostem komórek oraz formowaniem się mniejszych kolonii w porównaniu do bakterii, które zawierają cząsteczki plazmidowe z docelowym fragmentem DNA. Metoda ta jest z powodzeniem stosowana w naszym laboratorium do klonowania fragmentów DNA.

W trakcie badań nad enzymami wchodzącymi w skład systemu R-M MboII otrzymaliśmy rekombinanta będącego mutantem delecyjnym w genie kodującym metylotransferazę M2.MboII (**praca nr 9, pkt. IIA, załącznik 4**). W wyniku ekspresji genu *mboIIM2ΔA356* powstaje zgodnie z przewidywaną ramką odczytu krótszy od białka typu dzikiego produkt o masie 14.5 kDa oraz niespodziewanie pełna forma aktywnego białka o masie 32 kDa. Otrzymane wyniki wskazują, iż na skutek niskiej wierności polimerazy RNA faga T7 w tworzeniu mRNA, dochodzi do unikatowego w komórkach bakteryjnych zjawiska

przesunięcia ramki odczytu. Polega ono na wielokrotnych delecjach bądź insercjach nukleotydowych w homopolimerycznych sekwencjach bogatych w A/U w mRNA prowadzących do syntezy zmodyfikowanych białek. Wyselekcjonowano cztery takie miejsca w genie *mboIIM2*, w których dochodzi do podwyższonego poziomu wprowadzania błędów typu insercja/delecja (InDel). Powstała w ten sposób fenotypowo heterogenna mieszanina funkcjonalnych i niefunkcjonalnych białek przyczynia się do zwiększenia potencjału ewolucyjnego gospodarza. Wykazaliśmy, że ten mechanizm epigenetycznej naprawy dotyczy również genów *mboIIM1* i *ncuIM2*.

W międzyczasie podjęłam współpracę z zespołem badawczym Pracowni Biochemii Mikroorganizmów Katedry Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego gdzie prowadzone są badania nad indukcją stresu oksydacyjnego w komórkach bakteryjnych wywołanego działaniem wielu niespokrewnionych chemicznie antybiotyków. Trimetoprim, kwas nalidiksowy, rifampicyna, kanamycyna oraz streptomycyna w stężeniach subletalnych hamują powstawanie biofilmu *E. coli*. Wywołany w komórkach bakteryjnych stres oksydacyjny prowadzi do nadprodukcji tryptofanazy, co skutkuje wzrostem poziomu indolu (**praca nr 4, pkt. II A, załącznik 4**). Brałam również udział w badaniach nad komórkami przetrwałymi (*ang. persisters*), stanowiącymi niewielką część populacji bakteryjnej (około 1%), które pozostają żywotne w obecności letalnej dawki antybiotyku. Stwierdziliśmy, że wzrost liczby komórek przetrwałych jest skorelowany z pojawianiem się nieprawidłowo sfałdowanych białek i ich agregacją (**praca nr 6, pkt. II A, załącznik 4**).

Prowadzone przeze mnie badania miały również na celu poszukiwania endonukleaz restrykcyjnych o dotychczas nieopisanych specyficznościach, które mogłyby posłużyć jako nowe narzędzie w biologii molekularnej (**praca nr 8, pkt. II A, załącznik 4**). W wyniku analiz próbek wody pobranych z rzeki Nil wyizolowano szczep *Aeromonas hydrophila*. Bakteria jest oporna na większość antybiotyków β -laktamowych, a także wytwarza pięć czynników wirulencji pomocnych w kolonizacji gospodarza i przeżyciu bakterii w zmieniającym się środowisku naturalnym. W trakcie badań zaobserwowałam w komórkach *A. hydrophila* obecność niewielkiego plazmidu, który został nazwany pAhy2.5. Ze względu na fakt, iż plazmidy stanowią pulę dodatkowej informacji genetycznej, która daje bakteriom w pewnych warunkach selekcyjną przewagę, pAhy2.5 został zsekwencjonowany. Z przeprowadzonych badań wynika, iż bakterie *A. hydrophila* są źródłem dwóch endonukleaz restrykcyjnych nazwanych AehI oraz AehII, jednakże enzymy te przecinają DNA identycznie jak odpowiednio XhoI oraz StuI.

PLANY BADAWCZE

Obecnie w ramach projektu badawczego „Nowy mechanizm regulacji ekspresji genów kodujących system restrykcyjno-modyfikujący MboII z *Moraxella bovis*”, (2012/07/BNZ2/01782) prowadzę badania stopnia polimorfizmu determinant genetycznych systemu R-M MboII. Doświadczenia wskazują, że znajdujący się w obrębie systemu R-M MboII rejon intergenowy o długości 684 pary zasad zawiera otwartą ramkę odczytu, której produktem jest białko ORF654 o masie 25 kDa. Metodą degradacji Edmana potwierdziliśmy wynikającą ze znanej sekwencji nukleotydowej sekwencję aminokwasową N-terminalnej części białka. W proksymalnej części genu *orf654* zidentyfikowaliśmy strukturę określaną jako "spinka do włosów" (*ang.* hairpin) poprzedzoną sekwencją 5'-GAAGA-3'/5'-TCTTC-3' rozpoznawaną przez enzymy systemu R-M MboII. Struktura ta z reguły odgrywa ważną rolę w procesie regulacji ekspresji informacji genetycznej. Przypuszczamy, że umiejscowienie genu *orf654* nie jest przypadkowe. Za faktem tym przemawia obecność genu *orf654* we wszystkich ponad stu zbadanych dotychczas szczepach *Moraxella bovis* pochodzących z Argentyny, Australii, Japonii Nowej Zelandii, Stanów Zjednoczonych i Tajlandii posiadających system R-M MboII. Lokalizacja genu *orf654*, a przede wszystkim pełna ramka odczytu dająca produkt białkowy sugeruje, że białko to może mieć związek z regulacją ekspresji i/lub funkcjonowania genów systemu R-M MboII. W ramach realizowanego projektu badamy czy i w jaki sposób białko ORF654 wpływa na osiągnięcie stanu równowagi pomiędzy aktywnością modyfikującą, stanowiącą ochronę dla komórki, a restrykcją DNA. Mamy nadzieję, że poznanie funkcji i mechanizmu działania białka ORF654 wpłynie na zrozumienie regulacji tego procesu na poziomie molekularnym. Istotność tego mechanizmu wykracza poza badania nad genetyką *M. bovis*, gdyż poznanie nowego białka może dać wgląd w nowe, nieznane dotąd aspekty regulacji o kluczowym dla ekspresji DNA znaczeniu.

Beata Furmanek-Błaszczak