

1. Imię i nazwisko

**Monika Katarzyna Glinkowska**

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

2003 r – stopień doktora nauk biologicznych nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. „Mechanizm aktywacji promotora  $p_R$  oraz regulacji replikacji DNA plazmidów  $\lambda$  przez białko DnaA”. Promotor: Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

1999 r – dyplom magistra biotechnologii uzyskany na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (wówczas – Akademii Medycznej) i Uniwersytetu Gdańskiego

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

2003 r – obecnie Adiunkt na Wydziale Biologii UG, początkowo w Katedrze Biologii Molekularnej, a po przekształceniu jednostki - w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii.

02-12.2011 – postdoctoral researcher, Jacobs University, Bremen, Niemcy

4. Wskazanie osiągnięcia<sup>1</sup> 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. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe składa się z czterech publikacji oryginalnych oraz jednej monografii, dotyczących mechanizmów regulacji procesów związanych z odczytywaniem i powielaniem informacji zawartej w genomowym DNA w komórkach bakteryjnych. Opatrzono je wspólnym tytułem: „**Biologia genomowego DNA w ujęciu systemowym, czyli jak komunikacja pomiędzy komponentami i procesami w komórce bakteryjnej zapewnia efektywne odczytanie informacji genetycznej oraz przekazanie jej komórkom potomnym.**”

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

1. Szambowska A, Pierechod M, Węgrzyn G, Glinkowska M (2011) Coupling of

transcription and replication machineries in lambda DNA replication initiation: evidence for direct interaction of Escherichia coli RNA polymerase and the lambdaO protein. *Nucleic Acids Res* **39**: 168–177, doi:10.1093/nar/gkq752.

IF<sub>2017/2018</sub> – 11.561; pkt MNiSW<sub>2013-2016</sub> – 40; liczba cytowań – 14\*

*Indywidualny wkład w autorstwo: 40%, główny pomysłodawca projektu, wykonawca jednego z doświadczeń, współudział w interpretacji danych, autor manuskryptu, kierownik grantu, z którego sfinansowano badania, autor korespondujący*

2. Sobetzko P, Glinkowska M, Travers A, Muskhelishvili G (2013) DNA thermodynamic stability and supercoil dynamics determine the gene expression program during the bacterial growth cycle. *Mol Biosyst* **9**: 1643–1651, doi:10.1039/c3mb25515h.

IF<sub>2017/2018</sub> – 2.759; pkt MNiSW<sub>2013-2016</sub> – 30; liczba cytowań – 31

*Indywidualny wkład w autorstwo: 30%, jeden z pomysłodawców projektu, wykonawca 99% części doświadczalnej, współautor manuskryptu*

3. Olszewski P, Szambowska A, Barańska S, Narajczyk M, Węgrzyn G, Glinkowska M (2014) A dual promoter system regulating lambda DNA replication initiation. *Nucleic Acids Res* **42**: 4450–4462, doi:10.1093/nar/gku103.

IF<sub>2017/2018</sub> – 11.561; pkt MNiSW<sub>2013-2016</sub> – 40; liczba cytowań – 5

*Indywidualny wkład w autorstwo: 40%, główny pomysłodawca projektu, wykonawca części doświadczeń oraz analizy i interpretacji danych, autor manuskryptu, kierownik grantu, z którego sfinansowano badania, autor korespondujący*

4. Tymecka-Mulik J, Boss L, Maciąg-Dorszyńska M, Rodrigues JFM, Gaffke L, Wosinski A, Cech GM, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G, Glinkowska M (2017) Suppression of the *Escherichia coli* dnaA46 mutation by changes in the activities of the pyruvate-acetate node links DNA replication regulation to central carbon metabolism. *PLoS One* **12**: 1–24, doi:10.1371/journal.pone.0176050.

IF<sub>2017/2018</sub> – 2.766; pkt MNiSW<sub>2013-2016</sub> – 40; liczba cytowań – 3

*Indywidualny wkład w autorstwo: 30%, główny pomysłodawca projektu i wykonawca analizy danych, wykonawca części doświadczeń, autor manuskryptu, autor korespondujący*

5. Glinkowska M, Boss L, Węgrzyn G (2014) DNA replication control in microbial cell factories. Springer Briefs in Microbiology, Springer, ISBN-13: 978-3319105321.

IF<sub>2017/2018</sub> –0 (monografia); pkt MNiSW<sub>2013-2016</sub> - 20;

*Indywidualny wkład w autorstwo: 50%, główny pomysłodawca koncepcji manuskryptu, główny autor manuskryptu,*

Sumaryczny Impact Factor przedstawionych prac - 28,647; sumaryczna liczba punktów MNiSW - 170, liczba cytowań wg Web of Science - 53

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

#### Cel naukowy przedstawionych prac

Celem prac składających się na niniejsze osiągnięcie naukowe było poznanie sieci wzajemnych oddziaływań pomiędzy właściwościami i architekturą genomowego DNA, kompleksami białkowymi prowadzącymi procesy replikacji DNA i transkrypcji oraz metabolizmem komórkowym, a także wyjaśnienie regulacyjnej roli tych powiązań dla kluczowych procesów życiowych – ekspresji genów oraz powielenia genomowego DNA w celu przekazania go organizmom potomnym.

W poniższej prezentacji osiągnięcia naukowego przedstawiłam swoje dotychczasowe dokonania, ich znaczenie oraz perspektywy, jakie wytworzyły one dla moich przyszłych samodzielnych badań, a także cele naukowe, jakie wyznaczyłam sobie na najbliższą przyszłość.

#### Wprowadzenie

Genomowy DNA jednego z modelowych organizmów bakteryjnych – *Escherichia coli*, składa się z nieco ponad 4,5 miliona par zasad i ponad 4000 genów. Jego długość więcej niż tysiącrotnie przekracza najdłuższy wymiar pałeczkowatej komórki. Ponadto, komórki *E. coli* są zdolne do bardzo szybkich zmian stanu fizjologicznego w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, manifestujących się uruchomieniem odmiennych programów ekspresji genów i zmianami parametrów cyklu komórkowego. Fakty te wskazują na konieczność istnienia mechanizmów, które temu – wydawałoby się – stosunkowo prostemu organizmowi pozwalają na wytworzenie charakterystycznego fenotypu w określonych warunkach, spośród niezliczonych możliwości składu i aktywności poszczególnych komponentów komórkowych. Mechanizmy te muszą pozwalać komórce na koordynację, czyli zapewnienie spójności działania różnych procesów, dzięki której zmiana czynnika środowiskowego wywołuje reakcję całej sieci powiązanych ze sobą komponentów, doprowadzając w efekcie do określonych zmian parametrów fizjologicznych.

Podejście redukcjonistyczne w biologii pozwala na identyfikację i charakterystykę poszczególnych komponentów systemu ożywionego, a nawet ich interakcji, lecz dostarcza niewielu informacji o emergentnych cechach systemu (ang. *emergent properties*), które z tych powiązań wynikają. Podejście systemowe lub holistyczne, najczęściej poprzez obserwację wielu komponentów jednocześnie, pozwala na wysuwanie wniosków i tworzenie testowalnych eksperymentalnie modeli dotyczących skomplikowanych powiązań i wynikających z nich właściwości w układach ożywionych. Owe powiązania czynią organizm żywy autopoietycznym systemem, zdolnym do reakcji jako jedność na otaczające środowisko. W swoich pracach stosowałam obydwa podejścia badawcze w celu poszukiwania odpowiedzi na następujące pytania, dotyczące procesów zachodzących na DNA genomowym bakterii:

1. W jaki sposób program transkrypcji genów jest koordynowany ze zmieniającymi się warunkami środowiska?
2. W jaki sposób replikacja DNA chromosomalnego jest koordynowana ze wzrostem i podziałami komórkowymi?
3. Jaki udział w tej regulacji mają fizyczne właściwości DNA i struktura genomów?

Chromosomalny DNA jest długim i dość sztywnym polimerem zbudowanym z nukleotydów, składającym się z dwóch antyrównoległych nici tworzących podwójną helisę. Właściwości fizyczne danego fragmentu DNA takie jak jego temperatura topnienia, zdolność do tworzenia krzywizn lub innych struktur zależą od składu i sekwencji par zasad (G, A, T, C) (Travers & Muskhelishvili, 2015). Cechy te wpływają bezpośrednio na możliwości oddziaływania białek z DNA. Wpływ ten jest tym mocniejszy, im bardziej dane białko do wiązania DNA wykorzystuje tzw. odczyt niebezpośredni, czyli rozpoznaje raczej określoną architekturę DNA niż jego sekwencję (Koudelka *et al*, 2006; Fogg *et al*, 2012; Muskhelishvili & Travers, 2016; Noy *et al*, 2016). Właściwości termodynamiczne danej sekwencji DNA decydują również o łatwości topnienia, czyli ilości energii wymaganej do rozplecenia nici DNA w jej obrębie, co ma znaczenie w przypadku procesów, których niezbędnym etapem jest częściowe rozdzielenie nici DNA – replikacji DNA i transkrypcji (Muskhelishvili & Travers, 2014; Dorman & Dorman, 2016; Nigatu *et al*, 2016). Z długości i sztywności cząsteczki DNA, a także z konieczności rozplatania nici w przebiegu wspomnianych procesów wynikają dodatkowe konsekwencje: w gęstym środowisku cytoplazmy maszyna transkrypcyjna i replikacyjna wprowadza zmiany w topologii DNA – dodatkowe skręty helisy w kierunku zgodnym z jej naturalnym przebiegiem (pozytywne superskręty) przed polimerazą RNA lub DNA, i skręty w kierunku odwrotnym (negatywne superskręty) za syntetyzującymi enzymami. Superskręty skutkują napięciem torsyjnym w DNA, mogą ułatwiać (negatywne) lub utrudniać (pozytywne) jego rozplecenie, wpływać na tworzenie określonych struktur przestrzennych lub wzajemne położenie sekwencji, np. w wyniku tworzenia pętli lub plektonemów (Travers & Muskhelishvili, 2005, 2015). Oznacza to również, że organizacja sekwencji DNA w genomie oraz ich aktualna topologia efektywnie kształtuje oddziaływanie białko-DNA i możliwość tworzenia kompleksów białkowych (Muskhelishvili & Travers, 2014, 2016). Homeostatyczna regulacja poziomu superskręcenia DNA w komórkach bakteryjnych jest prowadzona przez enzymy zwane topoizomerazami, u *E. coli* są to głównie: topoizomeraza I, która relaksuje negatywne superskręty oraz gyraza – wprowadzająca negatywne superskręty na

koszt hydrolizy ATP. Superskręcenie można również potraktować jako formę zmagazynowanej w DNA energii, co w połączeniu z zależnością aktywności gyrazy od stosunku ATP/ADP, wskazuje na bezpośrednie powiązanie pomiędzy stanem energetycznym komórki, topologią DNA i regulacją procesów komórkowych przebiegających na DNA – transkrypcją i replikacją DNA.

W upakowaniu długiej cząsteczki DNA w komórce *E. coli* uczestniczą tzw. białka oddziałujące z nukleoidem (Nucleoid Associated Proteins, NAPs), do których należą przede wszystkim Fis, HU, IHF, H-NS. Białka te, w wyniku wprowadzanych zagięć, nawijania DNA lub łączenia sąsiednich fragmentów poprzez tworzenie mostków uczestniczą nie tylko w upakowaniu DNA lecz również w regulacji procesów replikacji DNA i transkrypcji (Dorman, 2014). Chromosomalny DNA *E. coli* jest ponadto zorganizowany w 4 makrodomeny: Ori (zawierająca *origin* replikacji *oriC*), Ter (zawierająca *terminus* replikacji), Left (lewa) i Right (prawa), przy czym dwoma pierwszymi zawiadują specyficzne systemy składające się z białka i rozpoznawanych przez nie sekwencji (odpowiednio: *MaoP/maoS*, *MatP/matS*). Pomędzy domeną Ori, a lewą i prawą znajdują się dwa rejony nieustrukturyzowane (Messerschmidt & Waldminghaus, 2014; Badrinarayanan *et al*, 2015). Organizacja ta wpływa na komórkową lokalizację, segregację i choreografię ruchów chromosomu w rosnącej komórce.

Jak wspomniano wyżej, superskręcenie DNA oddziałuje na proces inicjacji transkrypcji. Dzieje się tak ponieważ lokalna architektura DNA wpływa na oddziaływanie polimerazy RNA z elementami -10 i -35 promotora oraz na rozplatanie nici podczas tworzenia kompleksu otwartego – niezbędnego etapu inicjacji transkrypcji. Ponadto, topologia DNA może wzmacniać lub osłabiać oddziaływanie białkowych aktywatorów lub represorów transkrypcji z DNA, wpływając na ich funkcję. Warto podkreślić w tym miejscu, że zależność pomiędzy procesem transkrypcji a superskręceniem jest dwustronna, ponieważ z jednej strony topologia DNA odciska swoje piętno na efektywności inicjacji transkrypcji i regulacji danego promotora, z drugiej zaś – podczas elongacji transkrypcji polimeraza RNA zmienia lokalnie superskręcenie DNA (Muskhelishvili *et al*, 2010). Co istotne, chromosom bakteryjny jest zorganizowany w ok 400 mikrodomen o wielkości ok 10 kbp, w obrębie których może dochodzić do swobodnej dyfuzji superskrętów, w tworzeniu granic mikrodomen uczestniczą m.in. NAPs. Oznacza to również, że obecność aktywnego promotora oddziałuje na architekturę DNA sąsiadujących rejonów, w tym innych promotorów i elementów genetycznych w obrębie 10 kbp. Biorąc pod uwagę, że efekt, jaki zmiana topologii DNA wywiera na dany rejon DNA zależy od jego sekwencji, otrzymujemy zamknięty system wzajemnych zależności pomiędzy sekwencją DNA, zgromadzoną w nim energią w postaci superskręcenia oraz procesem transkrypcji (Muskhelishvili *et al*, 2010). Innymi słowy, można powiedzieć, że DNA koduje dwa rodzaje informacji – pierwszy rodzaj zawarty jest w układzie par zasad, drugi – w przestrzennej strukturze zaś regulacja ekspresji genów może być w pewnej mierze emergentną właściwością systemu, wynikającą z wyżej wymienionych zależności (Muskhelishvili & Travers, 2013, 2014; Travers & Muskhelishvili, 2013). Pomimo poznania tych wielostronnych zależności pomiędzy procesem transkrypcji a własnościami DNA, znaczenie zmian architektury DNA dla globalnej regulacji ekspresji genów pozostaje słabo poznane. Ponadto, niejasne pozostaje również znaczenie struktury genomu, tzn. układu genów i ich wzajemnej orientacji na koordynację ekspresji genów poprzez sprzężone z transkrypcją superskręcenie DNA (Transcription-Coupled DNA Supercoiling, TCDS) (Meyer & Beslon, 2014; Sobetzko, 2016; Meyer *et al*, 2018; Houdaigui *et al*, 2019). Wiele danych wskazuje również, że

TCDS może oddziaływać na elementy regulujące replikację DNA, takie jak *origin* replikacji.

Jedną z moich prac wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia koncentruje się na zbadaniu, czy organizacja i właściwości sekwencji genomu *E. coli* oraz zmiany superkręcenia DNA mają istotny wpływ na globalną regulację programu transkrypcji podczas zmian faz wzrostu hodowli bakteryjnej (Sobetzko i wsp.; 2013). W dwóch innych, staraliśmy się z kolei zgłębić mechanizm oddziaływania transkrypcji z sąsiadujących promotorów na aktywność *origin* replikacji, wykorzystując jako model replikon bakteriofaga  $\lambda$  (Szambowska i wsp., 2011; Olszewski i wsp. 2014). Dokładniej wyniki tych pracy zostały omówione poniżej.

Kolejnym kluczowym zagadnieniem związanym z biologią genomowego DNA, którego zrozumienie jest klasycznym przedmiotem badań biologii systemowej jest kontrola cyklu komórkowego bakterii. Na cykl życiowy komórki bakteryjnej składa się jej wzrost (w przybliżeniu podwojenie masy i objętości), powielenie materiału genetycznego i jego segregacja do formujących się komórek potomnych oraz podział komórki matczynej, który w efekcie prowadzi do powstania dwóch niemal identycznych komórek-córek. Szybko rosnące bakterie, jak *E. coli*, potrafią przeprowadzić całą wyżej opisaną sekwencję zdarzeń w 20 min, pomimo że sama synteza pełnej kopii ich chromosomalnego DNA trwa ok. 40 min. Jest to możliwe dzięki rozpoczynaniu kolejnej rundy replikacyjnej przed ukończeniem poprzedniej, przy zachowaniu zasady, że replikacja inicjowana jest raz na cykl komórkowy (raz pomiędzy kolejnymi podziałami). Innymi słowy, komórka *E. coli* w warunkach zapewniających szybki wzrost prowadzi syntezę chromosomów który odziedziczą jej córki i wnuczki. Rosnące w bogatej pożywce komórki *E. coli* są również większe i zawierają więcej DNA, RNA oraz białek na komórkę niż te hodowane w ubogich podłożach. Przy maksymalnym tempie wzrostu komórka może zawierać nawet 16 replikujących się chromosomów (Willis & Huang, 2017). Już w latach 60 ubiegłego wieku stwierdzono, że rozmiar komórki *E. coli*, a także np. zawartość rybosomalnego RNA (rRNA) wykazują liniowy wzrost wraz ze zwiększającym się tempem jej wzrostu, niezależnie od konkretnego składu odżywczej pożywki (Schechter *et al*, 1958). Badania prowadzone w latach 70 wykazały ponadto, że w przedziale czasów generacji 20-60 min, okres potrzebny do syntezy całego chromosomu i podziału komórki (C+D) jest mniej więcej stały i wynosi 60 min. W powiązaniu z informacjami dotyczącymi rozmiaru i składu komórki podczas wzrostu w warunkach zapewniających różne jego tempo, doprowadziło to do sformułowania modelu kontroli replikacji DNA, według którego komórki *E. coli* rozpoczynają replikację DNA przy stałym stosunku masy (objętości) do liczby znajdujących się w nich *origin* (Cooper & Helmstetter, 1968; Donachie, 1968). Hipotezę tę potwierdziły ostatnio wysokoprzepustowe badania, w których przyglądano się parametrom wzrostu i cyklowego dużej liczby pojedynczych komórek (Wallden *et al*, 2016). Pomimo kilkudziesięciu lat badań oraz rozwoju technologii nadal nie znamy odpowiedzi na kilka istotnych pytań, dotyczących koordynacji cyklu komórkowego. Nie wiadomo między innymi, w jaki sposób informacja o osiągnięciu krytycznej objętości komórki jest przekazywana do maszyneryi replikacyjnej, decydując o momencie inicjacji replikacji. Niejasne jest również, co decyduje o momencie podziału komórki, a tym samym – o jej rozmiarze. Wyniki badań z kilku ostatnich lat wskazują jednak, że w kontrolę zarówno replikacji DNA jak i podziału mogą być zaangażowane bezpośrednio czynniki metaboliczne, przekazujące do aparatu podziałowego informację o stanie metabolicznym komórki.

W jednej z prac składających się na przedstawione do oceny osiągnięcie badałam powiązanie jednego z istotnych szlaków metabolicznych (szlak syntezy octanu) z regulacją replikacji DNA. Obecnie, w ramach dwóch kierowanych przeze mnie projektów naukowych kontynuuję badania nad oddziaływaniem białek replikacyjnych z enzymami metabolicznymi oraz metabolitami w komórkach *E. coli*. Wyniki przedstawione we wspomnianej wyżej pracy, a także cele projektów zostały przedstawione bardziej szczegółowo poniżej.

### Uzyskane rezultaty i ich znaczenie

Opisaną wyżej tematyką zaczęłam zajmować się w ramach pierwszego kierowanego przeze mnie grantu, finansowanego przez ówczesne Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pt. „Aktywacja transkrypcyjna rejonu *origin* – uniwersalny mechanizm regulacji inicjacji replikacji DNA?” (44140/B/P01/2007/33). W projekcie tym postawiliśmy dwa główne pytania o mechanizmy oddziaływania promotorów faga  $\lambda$   $p_R$  (1) i  $p_O$  (2) na proces inicjacji replikacji DNA z *origin* tego wirusa.

Podobnie jak w przypadku inicjacji replikacji DNA bakterii, synteza kopii genomowego DNA faga  $\lambda$  rozpoczyna się od rozpoznania *origin* i rozplecenia DNA w rejonie bogatym w pary AT przez białko inicjatorowe, u faga zwane  $\lambda O$ . Do utworzonego kompleksu otwartego przyłączają się następnie oddziałujące ze sobą fagowe białko  $\lambda P$  i helikaza DnaB gospodarza – *E. coli*. Do dalszego rozplatania DNA przez helikazę, umożliwiającego aktywność maszynerii replikacyjnej, niezbędna jest rearanzacja kompleksu  $\lambda O$ - $\lambda P$ -DnaB przez białka opiekuńcze DnaK, DnaJ i GrpE, co skutkuje uwolnieniem helikazy DnaB spod hamującego wpływu  $\lambda P$ . Wiadomo również, że do aktywności *ori $\lambda$*  *in vivo* oraz *in vitro*, przy syntezie DNA z zastosowaniem ekstraktu komórkowego, niezbędna jest aktywność promotora  $p_R$ .  $p_R$  położony jest powyżej *origin* replikacji, lecz można zastąpić go innym, również usytuowanym poniżej *ori* promotorem, jeśli transkrypcja rozpoczynająca się z niego biegnie w stronę od miejsca startu replikacji (Taylor & Wegrzyn, 1995). Ponadto, na inicjację replikacji z *ori $\lambda$*  wywiera także wpływ aktywność promotora  $p_O$ , leżącego w obrębie początku genu *O* i skierowanego przeciwnie do  $p_R$ .

W pierwszej pracy, opublikowanej w ***Nucleic Acids Research*** (w której jestem autorem korespondującym) wykazaliśmy, że inicjatorowe białko  $\lambda O$  oddziałuje bezpośrednio z polimerazą RNA (RNAP) *E. coli*. Oddziaływanie pomiędzy podjednostką  $\beta$  RNAP a  $\lambda O$  jest wzmacniane w obecności aktywnej gyrazy, wprowadzającej negatywne superskręty w DNA w miejsce pozytywnych, akumulujących się przed transkrybującą polimerazą. Ponadto, uzyskaliśmy wyniki sugerujące, że interakcja z RNAP może wpływać na konformację oligomeru białka inicjatorowego. Na podstawie tych rezultatów zaproponowaliśmy model, w którym bezpośrednie oddziaływanie z RNAP wzmacnia wiązanie  $\lambda O$  do rozpoznawanych przez to białko sekwencji i wspomaga proces aktywacji *origin* replikacji przez transkrypcję z promotora  $p_R$ . Oddziaływanie z  $\lambda O$  wywołuje zaginanie DNA i wzmacnianie zależnego od transkrypcji superskręcenia DNA (Leng & McMacken, 2002; Leng *et al.*, 2004), a to z kolei wpływa na oddziaływania  $\lambda O$  w obrębie oligomeru i z RNAP. Zaproponowaliśmy także, że interakcja maszynerii replikacyjnej faga z polimerazą RNA gospodarza może mieć znaczenie w czasoprzestrzennej organizacji syntezy potomnych genomów wirusa. Uzyskane rezultaty wskazują

również na wpływ superskręcenia DNA na tworzenie kompleksów białkowych (Szambowska i wsp., 2011).

W kolejnej pracy opublikowanej w *Nucleic Acids Research* (jestem w niej również autorem korespondującym) wykazaliśmy, że skierowany konwergentnie do  $p_R$  promotor  $p_O$  zmniejsza ilość transkryptów rozpoczynających się z  $p_R$  i przechodzących przez rejon *ori $\lambda$* . Najprawdopodobniej oddziaływanie to zachodzi na drodze interferencji transkrypcji, tzn. blokady, jaką stanowi związana z  $p_O$  RNAP lub zderzenia syntetyzujących RNA polimeraz. Stwierdziliśmy jednak, że mimo negatywnego wpływu na transkrypcję z  $p_R$ , niezbędną do aktywacji *origin*, brak funkcjonalnego promotora  $p_O$  wpływa negatywnie na efektywność inicjacji replikacji z *ori $\lambda$* . Zależność tę wykazaliśmy zarówno dla sztucznych replikonów opartych na *ori $\lambda$* , jak i w przypadku kompletnego genomu wirusa. Mutacja w promotorze  $p_O$  skutkująca osłabionym powinowactwem RNAP, powodowała zmiany w kontroli replikacji sugerujące osłabione oddziaływanie białka inicjatorowego z *origin* replikacji i zwiększoną multimeryzację i niestabilność replikonów z *ori $\lambda$* . Na podstawie tych wyników zaproponowaliśmy model, w którym interferencja transkrypcji pomiędzy promotorem  $p_R$  i  $p_O$  reguluje poziom transkrypcji przechodzącej przez *origin* i zapobiega konfliktowi pomiędzy maszyną transkrypcyjną (RNAP) i kompleksem replikacyjnym, skutkującą niestabilnością tego ostatniego.

Uzyskane w ramach wspomnianego wyżej grantu wyniki mają znaczenie ogólnobiologiczne, gdyż wskazują w jaki sposób procesy transkrypcji i replikacji mogą na siebie wzajemnie wpływać i jak te wzajemne zależności wykorzystywane są w komórce w strategiach regulacyjnych. Podobne powiązania obserwuje się w komórkach eukariotycznych. Dotyczy to zarówno globalnej koordynacji transkrypcji i replikacji w fazie S, wpływu superskręcenia DNA na formowanie i aktywność kompleksów białkowych i oddziaływania polimerazy RNA na topologię DNA, zjawiska interferencji transkrypcji, a także konfliktów pomiędzy maszyną transkrypcyjną i replikacyjną.

Co ważne, wyniki te stanowiły inspirację dla dr Pawła Olszewskiego, autora drugiej pracy, do stworzenia pierwszego własnego grantu badawczego, którego celem było poznanie reguł rządzących zjawiskiem interferencji transkrypcji i możliwości wykorzystania go do regulacji syntetycznych promotorów. Dla mnie zaś, były one zachętą do głębszego zainteresowania rolą struktury chromosomalnego DNA w regulacji procesów. W związku z tym, podjęłam współpracę z ekspertem w tej dziedzinie – Prof. Georgim Muskhelishvilim z Jacobs University w Bremen (Niemcy).

W ramach stażu doktorskiego w grupie Prof. Georgiego Muskhelishvilięgo, podjęłam badania dotyczące powiązania pomiędzy strukturą genomu, rozumianą jako układ i właściwości sekwencji genów, zmianami topologii DNA w komórce *E. coli*, a regulacją ekspresji genów w przebiegu zmian fazy wzrostu hodowli bakteryjnej. W celu zgłębienia tych zależności współuczestniczyłam w stworzeniu ogólnej koncepcji, a także zaplanowałam i wykonałam część biologiczną badań omówionych poniżej, które stały się podstawą pracy opublikowanej w *Molecular BioSystems*, gdzie jestem drugim autorem.

Podczas fazy logarytmicznego wzrostu w bogatej pożywce, komórki *E. coli* charakteryzują się szybkim tempem przyrostu masy, wiążącym się z wysokim poziomem ekspresji rRNA i obecnością wielu replikujących się ekwiwalentów chromosomów. Za globalny poziom transkrypcji odpowiedzialna jest wówczas przede wszystkim polimeraza RNA powiązana z podjednostką  $\sigma^{70}$ , która warunkuje rozpoznanie sekwencji promotorowych. W miarę zwiększania się ilości komórek



bakteryjnych w hodowli, dochodzi do spadku ilości składników odżywczych i gromadzenia szkodliwych produktów metabolizmu, co powoduje uruchomienie strategii przetrwania. Następuje wówczas tzw. przejście w fazę stacjonarną, odznaczającą się zahamowaniem wzrostu, replikacji DNA i podziałów komórkowych, uruchomieniem ekspresji genów odpowiedzialnych za przetrwanie niekorzystnych warunków i spadkiem produkcji składników rybosomów. Wiadomo również, że wraz ze zmniejszającym się potencjałem energetycznym komórki podczas przejścia do fazy stacjonarnej, dochodzi do spadku ogólnego poziomu negatywnego superskręcenia chromosomalnego DNA i uruchomienia transkrypcji genów odczytywanych przez polimerazę RNA powiązaną z podjednostką  $\sigma^S$ . Co ciekawe, układ genów w osi *origin-terminus* w kuliście zamkniętym chromosomie  $\gamma^-$  i  $\alpha$ -proteobakterii jest wysoce konserwowany, zaś geny niezbędne do szybkiego wzrostu sytuują się głównie w pobliżu *origin* replikacji, podczas gdy te powiązane z fazą stacjonarną – w rejonie *terminus*. W prowadzonych przeze mnie badaniach, zadaliśmy pytanie, czy zmiany w globalnym programie transkrypcji genów w przebiegu różnych faz wzrostu są powiązane z ich położeniem względem osi *ori-ter*, właściwościami fizycznymi ich sekwencji oraz zależnością ich promotorów od poziomu superskręcenia DNA. W celu uzyskania odpowiedzi, wykonałam analizę transkryptomyczną mRNA wyizolowanego z komórek *E. coli* rosnących w bogatej pożywce, pobieranych co 10 min w przedziale czasowym od odmłodzenia hodowli (0 min) do późnej fazy stacjonarnej (430 min). Podczas analizy danych stwierdziliśmy, że sekwencja chromosomalnego DNA *E. coli* i innych  $\gamma^-$ -proteobakterii, odznacza się gradientem termodynamicznej stabilności w osi *ori-ter*, tzn. energia potrzebna do rozplecenia DNA jest wyższa dla sekwencji sąsiadujących z *origin* i ulega obniżeniu w miarę zbliżania się do *terminus*. Wykazaliśmy, że w momencie wejścia hodowli bakteryjnej w fazę logarytmicznego wzrostu, znaczącemu podwyższeniu ulega ekspresja genów w obrębie makrodomen Ori oraz nieustrukturyzowanych rejonów flankujących tę domenę. Przeciwnie, podczas wejścia w fazę stacjonarną, podwyższonej ekspresją charakteryzują się geny w makrodomenie Ter. Następnie porównaliśmy czasowy poziom ekspresji genów z fizycznymi właściwościami ich sekwencji oraz wrażliwością ich promotorów na poziom superskręcenia DNA, znaną z wcześniejszych badań. Stwierdziliśmy, że czasoprzestrzenny program transkrypcji w odniesieniu do całego chromosomu koreluje z wrażliwością promotorów na poziom superskręcenia DNA i termodynamicznymi właściwościami ich sekwencji. W fazie logarytmicznego wzrostu ulegają bowiem ekspresji przede wszystkim geny, których promotory są aktywowane przez podwyższone negatywne superskręcenie DNA, zaś ich sekwencje odznaczają się wysoką stabilnością termodynamiczną. Analizując funkcjonalne znaczenie tych korelacji stwierdziliśmy, że czas transkrypcji z tych promotorów pokrywa się z aktywnością genów kodujących białka zaangażowane w procesy anaboliczne oraz z wysoką konsumpcją tlenu przez komórki bakteryjne. Przeciwna sytuacja ma miejsce podczas wejścia komórek w fazę stacjonarną. Wówczas ekspresji ulegały głównie geny kataboliczne, preferencyjnie aktywowane w warunkach obniżonego poziomu superskręcenia DNA, o sekwencjach wykazujących niską termostabilność. Na podstawie tych wyników zaproponowaliśmy model, w którym przedstawiliśmy chromosomy jako termodynamiczne maszyny, transformujące energię na informację, odczytywaną przez maszynę transkrypcyjną. W modelu tym, statyczne (fizyczne) i dynamiczne (powiązane ze zmieniającym się poziomem superskręcenia DNA) właściwości sekwencji ulegających transkrypcji są powiązane z ich funkcjonalną rolą. Zapewnia to czasoprzestrzenną koordynację ekspresji genów w przebiegu różnych faz wzrostu.

Innymi słowy, można powiedzieć, że w toku ewolucji genom bakterii został ukształtowany w taki sposób, że układ genów i fizyczne właściwości ich sekwencji współdziałają w koordynacji ekspresji w przebiegu różnych faz wzrostu, zaś czynnikiem sprzęgającym globalny program transkrypcji ze stanem fizjologicznym komórki jest zmienna topologia DNA.

Wyniki te mają znaczenie w zrozumieniu roli strukturalnego komponentu we właściwościach kodujących DNA. O ile powiązanie pomiędzy strukturą a funkcją białek jest stosunkowo dobrze poznane i nadal intensywnie badane, niewiele wiadomo o analogicznej zależności w przypadku DNA. Znajomość tych zależności jest ważna nie tylko z poznawczego punktu widzenia, gdyż dotyczy materiału genetycznego wszystkich (poza niektórymi wirusami) organizmów, ale może mieć duże znaczenie praktyczne w biologii syntetycznej, podczas konstruowania kontrolowanych obwodów genetycznych, a także całych syntetycznych chromosomów.

Oprócz komunikacji pomiędzy stanem fizjologicznym komórki a procesami transkrypcji i replikacji DNA, zachodzącej za pośrednictwem zmian topologii DNA, liczne dane literaturowe wskazują na możliwość bezpośredniego udziału enzymów metabolicznych w regulacji tych procesów, zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych. U bakterii wykazano między innymi istnienie kilku enzymów regulujących główne białko uczestniczące w podziale FtsZ, w sposób zależny od poziomu istotnych metabolitów. Ponadto, powiązania genetyczne sugerowały możliwość bezpośredniej regulacji replikacji DNA poprzez zmiany w aktywności enzymów metabolicznych lub poziomu metabolitów. Komunikacja przy pomocy tych dwóch ostatnich czynników mogłaby sprzęgać podziały komórkowe oraz replikację DNA ze wzrostem komórki (Glinkowska *et al*, 2015).

W ramach badań podjętych po zakończeniu stażu doktorskiego stwierdziliśmy, że zmiany w obrębie węzła metabolicznego wiążącego przemianę pirogronianu, acetylo-CoA i octanu wpływają na kontrolę replikacji DNA w komórkach *E. coli*. Wykazaliśmy, że różnorodne zmiany w komórce, związane z zaburzeniem enzymów uczestniczących w tych przemianach, takie jak zmiany poziomu acetylacji białek, potencjału oksydoredukcyjnego komórki, odpowiedź stresowa – najprawdopodobniej będąca wynikiem podniesienia poziomu alarmonu odpowiedzi ścisłej – ppGpp (czterofosforanu guanozyny), wpływają na mechanizmy kontrolne inicjacji replikacji DNA związane z białkiem DnaA. Wyniki te zostały przedstawione w pracy opublikowanej w ***PLoS One***, w której jestem autorem korespondującym. Dalsze badania wskażą konkretne procesy, które leżą u podstaw komunikacji pomiędzy tymi parametrami komórki a maszyną prowadzącą proces replikacji DNA w komórkach *E. coli*.

Znane dotychczas powiązania pomiędzy transkrypcją, replikacją DNA, topologią chromosomu oraz metabolizmem komórki, a także moje wyniki przedstawiłam szczegółowo w monografii pt. „***DNA replication control in microbial cell factories***”. W tej pracy zaproponowaliśmy też kilka hipotez i dalszych kierunków badawczych dotyczących tych zagadnień. Wyniki publikowane przez inne grupy badawcze w ostatnich latach świadczą o niesłabnącym zainteresowaniu tymi tematami.

#### Dalsze plany badawcze

Wyniki badań zawarte w pracach składających się na przedłożone do oceny osiągnięcie, stanowiły dla mnie podstawę do stworzenia kolejnych projektów, uzyskania ich finansowania, a także rozwinięcia współprac międzynarodowych.

Obecnie, wraz z zespołem, kończę realizację projektu, którego celem było określenie sieci oddziaływań, jakie tworzą białka replikacyjne *E. coli* z pozostałymi składnikami proteomu w różnych warunkach wzrostu. Motywacją do podjęcia się tego zadania był, ponownie, pozostający bez definitywnej odpowiedzi problem: w jaki sposób inicjacja replikacji DNA tej modelowej bakterii jest powiązana ze wzrostem komórki bakteryjnej w trakcie cyklu komórkowego. Hipoteza, która legła u podstaw projektu zakładała, że koordynacja ta jest w istocie emergentną właściwością systemu, jakim jest komórka bakteryjna i wynika z licznych powiązań pomiędzy najważniejszymi modułami procesów komórkowych takimi jak replikacja, metabolizm, synteza powłok komórkowych, synteza białek. W tej komunikacji mogą uczestniczyć bezpośrednie interakcje czynników replikacyjnych z białkami, których główne funkcje zaangażowane są w pozostałe moduły.

W celu identyfikacji sieci oddziaływań białko-białko posłużyliśmy się opublikowaną wcześniej metodą wykorzystującą sekwencyjną chromatografię powinowactwa. Umożliwia ona wyizolowanie białek wraz z ich interaktantami przy jednoczesnym obniżeniu niespecyficznego oddziaływań. Składniki kompleksu są następnie identyfikowane z użyciem spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS).

Zidentyfikowaliśmy w ten sposób oddziaływanie pomiędzy kilkoma białkami replikacyjnymi lub odpowiedzialnymi za syntezę nukleotydów a enzymami metabolicznymi, białkami odpowiedzialnymi za syntezę zewnętrznej błony bakteryjnej oraz regulatorami potranslacyjnych modyfikacji białek. Obecnie charakteryzujemy funkcjonalne znaczenie tych interakcji. Potencjalnie każda z nich może stać się podstawą nowej, interesującej ścieżki badawczej w nieodległej przyszłości. W ramach wymienionego wyżej projektu zidentyfikowaliśmy także oddziaływanie pomiędzy białkiem replikacyjnym DiaA i prekursorem rdzenia lipopolisacharydu – sedoheptulozo-7-fosforanem (S7P) i zaproponowaliśmy mechanizm regulacji replikacji przez ten metabolit. S7P jest nie tylko substratem w pierwszym etapie syntezy bakteryjnego LPS, ale również metabolitem pośrednim w szlaku pentozofosforanowym zaangażowanym w produkcję pentoz wchodzących w skład nukleotydów. Metabolit ten mógłby funkcjonować jako mechanizm sprzęgający ze sobą syntezę zewnętrznych powłok komórki bakteryjnej, produkcję deoksyrybonukleotydów i replikację. Manuskrypt prezentujący wyniki dotyczące oddziaływania DiaA-S7P jest obecnie w rewizji w *Nature Communications*. Część zawartych w nim wyników posłużyła jako punkt wyjścia do napisania nowego projektu, który został sfinansowany przez NCN (OPUS nr UMO-2017/27/B/NZ2/00747). Badania zaplanowane w ramach nowego grantu będą prowadzić do określenia mechanizmu, w jaki oddziaływanie DiaA-S7P mogłoby regulować proces inicjacji replikacji, a także do określenia zmian metabolicznych komórek *E. coli* w przebiegu cyklu komórkowego. W obu opisanych projektach pełnię funkcję kierownika.

Podczas realizacji tych badań nawiązałam również współpracę z Prof. Torstenem Waldminghausem z Center for Synthetic Microbiology i Philipps University w Marburgu (Niemcy). Jest on ekspertem w tematyce budowy chromosomu i replikacji

DNA bakterii i korzystamy z jego doświadczenia w celu rozwijania swojego warsztatu badawczego.

Współpracuję również z dr Manuelem Banzhafem z University of Birmingham (Wielka Brytania). W ramach tej współpracy rozwijamy projekt zmierzający do zbadania mechanizmów regulujących cykl komórkowy u patogennej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Zamierzamy w tym celu posłużyć się m.in. wysokoprzepustową techniką – odwróconą chemogenomiką, w której nasz partner jest ekspertem. Zdobytą wiedzę planujemy wykorzystać do opracowania wysokoprzepustowych testów pozwalających na poszukiwanie związków hamujących replikację DNA lub podziały komórkowe.

Niedawno podjęłam również współpracę z dr Samem Meyerem z University of Lyon (Francja), dzięki której będę kontynuować badania nad zależnością pomiędzy strukturą chromosomu a globalną regulacją transkrypcji. Wspólnie planujemy rozszerzyć zakres stosowanych modeli badawczych i, oprócz *E. coli*, wykonać również eksperymenty na roślinnym patogenie *Dickeya dadantii*, u którego również stwierdzono znaczący udział topologii DNA w regulacji ekspresji genów podczas zakażenia gospodarza. Badania te będą zmierzały do określenia udziału w globalnej regulacji ekspresji genów - zmian lokalnej topologii DNA, wynikających z superskręcenia generowanego przez proces transkrypcji i wzajemnego położenia promotorów. Dr Sam Meyer jest ekspertem w modelowaniu tych procesów i dzięki tej współpracy możliwe będzie stworzenie modelu opisującego ilościowo ten rodzaj regulacji.

### Literatura

Badrinarayanan A, Le TBK, Laub MT (2015) Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 171–199, doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125211.

Cooper S, Helmstetter CE (1968) Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* **31**: 519–540, doi:10.1016/0022-2836(68)90425-7.

Dorman CJ (2014) Function of nucleoid-associated proteins in chromosome structuring and transcriptional regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **24**: 316–331, doi:10.1159/000368850.

Dorman CJ, Dorman MJ (2016) DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophys Rev* **8**: 209–220, doi:10.1007/s12551-016-0205-y.

Fogg JM, Randall GL, Pettitt BM, Sumners DWL, Harris SA, Zechiedrich L (2012) Bullied no more: When and how DNA shoves proteins around. *Q Rev Biophys* **45**: 257–299, doi:10.1017/S0033583512000054.

Glinkowska M, Boss L, Węgrzyn G (2015) DNA Replication Control in Microbial Cell Factories BT - DNA Replication Control in Microbial Cell Factories. M. Glinkowska, L. Boss, and G. Węgrzyn, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–36.

Houdaigui B El, Forquet R, Hindré T, Schneider D, Nasser W, Reverchon S, Meyer S

(2019) Bacterial genome architecture shapes global transcriptional regulation by DNA supercoiling. doi:10.1101/561423.

Koudelka GB, Mauro SA, Ciubotaru M (2006) Indirect Readout of DNA Sequence by Proteins: The Roles of DNA Sequence-Dependent Intrinsic and Extrinsic Forces. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **81**: 143–177, doi:10.1016/S0079-6603(06)81004-4.

Leng F, Amado L, McMacken R (2004) Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *J Biol Chem* **279**: 47564–47571, doi:10.1074/jbc.M403798200.

Leng F, McMacken R (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9139–9144, doi:10.1073/pnas.142002099.

Messerschmidt SJ, Waldminghaus T (2014) Dynamic organization: Chromosome domains in escherichia coli. *J Mol Microbiol Biotechnol* **24**: 301–315, doi:10.1159/000369098.

Meyer S, Beslon G (2014) Torsion-Mediated Interaction between Adjacent Genes. *PLoS Comput Biol* **10**: doi:10.1371/journal.pcbi.1003785.

Meyer S, Reverchon S, Nasser W, Muskhelishvili G (2018) Chromosomal organization of transcription: in a nutshell. *Curr Genet* **64**: 555–565, doi:10.1007/s00294-017-0785-5.

Muskhelishvili G, Sobetzko P, Geertz M, Berger M (2010) General organisational principles of the transcriptional regulation system: a tree or a circle? *Mol Biosyst* **6**: 662–676, doi:10.1039/b909192k.

Muskhelishvili G, Travers A (2013) Integration of syntactic and semantic properties of the DNA code reveals chromosomes as thermodynamic machines converting energy into information. *Cell Mol Life Sci* **70**: 4555–4567, doi:10.1007/s00018-013-1394-1.

Muskhelishvili G, Travers A (2014) Order from the order: How a spatiotemporal genetic program is encoded in a 2-D genetic map of the bacterial chromosome. *J Mol Microbiol Biotechnol* **24**: 332–343, doi:10.1159/000368852.

Muskhelishvili G, Travers A (2016) The regulatory role of DNA supercoiling in nucleoprotein complex assembly and genetic activity. *Biophys Rev* **8**: 5–22, doi:10.1007/s12551-016-0237-3.

Nigatu D, Henkel W, Sobetzko P, Muskhelishvili G (2016) Relationship between digital information and thermodynamic stability in bacterial genomes. *Eurasip J Bioinforma Syst Biol* **2016**: 1–13, doi:10.1186/s13637-016-0037-x.

Noy A, Sutthibutpong T, A. Harris S (2016) Protein/DNA interactions in complex DNA topologies: expect the unexpected. *Biophys Rev* **8**: 233–243, doi:10.1007/s12551-016-0208-8.

Schechter M, Maaloe O, Kjeldgaard NO (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* **19**: 592–606, doi:10.1099/00221287-19-3-592.

Sobetzko P (2016) Transcription-coupled DNA supercoiling dictates the chromosomal arrangement of bacterial genes. *Nucleic Acids Res* **44**: 1514–1524, doi:10.1093/nar/gkw007.

Taylor K, Wegrzyn G (1995) Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 109–119, doi:10.1111/j.1574-6976.1995.tb00192.x.

Travers A, Muskhelishvili G (2005) DNA supercoiling - A global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* **3**: 157–169, doi:10.1038/nrmicro1088.

Travers A, Muskhelishvili G (2015) DNA structure and function. *FEBS J* **282**: 2279–2295, doi:10.1111/febs.13307.

Travers AA, Muskhelishvili G (2013) DNA thermodynamics shape chromosome organization and topology. *Biochem Soc Trans* **41**: 548–553, doi:10.1042/BST20120334.

W. D. Donachie (1968) Relationship between Cell Size and Time of Initiation of DNA Replication. *Nature* **219**: 1077–1079.

Wallden M, Fange D, Lundius EG, Baltekin Ö, Elf J (2016) The Synchronization of Replication and Division Cycles in Individual *E. coli* Cells. *Cell* **166**: 729–739, doi:10.1016/j.cell.2016.06.052.

Willis L, Huang KC (2017) Sizing up the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol* **15**: 606–620, doi:10.1038/nrmicro.2017.79.

s

##### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W 1999 r. ukończyłam studia magisterskie na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed. Pracę magisterską wykonałam pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Dotyczyła ona wyjaśnienia, dlaczego cykl lityczny bakteriofaga  $\lambda$  nie zachodzi w jednym ze szczepów *E. coli* pozbawionym profaga Rac i niosącym dodatkowo mutację w genie kodującym białko inicjatorowe DnaA. Wcześniejsze hipotezy tłumaczące to zjawisko sugerowały, że gen lub geny kodowane przez profaga Rac zastępują funkcję białka DnaA w replikacji faga  $\lambda$ , zaś w przypadku dysfunkcji zarówno profaga Rac, jak i DnaA replikacja DNA faga  $\lambda$  jest zablokowana. Eksperymenty przeprowadzone w ramach mojej pracy magisterskiej wykazały jednak, że ta inhibicja rozwoju faga była charakterystyczna tylko dla konkretnego szczepu *E. coli*. Okazało się, że zjawisko to było związane z obecnością profaga P1 i jego systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego, zaś ani geny profaga Rac, ani aktywność białka DnaA nie są niezbędne do produkcji potomnych genomów faga  $\lambda$ . Wyniki te zostały opublikowane w piśmie **Genetics** (Glinkowska i wsp., 1999).

W 1999 r. rozpoczęłam studia doktoranckie na ówczesnym Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii UG. Badania będące podstawą mojej pracy doktorskiej wykonywałam pod kierunkiem Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Dotyczyły one mechanizmu regulacji transkrypcji z promotora  $p_R$  faga  $\lambda$  przez białko inicjatorowe replikacji gospodarza – DnaA. Temat ten był interesujący z kilku powodów. Po

pierwsze, funkcja białka DnaA jako czynnika transkrypcyjnego została wcześniej opisana dla kilku genów, lecz mechanizm działania, zarówno w przypadku aktywacji jak i represji pozostawał nieznany. Po drugie regulacja aktywności  $p_R$  przez DnaA następowała przez wiązanie do sekwencji położonych poniżej promotora. Był to jeden z pierwszych regulatorów tego typu opisanych u bakterii, których czynniki transkrypcyjne zwykle wiążą się powyżej lub w obrębie sekwencji promotorowej. Po trzecie, temat ten ukazywał molekularne mechanizmy przystosowania pasożyta do gospodarza.

Wcześniejsze badania wykazały, że DnaA stymuluje transkrypcję z promotora  $p_R$ , a jego funkcja jest niezbędna do propagacji sztucznych replikonów opartych na *ori* $\lambda$  w komórkach *E. coli*. W przypadku wirusa, brak aktywności DnaA wpływa na sposób replikacji jego DNA. W mojej pracy wykazałam, że DnaA – w zależności od stężenia – aktywuje lub hamuje transkrypcję z promotora  $p_R$ . Niezbędne jest w tym celu kooperatywne wiązanie DnaA do dwóch niekanonicznych sekwencji położonych 5 i ok. 200 pz poniżej miejsca startu transkrypcji. Aktywacja zachodzi na drodze wzmacniania powinowactwa polimerazy RNA do sekwencji promotorowej oraz ułatwiania opuszczania promotora. Wyniki te zostały opublikowane w piśmie **Journal of Biological Chemistry** (Glinkowska i wsp. 2003). Część danych opisanych w tym artykule uzyskałam we współpracy z laboratorium Prof. Waltera Messera z Max Planck Institute for Molecular Genetics w Berlinie. Prof. Messer był wówczas jednym z wiodących ekspertów w tematyce regulacji replikacji DNA *E. coli*. Odbyłam w jego laboratorium trzy staże o łącznej długości 9 miesięcy, podczas których nauczyłam się wielu biochemicznych metod przydatnych w badaniu białek wiążących się do DNA.

W ramach mojej pracy doktorskiej uzyskałam również wyniki wskazujące, że często wykorzystywany wówczas w badaniach wariant białka DnaA46, zawierający zmiany w konserwowanej domenie wiążącej ATP, jest niezdolny do aktywacji promotora  $p_R$  i słabiej konkuruje z fagowym białkiem P o helikazę DnaB. Skutkuje to niezdolnością plazmidów zawierających *ori* $\lambda$  do replikacji w szczepach *dnaA46*. Wyniki te zostały opublikowane w **Microbiology** (SGM) (Glinkowska i wsp., 2001).

W czasie studiów doktoranckich uczestniczyłam również w badaniu mechanizmu toksycznego wpływu fagowego białka CII na komórki *E. coli*. Wyniki tych badań, świadczące, że czynnik transkrypcyjny CII faga  $\lambda$  hamuje replikację DNA gospodarza, zostały przedstawione w publikacji, która ukazała się na łamach **Virology** (Kędzierska i wsp. 2003).

Za osiągnięcia w czasie studiów doktoranckich zostałam dwukrotnie uhonorowana stypendium dla młodych naukowców **Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej** w 2004 i 2005 r.

W 2007 r. otrzymałam swój pierwszy indywidualny grant badawczy, finansowany przez MNiSW, dotyczący mechanizmu aktywacji transkrypcyjnej *ori* $\lambda$ . Wyniki otrzymane w ramach realizacji tego projektu stały się podstawą dwóch publikacji, które weszły w skład przedstawionego do oceny osiągnięcia i zostały przedstawione bardziej szczegółowo powyżej. Rezultatem realizacji tego projektu była również rozprawa doktorska dr Anny Szambowskiej, która jest współautorem wspomnianych prac. Niestety, ówczesne obowiązujące przepisy nie przewidywały funkcji promotora pomocniczego.

W tym samym roku współpracowałam również przy uzyskaniu wyników do pracy (Narajczyk i wsp., 2007), wyjaśniającej udział negatywnego regulatora replikacji DNA gospodarza – SeqA w cyklu litycznym faga  $\lambda$ . W tej pracy wykazaliśmy, że wpływ SeqA na replikację faga  $\lambda$  nie jest bezpośrednio związany z  $ori\lambda$ , lecz z modulacją aktywności promotora  $p_R$ .

W czasie trwania grantu uczestniczyłam również, we współpracy z dr hab. Marcinem Łosiem z Katedry Biologii Molekularnej UG, w wyjaśnieniu roli czynnika transkrypcyjnego OxyR w utrzymywaniu i indukcji profaga  $\lambda$ . Wykonane przeze mnie doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że białko OxyR, regulator odpowiedzi na stres oksydacyjny gospodarza, wiąże się w rejonie promotora  $p_M$ . Promotor ten zawiaduje syntezą mRNA głównego represora genów faga – CI. Oddziaływanie OxyR z promotorem  $p_M$  wywiera wpływ na wiązanie represora CI w rejonie nachodzących na siebie i przeciwnie skierowanych  $p_M$  i  $p_R$ . Tym samym – OxyR oddziałuje zarówno na autoregulację  $p_M$  przez CI jak i represję  $p_R$ , wzmacniając ją i hamując indukcję profaga podczas stresu oksydacyjnego. Wyniki te są istotne w zrozumieniu biologii enterotoksycznych szczepów *E. coli*, których odpowiedzialne za patogenezę toksyny Shiga, są kodowane na profagach lambdoidalnych, zaś ich efektywna produkcja zachodzi wyłącznie po indukcji profaga. Szczepy te również zawierają konserwowaną sekwencję wiążącą OxyR w obrębie promotora  $p_M$ . Dane te zostały opublikowane w **Archives of Microbiology** (Glinkowska i wsp., 2010)

Po zakończeniu projektu badawczego dotyczącego aktywacji transkrypcyjnej  $ori\lambda$  odbyłam staż podoktorski w grupie Prof. Georgiego Muskhelishviliiego w Jacobs University Bremen (Niemcy). Efektem pobytu w tej grupie badawczej była praca wchodząca w skład przedstawionego do oceny osiągnięcia i opisana bardziej szczegółowo powyżej.

W 2013 r. moje dotychczasowe doświadczenie w badaniu powiązań pomiędzy transkrypcją i replikacją DNA zostało wykorzystane do stworzenia, wspólnie z członkami zespołu Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, pracy przeglądowej dotyczącej regulacji replikacji DNA. Została ona opublikowana w **Microbial Cell Factories** (Barańska i wsp., 2013).

W latach 2014 i 2018 otrzymałam finansowanie dwóch grantów badawczych, dotyczących powiązań replikacji DNA *E. coli* z innymi procesami komórkowymi, co bardziej rozlegle opisałam w podrozdziale dotyczącym planów badawczych. W ramach projektu z 2014 r. powstały wyniki, które pod koniec 2019, lub w pierwszej połowie 2020 roku staną się podstawą rozprawy doktorskiej mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej. W tym przewodzie będę promotorem pomocniczym lub promotorem, w zależności od wyników postępowania o nadanie stopnia dr habilitowanego.

#### Dydaktyka i popularyzacja nauki

W latach 2003-2018 byłam promotorem 5 prac magisterskich i 5 licencjackich. Obecnie również mam pod opieką 2 studentów studiów I stopnia i 2 II stopnia. Jako promotor staram się zachęcić studentów do aktywnego uczestnictwa w projektach naukowych i wniesienia indywidualnego wkładu w ich rozwój. Takie podejście



zaowocowało znalezieniem się mojego magistranta, obecnie dr Pawła Olszewskiego, na pierwszym miejscu wśród współautorów pracy opublikowanej w 2014 r. w *Nucleic Acids Research* (Olszewski i wsp., 2014). Jedną ze studentek, kończących w tym roku akademickim pracę magisterską pod moim kierunkiem, jest współautorką pracy będącej obecnie w rewizji w *Nature Communications* oraz pracy przeglądowej, która ukazała się niedawno w *Acta Biochimica Polonica*. Ponadto, została współlaureatką nagrody za najlepszy poster zaprezentowany podczas Central European Genome Stability and Dynamics Meeting, który odbył się w 2018 r w Warszawie.

W czasie wykonywania prac, które stały się podstawą niniejszego wniosku sprawowałam również opiekę nad trzema doktorantkami. Pierwsza z nich, dr Anna Szambowska uzyskała stopień doktora w 2008 r na podstawie rozprawy przedłożonej Radzie Instytutu Biologii UG pt. „Rola transkrypcji i kompleksów nukleoproteinowych w regulacji inicjacji replikacji bakteriofaga  $\lambda$  i plazmidów  $\lambda$ ”. Jest ona również współautorką dwóch prac opublikowanych w *Nucleic Acids Research*, w których jestem autorem korespondującym. Ponadto, byłam opiekunem naukowym mgr inż. Joanny Tymeckiej-Mulik, która jest pierwszą autorką pracy opublikowanej w *PLoS One* (Tymecka-Mulik i wsp., 2017), wchodzącej w skład przedłożonego do oceny osiągnięcia. Jej rozprawa doktorska powinna niedługo zostać przedłożona do oceny Radzie Wydziału Biologii UG. Obecnie jestem również promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Joanny Morcinek-Orłowskiej, która była wykonawcą i stypendystką w kierowanym przeze mnie projekcie. Spodziewany czas złożenia jej rozprawy doktorskiej to koniec 2019 lub pierwsza połowa 2020 r.

Do moich osiągnięć związanych z dydaktyką należy również zaliczyć przewodniczenie zespołowi, tworzącemu nowy kierunek studiów Genetyka i biologia eksperymentalna (GiBE) na Wydziale Biologii UG. Kierunek ten należał do najchętniej wybieranych przez kandydatów na studia na UG podczas rekrutacji w 2018 r. Za tę pracę otrzymałam nagrodę zespołową JM Rektora UG. W pracy dydaktycznej kieruję się kilkoma priorytetami: wykształceniem u studentów zdolności do identyfikowania ważnych współcześnie problemów i pytań naukowych, rozwijaniem zdolności ich rozwiązywania oraz posługiwania się w tym celu nowoczesnymi metodami i podejściami badawczymi. Program kierunku GiBE, współtworzony z Wydziałem Zarządzania UG miał odzwierciedlać tę wizję oraz przygotować studentów do wdrażania zdobytej wiedzy i umiejętności i współtworzenia innowacyjnej gospodarki.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora pomagałam 4 uczniom przygotować pracę badawczą, niezbędną do udziału w olimpiadzie biologicznej. Trzech z nich zostało laureatami olimpiady na szczeblu krajowym, zaś jedna z prac (autor: Krzysztof Sroka) uzyskała wyróżnienie. Pomogłam również w przygotowaniu pracy Aleksandra Golla, ucznia I LO w Gdyni, na konkurs E(x)plory. Praca znalazła się w krajowym finale konkursu.

Ponadto, dwukrotnie (2015 i 2016 r) brałam udział w prezentacji naukowych zainteresowań Katedry Biologii Molekularnej UG podczas Targów Akademia. Aktywnie wspieram również uczestnictwo studentów i doktorantów będących pod moją opieką w działalności popularyzującej naukę, np. uczestnictwie w Bałtyckim Festiwalu Nauki i Nocy Biologów. Moja doktorantka mgr Joanna Morcinek-Orłowska, została laureatką Kuźni Młodych Talentów Akademii Młodych Uczonych PAN, która odbyła się 18-21.09.2018, w Jabłoncej. Zajęła tam III miejsce za prezentację zatytułowaną "Na tropie pośredników, czyli powiązania między replikacją DNA a metabolizmem komórki bakteryjnej". Wraz z mgr Joanną Morcinek-Orłowską dołączyliśmy w 2018 r do grona Rzeczników Nauki na UG.