

---

**AUTOREFERAT**

---

**1. Imię i nazwisko.**

---

Agnieszka Kwiatek

---

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.**

---

- Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dnia 25.06.2004. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mechanizm naprawy uszkodzeń DNA powstających w wyniku deaminacji 5-metylocytozyny u *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis*”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Andrzej Piekarowicz (Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami: prof. dr hab. Celina Janion (Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk) oraz dr hab. Jacek Bielecki, prof. UW (Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski);
  - Tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, 05.06.1998. Tytuł pracy magisterskiej: „Wytwarzanie wolnych rodników tlenowych przez leukocyty krwi obwodowej oraz badanie aktywności katalazy i peroksydazy w plazmie pacjentów uzależnionych od alkoholu”. Opiekunem pracy była prof. dr hab. Martyna Kandeferszerzeń.
- 

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

---

- Od października 2017: asystent, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska;
- Od stycznia 2006: adiunkt, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska;
- Od stycznia do grudnia 2005: staż podoktorski, Department of Molecular Biosciences, College of Natural Sciences, The University of Texas at Austin, USA;
- 2004 (3 miesiące): staż podoktorski, Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białka, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie; Polska;
- 1999 - 2004: studia doktoranckie, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska.

---

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).

---

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Charakterystyka endonukleaz DNA wpływających na integralność genomu *Neisseria* spp.**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy:

- i. **Kwiatek, A., Piekarowicz, A. (2007).** The restriction endonuclease R.NmeDI from *Neisseria meningitidis* that recognizes a palindromic sequence and cuts the DNA on both sides of the recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* 35, 6539-46; doi: 10.1093/nar/gkm702;

IF<sub>2007</sub> - **6,954**; IF<sub>5-letni</sub> - **7,479**; punkty MNiSW - **32**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science, WoS) - **4**

Wkład habilitanta: 75%. Autor korespondencyjny. Mój wkład polegał na: (i) planowaniu i wykonaniu doświadczeń (oczyszczeniu endonukleazy restrykcyjnej R.NmeDI, wykazaniu aktywności *in vitro* i *in vivo* endonukleazy restrykcyjnej R.NmeDI, określeniu rozpoznawanej sekwencji, miejsca cięcia i ilości rozpoznawanych sekwencji wymaganych do wydajnego cięcia oraz określeniu struktury IV-rzędowej R.NmeDI); (ii) przygotowaniu manuskryptu oraz rycin i tabel; (iii) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Praca wyróżniona nagrodą im. profesora Kazimierza Bassalika za najlepszą pracę eksperymentalną z zakresu mikrobiologii, wykonaną w kraju i opublikowaną w roku 2007.

- ii. **Bażlekowa, M., Adamczyk-Popławska, M., Kwiatek, A. (2017).** Characterization of Vsr endonucleases from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* 163, 1003-1015; doi: 10.1099/mic.0.000492;

IF<sub>2017</sub> - **1,866**; IF<sub>5-letni</sub> - **2,879**; punkty MNiSW - **25**; liczba cytowań (wg bazy WoS) - **0**

Wkład habilitanta: 85%. Autor korespondencyjny. Mój wkład polegał na: (i) planowaniu i wykonaniu większości doświadczeń (wykazaniu potencjału mutagennego C5-cytozynometylotransferaz DNA M.NmeAI i M.NmeDI, analizie

- filogenetycznej endonukleaz Vsr *N. meningitidis*, wykazaniu zróżnicowania szczepów *N. meningitidis* pod względem ilości genów kodujących endonukleazy Vsr, wykazaniu aktywności endonukleazy Vsr V.Nme18VIP, uzyskaniu oraz wykazaniu aktywności V.Nme18IIPY69H); (ii) opiece nad studentką (Bażlekowa M.) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; (iii) interpretacji wyników i krytycznej analizie i weryfikacji parametrów kinetycznych reakcji katalizowanych przez V.NmeD18VIP i V.Nme18IIPY69H; (iv) przygotowaniu manuskryptu oraz rycin i tabel; (v) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.
- iii. **Kwiatek, A.**, Łuczkiwicz, M., Bandyra, K., Stein, DC., Piekarówic, A. (2010). *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 encodes two classes of Vsr endonucleases. *J. Bacteriol.* 192, 3951-60; doi: 10.1128/JB.00098-10; IF<sub>2010</sub> - **3,726**; IF<sub>5-letni</sub> - **3,94**; punkty MNiSW - **32**; liczba cytowań (wg bazy WoS) - **4**
- Wkład habilitanta: 65%. Autor korespondencyjny. Mój wkład polegał na: (i) planowaniu i wykonaniu większości doświadczeń (analizie filogenetycznej endonukleaz Vsr, oczyszczeniu endonukleaz Vsr, wykazaniu aktywności endonukleaz Vsr); (ii) opiece nad studentką (Bandyra K.) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; (iii) interpretacji i krytycznej analizie i weryfikacji parametrów kinetycznych reakcji katalizowanych przez endonukleazy Vsr; (iv) przygotowaniu manuskryptu oraz rycin i tabel, (v) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.
- iv. Adamczyk-Popławska, M., Bandyra, K., **Kwiatek, A.** (2018). Activity of Vsr endonucleases encoded by *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 is influenced by MutL and MutS proteins. *BMC Microbiology*, 18:95, doi: 10.1186/s12866-018-1243-3; IF<sub>2017</sub> - **2,829**; IF<sub>5-letni</sub> - **3,066**; punkty MNiSW - **30**; liczba cytowań (wg bazy WoS) - **0**
- Wkład habilitanta: 85%. Autor korespondencyjny. Mój udział polegał na: (i) planowaniu i wykonaniu większości doświadczeń (uzyskaniu mutantów *N. gonorrhoeae* w genach kodujących endonukleazy Vsr, białko MutL i MutS, wykazaniu fenotypu mutatorowego uzyskanych mutantów, zbadaniu fizycznych i funkcjonalnych oddziaływań pomiędzy endonukleazami Vsr, a białkami MutL i MutS, określeniu parametrów kinetycznych reakcji katalizowanych przez

endonukleazy Vsr w obecności białek MutL i MutS, porównaniu wydajności wiązania DNA przez endonukleazy Vsr i białko MutS); (ii) opiece nad studentką (Bandyra K.) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; (iii) interpretacji wyników; (iv) przygotowaniu manuskryptu oraz rycin i tabel; (v) przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku pracy z 2018 wykorzystano ostatnio dostępną wartość  $IF_{2017}$ ) - **15,375**;
- Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - **119**;
- Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy WoS) - **8**.

c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

#### **Charakterystyka endonukleaz DNA wpływających na integralność genomu *Neisseria* spp.**

Plastyczność genomu bakteryjnego jest definiowana, jako zdolność do pozyskiwania, rearanzacji i modyfikacji materiału genetycznego. Jednakże, aby informacja genetyczna mogła zostać przekazana komórkom potomnym materiał genetyczny musi pozostać integralny. Jest to możliwe dzięki zachowaniu równowagi pomiędzy genetycznym zróżnicowaniem a genetyczną stabilnością. Genetyczne zróżnicowanie wynika, m.in. ze zróżnicowania epigenetycznego, wysokiej częstości rekombinacji, horyzontalnego transferu genów oraz naturalnej kompetencji do pobierania obcego DNA ze środowiska [1-3].

Zróżnicowanie epigenetyczne wynika z aktywności metylotransferaz DNA (MTaz), które w komórkach mikroorganizmów stanowią część systemów restrikcji-modyfikacji (RM) lub są „samotnymi” metylotransferazami DNA. Działanie systemów RM oparte jest na dwóch aktywnościach: endonukleolitycznej katalizowanej przez endonukleazy restrikcyjne (REazy) i modyfikującej DNA katalizowanej przez metylotransferazy DNA. Na podstawie budowy podjednostkowej, rozpoznawanej sekwencji, miejsca cięcia oraz wymaganych kofaktorów systemy RM zostały podzielone na 4 typy – typ I, II, III i IV.

Endonukleazy restrykcyjne i metylotransferazy DNA typu II są zazwyczaj oddzielnymi białkami. REazy typu II tną DNA w ściśle określonym miejscu wewnątrz lub blisko rozpoznawanej sekwencji i mogą działać jako monomery, dimery lub tetramery. MTazy typu II działają zazwyczaj jako monomery i przenoszą grupę metylową z S-adenozylu-L-metioniny na cytozynę lub adeninę tworząc N6-metyloadeninę (m6A), C5-metylocytozynę (5mC) lub N4-metylocytozynę (m4C). Główną biologiczną rolą systemów RM jest ochrona przed wnikaniem obcego DNA. Endonukleazy restrykcyjne tną obcy dwuniciowy DNA, a metylotransferazy DNA modyfikując DNA w sekwencjach rozpoznawanych przez połączone z nimi REazy chronią genom gospodarza przed autorestrykcją [4, 5]. Ponadto, jako, że geny wielu systemów znajdują się pomiędzy ruchomymi elementami genetycznymi lub fragmentami DNA nabytymi drogą horyzontalnego transferu genów [6], a w genomach *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium zidentyfikowano, bogate w geny systemów RM, *loci* określane, jako „*immigration control region*” [7] wskazuje się także na zaangażowanie systemów RM w zachowanie integralności i stabilizację chromosomu. Systemy RM mogą również wpływać na stabilizację wysp genomowych i plazmidów, specjację, rekombinację, rearanżacje i ewolucję genomów, a także zgodnie z hipotezą Kobayashi'ego geny kodujące systemy RM mają tendencję do rozprzestrzeniania się jako samolubne geny [8].

Oprócz wspomnianej roli w systemach RM, MTazy odgrywają rolę w bakteryjnej ewolucji i epigenetycznej regulacji ekspresji genów [9]. Jednocześnie obecność C5-cytozynometylotransferaz DNA (m5C-MTaz) katalizujących powstanie 5-metylocytozyny sprzyja pojawianiu się mutacji spontanicznych. 5-metylocytozyna jest mniej stabilna niż niemetylowana cytozyna i może ulegać deaminacji do tyminy prowadząc do powstania nieprawidłowej pary zasad T:G i w konsekwencji do tranzycji C→T [10, 11]. Dlatego też, w komórkach posiadających m5C-MTazy, aby zachowana została równowaga pomiędzy potencjalnie wysokimi poziomem mutacji a integralnością genomu bakterie wykształciły odpowiednie mechanizmy, m.in. nabywając odpowiednie systemy naprawy DNA [12].

W komórkach *E. coli* K-12 posiadającej jedną m5C-MTazę, nieprawidłowe pary zasad T:G usuwane są przez system naprawy DNA *Very Short Patch repair* (VSP), którego kluczowym elementem jest pojedyncza endonukleaza Vsr (V.EcoKDcm).

V.EcoKDcm nacina DNA przed tyminą umożliwiając jej specyficzne usunięcie. Centrum katalityczne endonukleazy Vsr V.EcoKDcm zawiera kwas asparaginowy (Asp51), histydynę (His69), kwas glutaminowy (Glu25), fenyloalaninę (Phe25), histydynę (His62) i kwas asparaginowy (Asp97). Asp51 i His69 są kluczowymi, a Glu25, Phe62, His62 i Asp97 ważnymi aminokwasami dla endonukleolitycznej aktywności V.EcoKDcm, np. His69 odrywa proton z wykorzystywanego przez Vsr zgrupowania magnez-woda i taka aktywowana woda atakuje wiązanie fosfodiestrowe [13-15]. W warunkach *in vitro* aktywność V.EcoKDcm jest stymulowana przez białka MutL i MutS, a inaktywacja genów *mutL* i *mutS* ogranicza *in vivo* działanie systemu VSP w komórkach *E. coli* [16-18]. *In vivo*, w działanie systemu VSP *E. coli* K-12 zaangażowane są także polimeraza DNA I i ligaza DNA [19].

Obiektem moich badań były należące do  $\beta$ -proteobakterii Gram-ujemne heterotroficzne ziarniaki z rodzaju *Neisseria*. Dwa z jedenastu gatunków należących do rodzaju *Neisseria* - *Neisseria gonorrhoeae* (gonokok) i *Neisseria meningitidis* (meningokok) – są patogennymi mikroorganizmami, wysoce przystosowanymi do zajmowanej niszy ekologicznej, dla których jedynym gospodarzem jest człowiek. *N. gonorrhoeae* infekuje błony śluzowe układu moczowo-płciowego wywołując, m.in. rzeżączkę i rozsiane zakażenie rzeżączkowe, a *N. meningitidis* jest najczęstszym bakteryjnym czynnikiem etiologicznym ciężkiego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i posocznicy. Oba te patogeny pozostają poważnym problemem klinicznym i epidemiologicznym, wynikający nie tylko z liczby przypadków, ale także wzrastającej wielolekooporności, co zostało podkreślone przez Światową Organizację Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO). WHO w 2011 r. ogłosiła program *Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae*, a w 2017 roku umieściła *N. gonorrhoeae* (jako jedyny bakteryjny czynnik etiologiczny choroby przenoszonej drogą płciową) na liście 12 rodzin bakterii określanych mianem „*priority pathogens*”, które w związku z narastającą wielolekoopornością stanowią największe zagrożenie dla zdrowia człowieka [20, 21].

Wysokie przystosowanie *Neisseria* sp. do zajmowanej niszy ekologicznej wynika, m.in. z genetycznego zróżnicowania możliwemu dzięki niezwykle plastycznemu i dynamicznemu genomowi, którego integralność utrzymywana jest przez równowagę pomiędzy czynnikami a modulatorami zmienności genetycznej. Czynniki zmienności

genetycznej są aktywność metylotransferaz DNA, naturalna kompetencja do pobierania obcego DNA ze środowiska oraz zmienność fazowa, natomiast modulatorami systemu naprawy DNA i systemu RM [22-24]. *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis* kodują, co najmniej kilka metylotransferaz DNA, które wchodzi w skład systemów RM lub też są „samotnymi” MTazami DNA [24]. Kodowanie tak dużej ilości systemów RM przez *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis* z jednej strony zapewnia ochronę przed wnikaniem do komórki obcego DNA, z drugiej zaś strony ekspresjonowanie dużej liczby MTaz, z których przynajmniej kilka modyfikuje piąty węgiel pierścienia pirymidynowego cytozyny naraża organizm na zwiększoną częstość mutacji m5C → T w sekwencjach rozpoznawanych przez te enzymy.

Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka wybranych endonukleaz DNA wpływających na integralność genomu *Neisseria* spp. uwzględniając zarówno endonukleazę restrykcyjną należącą do systemu RM, jak i endonukleazy Vsr zapobiegające mutacjom wynikającym z deaminacji m5C.

**Kwiatek, A., Piekarowicz, A. (2007). The restriction endonuclease R.NmeDI from *Neisseria meningitidis* that recognizes a palindromic sequence and cuts the DNA on both sides of the recognition sequence. *Nucleic Acids Res*, 35, 6539-46.**

W momencie rozpoczęcia moich badań, pomimo licznych analiz bioinformatycznych wskazujących na występowanie genów wielu systemów RM w genomach różnych szczepów *N. meningitidis*, tylko kilka systemów RM zostało scharakteryzowanych eksperymentalnie z uwzględnieniem ich aktywności oraz rozpoznawanej sekwencji i miejsca cięcia.

W pracy po raz pierwszy opisana została endonukleaza restrykcyjna R.NmeDI kodowana przez *N. meningitidis* 2120 serotyp C. Enzym R.NmeDI jest prototypem nowej podklasy endonukleaz restrykcyjnych typu II (REazy II), z powodu unikatowych właściwości i jednoczesnego posiadania cech charakterystycznych dla różnych podklas REaz typu II. Aktywną formą zbudowanego z 351 aminokwasów enzymu R.NmeDI jest tetramer. Enzym ten rozpoznaje palindromiczną sekwencję i tnie dwuniciowy DNA, po obu stronach rozpoznawanej sekwencji: 5' (12/7)RCCGGY(7/12) 3' (R=A/G, Y=C/T) wymagając dwóch rozpoznawanych sekwencji do wydajnego cięcia DNA. Trawienie DNA przez R.NmeDI obejmuje dwa etapy. W pierwszym z nich DNA jest cięty po jednej ze stron rozpoznawanej sekwencji generując produkt pośredni, a następnie przeprowadzane

jest cięcie po drugiej ze stron rozpoznawanej sekwencji prowadząc do wycięcia 25-bp fragmentu DNA. Według postawionej hipotezy, każdy z monomerów tnie jedną nić DNA po obu stronach rozpoznawanej sekwencji, a następnie fragment DNA zawierający rozpoznawaną sekwencję jest wypętłany i przeprowadzane jest cięcie drugiej nici po obu stronach rozpoznawanej sekwencji.

Endonukleaza restrykcyjna R.NmeDI posiada aktywność endonukleolityczną nie tylko w warunkach *in vitro*. *In vivo* system restrykcji-modyfikacji NmeDI zawierający endonukleazę restrykcyjną R.NmeDI oraz m5C-MTazę M.NmeDI restrykuje namnażanie się bakteriofaga lambda w komórkach *E. coli*.

Charakterystyczna jest również lokalizacja w chromosomie genów *nmeDIR* i *nmeDIM* kodujących system RM NmeDI. Geny te znajdują się pomiędzy konserwowanymi ewolucyjnie genami *pheS* i *pheT*. Zgodnie z Saunders i Snyder intergeniczny region pomiędzy *pheS* i *pheT* jest możliwym miejscem integracji nowo nabytego DNA [25], co może sugerować rolę systemu RM NmeDI w zróżnicowaniu genetycznym patogennych bakterii z rodzaju *Neisseria*. Hipoteza ta została poparta przez późniejsze badania Budroni *et al.* (2011) [26], którzy wykazali, że geny wielu systemów RM są zlokalizowane w potencjalnych miejscach integracji ruchomych elementów genetycznych [25], a nabyte drogą transferu horyzontalnego systemy RM są determinantą kładów filogenetycznych *Neisseria*. Typowe dla danych kładów systemy RM wytwarzają zróżnicowaną barierę do wymiany DNA skorelowaną ze strukturą populacji. Jednym z takich systemów jest system NmeDI, który jest charakterystyczny dla filogenetycznego kładu PC8/11 zawierającego m.in. kompleks klonalny ST-8 i ST-11, które są przyczyną większości przypadków wywoływanych przez *N. meningitidis* serotyp C [27].

Ponadto, system RM NmeDI, w skład, którego wchodzi endonukleaza restrykcyjna R.NmeDI jest doskonałym modelem do badań nad ewolucją i genetycznym zróżnicowaniem bakterii, a w tym badań nad ewolucją samych systemów RM. NmeDI stanowi przykład systemu RM pokazującym wspólną ewolucję REaz i MTaz, z uwzględnieniem ewolucji w kierunku zmiany specyficzności. Endonukleaza R.NmeDI rozpoznaje sekwencję 5' RCCGGY 3' (R=A/G, Y=C/T), a MTaza M.NmeDI, 5' RCCGGB 3' (R=A/G, B=C/T/G) [28]. Umożliwia to stopniową ewolucję specyficzności endonukleazy restrykcyjnej R.NmeDI bez letalnych konsekwencji, co może sprzyjać skutecznej obronie przed wnikiem obcego DNA o nowych specyficznościach.



Podsumowując, endonukleaza restrykcyjna R.NmeDI jest prototypem nowej podklasy REaz typu II, a system RM NmeDI może wpływać na strukturę genomu *N. meningitidis* poprzez zaangażowanie w ochronę przed wnikaniem obcego DNA do komórki i ochronę integralności genomu.

**Bażlekowa, M., Adamczyk-Popławska, M., Kwiatek, A. (2017). Characterization of Vsr endonucleases from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, 163, 1003-1015.**

Jak wspomniano wyżej, kodowany przez *N. meningitidis* 2120, system RM NmeDI, obok endonukleaz restrykcyjnej R.NmeDI, zawiera m5C-MTazę M.NmeDI katalizującą powstanie m5C będącej potencjalnym „gorącym miejscem mutacyjnym”.

W pracy wykazano, że w komórkach *E. coli* zawierających M.NmeDI wzrasta ilość tranzycji C→T wynikających z deaminacji m5C w sekwencjach modyfikowanych ten enzym. Podobny efekt zaobserwowano, kiedy do komórek *E. coli* wprowadzono gen kodujący M.NmeAI - m5C-MTazę kodowaną przez *N. meningitidis* Z2491. Częstość mutacji spowodowana aktywnością metylotransferaz M.NmeAI i M.NmeDI wzrasta odpowiednio 81- i 63-krotnie.

Analiza genomu *N. meningitidis* 2120 kodującej M.NmeDI i *N. meningitidis* Z2491 kodującej M.NmeAI ujawniła, że szczepy te posiadają odpowiednio dwa i jeden gen *vsr* kodujący potencjalne endonukleazy Vsr, których aktywność związana jest z zapobieganiem mutacjom wynikającym z deaminacji m5C. Wśród pozostałych szczepów *N. meningitidis* kodujących C5-cytozynometylotransferazy DNA wyróżniliśmy szczepy z dwoma, jednym lub bez genów *vsr*. Filogenetyczna analiza 432 potencjalnych endonukleaz Vsr kodowanych przez *N. meningitidis*, ujawniła, że pomimo wysokiego podobieństwa sekwencji aminokwasowych, białka te należą do dwóch grup (typ I i typ II endonukleaz Vsr). Szczepy z jednym genem *vsr* zawierają zawsze typ I, natomiast w szczepach z dwoma genami zawsze występują oba typy endonukleaz Vsr. Geny endonukleaz Vsr typu I znajdują się w sąsiedztwie genów „samotnych” m5C-MTaz, a geny endonukleaz Vsr typu II ko-lokalizują z genami systemu RM otoczonymi genami kodującymi podjednostki syntetazy tRNA, np. *pheS* i *pheT*.

Przedstawicielem szczepu z dwoma genami *vsr*, obok wspomnianego wyżej szczepu 2120, jest *N. meningitidis* FAM18 serotyp C w genomie, którego dzięki technologii *Pacific Biosciences' single molecule, real-time sequencing* (SMRT) udowodniono obecność 5-metylocytozyny. Wśród m5C-MTaz tego szczepu są,

m.in. M.Nme18ORF679P wykazująca 100% podobieństwa do M.NmeDI oraz homolog metylotransferazy M.NmeAI. Endonukleazami Vsr kodowanymi przez ten szczep są V.Nme18IIP należąca do typu I oraz V.Nme18VIP należąca do typu II. Przeprowadzone badania wykazały, że jedynie V.Nme18VIP jest aktywna *in vitro*, natomiast V.Nme18IIP nie tnie substratowego DNA zawierającego nieprawidłową parę zasad T:G. Endonukleaza V.Nme18VIP rozpoznaje i tnie, ze zbliżoną wydajnością, substratowy DNA zawierający nieprawidłową parę zasad T:G w sekwencjach pochodzących od sekwencji modyfikowanych przez wszystkie m5C-MTazy *N. meningitidis* FAM18 serotyp C. Multispecyficzność endonukleazy V.Nme18VIP może wiązać się z koniecznością przeciwdziałania efektom deaminacji m5C we wszystkich sekwencjach modyfikowanych przez m5C-MTazy *N. meningitidis* FAM18 serotyp C, zwłaszcza, że jest to jedyny aktywny enzym Vsr w tym szczepie. Ponadto bakteryjne m5C-MTazy mogą modyfikować sekwencje niekanoniczne [29, 30]. Cytosyna metylowana w sekwencjach niekanonicznych może być, więc dodatkowym „gorącym miejscem mutacyjnym” wymagającym naprawy. Znaczenie multispecyficzności V.Nme18VIP można również przypisać naturalnej kompetencji *Neisseria* i faktowi, że nowo nabyty DNA może zawierać geny kodujące m5C-MTazy z dodatkową specyficznością w stosunku do meningokokowych m5C-MTaz. Aktywność nowo nabytych m5C-MTaz mogłaby w ten sposób zwiększać częstotliwość mutacji. Rzeczywiście gen kodujący endonukleazę Vsr V.Nme18VIP i znajdujące się w jego sąsiedztwie geny kodujące system RM leżą pomiędzy genami syntetazy tRNA, które są potencjalnym miejscem wstawienia obcego DNA w genomie *N. meningitidis* [25]. Towarzysząc systemom RM zawierającym m5C-MTazę, endonukleaza Vsr mogłaby niwelować potencjał mutageny tych metylotransferaz DNA, i tym samym pozwalałaby na utrzymanie w genomie genów systemów RM niezbędnych do ochrony przed wnikaniem obcego DNA do komórki.

Porównanie sekwencji aminokwasowej nieaktywnej V.Nme18IIP z sekwencjami endonukleaz Vsr, których aktywność zademonstrowano eksperymentalnie, wykazało obecność takich samych konserwowanych reszt aminokwasowych w pozycji 25, 51, 62, 64 i 97. Jediną inną resztą aminokwasową kluczową dla reakcji hydrolitycznej katalizowanej przez endonukleazy Vsr jest aminokwas w pozycji 69. V.Nme18IIP zawiera w tym miejscu tyrozynę, a aktywne endonukleazy Vsr histydynę. Aby określić znaczenie tej różnicy dla aktywności V.Nme18IIP uzyskaliśmy białko V.Nme18IIPY69H. Zamiana

Tyr69 na His69 przywróciła zdolność V.Nme18IIPY69H do cięcia DNA zawierającego nieprawidłową parę zasad T:G.

Analiza sekwencji aminokwasowej pozostałych endonukleaz Vsr typu I kodowanych przez *N. meningitidis* wykazała, że wszystkie te białka posiadają tyrozynę w pozycji 69, co może sugerować, że również te białka nie są aktywne. Jednocześnie szczepy kodujące te białka posiadają geny m5C-MTaz. Może to implikować, że w szczepach posiadających gen kodujący tylko typ I endonukleaz Vsr istnieje jeszcze jeden system naprawy DNA usuwający nieprawidłową parę zasad T:G. Natomiast w szczepach posiadających dwa geny *vsr* funkcje nieaktywnego białka mogłaby przejąć endonukleaza Vsr typu II, w sekwencji, której wszystkie kluczowe dla aktywności endonukleolitycznej aminokwasy są takie jak w aktywnych endonukleazach Vsr.

Podsumowując, w momencie rozpoczęcia przeze mnie badań, pomimo kodowania przez *N. meningitidis* wielu m5C-MTaz [24], których aktywność może skutkować pojawieniem się mutacji nie było żadnych danych o mechanizmach zapobiegających tego typu zmianom. W naszych badaniach zademonstrowaliśmy aktywność endonukleaz Vsr, które rozpoznają nieprawidłową parę zasad T:G, a tym samym daliśmy podstawy do dalszego badania systemów naprawy DNA zapobiegających mutacjom wynikającym z deaminacji m5C i przyczyniliśmy się do poznania mechanizmów związanych z utrzymaniem integralności wysoce plastycznego genomu *N. meningitidis*.

**Kwiatek, A., Łuczkiwicz, M., Bandyra, K., Stein, D.C., Piekarowicz, A. (2010). *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 encodes two classes of Vsr endonucleases. *J. Bacteriol.* 192, 3951-60.**

*N. gonorrhoeae*, drugi z badanych przeze mnie gatunków *Neisseria*, również koduje wiele systemów RM. Szczep *N. gonorrhoeae* FA1090 zawiera geny 12 systemów RM, wśród których 6 zawiera C5-cytozynometylotransferazę DNA. Aktywność m5C-MTaz kodowanych przez *N. gonorrhoeae* wykazano eksperymentalnie nie tylko *in vitro*, ale dzięki technologii *Pacific Biosciences' single molecule, real-time sequencing* (SMRT) w genomie tego szczepu potwierdzono obecność 5-metylocytozyny wprowadzanej przez 5 różnych m5C-MTaz [24].

W pracy wykazaliśmy, że *N. gonorrhoeae* FA1090 posiada dwa geny endonukleaz Vsr – *ngoAXIII* i *ngoAXIV* kodujących odpowiednio endonukleazę V.NgoAXIII i V.NgoAXIV.

W warunkach *in vitro* obie endonukleazy Vsr *N. gonorrhoeae* FA1090 są aktywne – rozpoznają i tną DNA zawierający nieprawidłową parę zasad T:G. V.NgoAXIII jest multispecyficzna i rozpoznaje nieprawidłową parę zasad T:G w każdym kontekście nukleotydowym, natomiast V.NgoAXIV jedynie w 5' GTGG 3', 5' CTGG 3', 5' GTGC 3', 5' ATGC 3' i 5' CTGC 3'. Porównanie wartości stałej reakcji pierwszego rzędu ( $k_{st}$ ) charakterystycznych dla cięcia każdego substratowego DNA wskazują, że enzymy te nie wykazują preferencji substratowej tnąc każdy rozpoznawany substratowy DNA ze zbliżoną wydajnością.

Ukierunkowana mutageneza konserwowanych aminokwasów wykazała, że Asp50 i His68 w V.NgoAXIII i Asp51 i His69 w V.NgoAXIV są niezbędne dla przeprowadzania reakcji endonukleolitycznej katalizowanej przez te endonukleazy Vsr. Natomiast Glu24, Asp63 i Asp97 w V.NgoAXIII i Glu25, His64 i Asp97 w V.NgoAXIV są aminokwasami ważnymi, lecz nie niezbędnymi dla aktywności tych białek. Analizując otrzymane dane i porównując je z danymi dotyczącymi endonukleazy Vsr *E. coli* K-12 [13-15] zaproponowaliśmy rolę tych aminokwasów w reakcji katalizowanej przez V.NgoAXIII i V.NgoAXIV. Zgodnie z zaproponowanym mechanizmem, enzymy te wykorzystują dwa zgrupowania magnez - woda. Kwas asparaginowy (Asp50 w V.NgoAXIII i Asp51 w V.NgoAXIV) koordynuje dwa jony magnezu  $Mg^{2+}$ . His68 w V.NgoAXIII i His69 w V.NgoAXIV odrywa proton z jednej z cząsteczek  $H_2O$  w pierwszym zgrupowaniu magnez – woda, a następnie aktywowana woda atakuje grupę fosforanową wiązania fosfodiesterowego. Natomiast Asp63 i Glu24 oraz His64 i Glu25, odpowiednio w V.NgoAXIII i V.NgoAXIV, za pośrednictwem wiązań wodorowych koordynują cząsteczki  $H_2O$  w zgrupowaniach metal – woda. Ponadto, Glu24 i Asp63 w V.NgoAXIII są ważne nie tylko dla aktywności, ale także dla specyficzności tego enzymu. Zaangażowanie w reakcję katalityczną tych samych aminokwasów w endonukleazach Vsr *N. gonorrhoeae* i *E. coli* sugeruje uniwersalny mechanizm działania endonukleaz Vsr.

Analiza filogenetyczna V.NgoAXIII i V.NgoAXIV wykazała, że należą one do dwóch różnych grup filogenetycznych. V.NgoAXIV leży na tej samej gałęzi drzewa filogenetycznego co endonukleaza Vsr *E. coli* K-12 i V.Nme18IIP, natomiast V.NgoAXIII znajduje się na tej samej gałęzi drzewa filogenetycznego co V.Nme18VIP.

Endonukleazy V.NgoAXIII i V.NgoAXIV wykazują nie tylko homologię, odpowiednio, do V.Nme18VIP i V.Nme18IIP, ale kodujące je geny zajmują analogiczne loci w chromosomach *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis*. Gen *ngoAXIIIIV* i leżące obok

geny potencjalnego systemu RM znajdują się pomiędzy genami *pheS* i *pheT*, natomiast gen *ngoAXIVV* i znajdujący się w sąsiedztwie gen potencjalnej m5C-MTazy w pobliżu sekwencji pobrania DNA [28].

Jest niezwykle interesujące, że meningokokowe i gonokokowe endonukleazy Vsr i m5C-MTazy (kodowane przez geny sąsiadujące z genami *vsr*), pomimo podobieństwa sekwencji aminokwasowych oraz faktu ich analogicznych lokalizacji w preferencyjnych miejscach integracji obcego DNA, różnią się aktywnością. W przeciwieństwie do endonukleaz Vsr *N. meningitidis*, gdzie aktywna jest tylko jedna endonukleaza Vsr, obie endonukleazy Vsr *N. gonorrhoeae* są aktywne. Intrygujące jest również, że w genomie *N. gonorrhoeae* geny aktywnych endonukleaz Vsr towarzyszą genom nieaktywnych m5C-MTaz. Według postawionej w pracy hipotezy może to być związane, m.in. z nabywaniem i ewolucją genów kodujących endonukleazy Vsr i m5C-MTazy. Prawdopodobnie, geny endonukleaz Vsr i leżących obok genów systemów RM lub „samotnych” m5C-MTaz zostały nabyte jednocześnie, a następnie w czasie ewolucji niektóre z tych genów uległy inaktywacji. Z ewolucyjnego punktu widzenia endonukleaza V.NgoAXIII, wyewoluowała do multispecyficznego enzymu o specyficzności zapewniającej ochronę przed skutkami deaminacji we wszystkich sekwencjach modyfikowanych przez m5C-MTazy *N. gonorrhoeae* FA1090. Dzięki temu nie jest konieczne, aby genowi każdej m5C-MTaz towarzyszył gen aktywnej endonukleazy Vsr. Ponadto, multispecyficzność V.NgoAXIII mogłaby umożliwić nabywanie genów m5C-MTaz o nowych specyficznościach, bez narażania komórki na podwyższony poziom mutacji wynikający z deaminacji m5C wprowadzanych przez te metylotransferazy. Dzięki temu, endonukleazy Vsr niwelując potencjał mutageny tych metylotransferaz DNA pozwalałyby na utrzymanie integralności genomu.

**Adamczyk-Popławska, M., Bandyra, K., Kwiatek, A. (2018). Activity of Vsr endonucleases encoded by *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 is influenced by MutL and MutS proteins. *BMC Microbiology*, 18:95, doi: 10.1186/s12866-018-1243-3;**

Zarówno V.NgoAXIII i V.NgoAXIV kodowane przez *N. gonorrhoeae* jak i V.Nme18VIP kodowana przez *N. meningitidis*, tną substratowy DNA zawierający nieprawidłową parę zasad T:G bez udziału białek pomocniczych. Jednakże, do wydajnego cięcia substratowego DNA wymagany jest 10-krotny nadmiar enzymu w stosunku do DNA jak zostało wykazane w pracach prezentowanych powyżej (Kwiatek *et al.* (2010) i Bażlekowa *et al.* (2017)).

Dane literaturowe oraz przeprowadzona przez nas analiza wskazywały, że *N. gonorrhoeae* FA1090 posiada także geny *mutL* i *mutS* kodujące białka zaangażowane w naprawę DNA [31].

W pracy wykazano, że endonukleazy V.NgoAXIII i V.NgoAXIV bezpośrednio fizycznie i funkcjonalnie oddziałują z białkiem MutL *N. gonorrhoeae* FA1090. Oddziaływania takie nie występują pomiędzy badanymi gonokokowymi endonukleazami Vsr i gonokokowym białkiem MutS. Natomiast białko MutS bezpośrednio oddziałuje z białkiem MutL.

W warunkach *in vitro*, białko MutL nie tylko fizycznie oddziałuje z V.NgoAXIII i V.NgoAXIV, ale także wpływa na ich aktywność. MutL (w zależności od substratowego DNA o 62,6–138,7% dla V.NgoAXIII i 73,5–110% dla V.NgoAXIV) zwiększa wydajność i szybkość reakcji katalizowanej przez białka Vsr, a obecność ATP w reakcji wzmacnia obserwowany efekt. Wzrost wydajności cięcia wszystkich substratowych DNA przez endonukleazy Vsr w obecności białka MutL wskazuje jednoznacznie, że MutL, niezależnie od białka MutS, jest wystarczające do stymulacji aktywności endonukleaz Vsr. Takiego efektu dla endonukleazy Vsr *E. coli* nie zaobserwował Heinze *et al.* (2009), wykazując, że aktywność endonukleazy V.EcoKDCm może być stymulowana przez białko MutL jedynie w obecności białka MutS i ATP [16].

Dzięki zwiększonej aktywności endonukleaz V.NgoAXIII i V.NgoAXIV w obecności białka MutL, do wydajnego cięcia DNA przez endonukleazy Vsr *N. gonorrhoeae* wymagany jest jedynie 2-krotny nadmiar enzymu w stosunku do DNA. Obniżenie ilości endonukleazy Vsr wymaganej do wydajnego cięcia substratowego DNA (z 10-krotnego do 2-krotnego) pozwalałoby, na wydajne usuwanie nieprawidłowych par zasad T:G bez konieczności zwiększonej syntezy endonukleaz Vsr. Jest to szczególnie istotne w kontekście kodowania przez *N. gonorrhoeae* FA1090 tylko dwóch endonukleaz Vsr i 5 aktywnych m5C-MTaz, które katalizują powstawanie m5C będącej potencjalnym „gorącym miejscem mutacyjnym”. Jednocześnie konieczność regulacji aktywności V.NgoAXIII przez białko MutL może wynikać ze zdolności enzymu do rozpoznawania nieprawidłowej pary zasad T:G w każdym kontekście nukleotydowym.

Aktywność gonokokowych endonukleaz Vsr V.NgoAXIII i V.NgoAXIV wzrasta także w obecności białka MutL kodowanego przez *E. coli* K-12, a poziom stymulacji jest analogiczny jak w przypadku białka MutL *N. gonorrhoeae*. Wskazuje to na uniwersalny mechanizm stymulacji endonukleaz Vsr przez białka MutL.

Przeciwstawny wpływ do białka MutL na aktywność endonukleaz Vsr, wywiera obecność białka MutS powodując spadek wydajności cięcia DNA przez V.NgoAXIII i V.NgoAXIV odpowiednio o 74,9–90,6% i 47,2–75%. Efekt obniżenia aktywności endonukleazy Vsr przez białko MutS znoszony jest przez białko MutL. Ponadto, przy jednoczesnej obecności białka MutL i MutS, obserwowany jest wzrost wydajności cięcia DNA katalizowanego przez V.NgoAXIII i V.NgoAXIV.

Przeprowadzone *in vivo* doświadczenia z wykorzystaniem mutantów *N. gonorrhoeae* również wykazały związek białka MutL z aktywnością endonukleaz Vsr. W komórkach *N. gonorrhoeae*, w których oprócz genu endonukleazy Vsr zinaktywowano gen *mutL*, częstość mutacji spontanicznych, wzrasta nie tylko w porównaniu do szczepu „dzikiego”, ale także w porównaniu do szczepu ze zinaktywowanym genem *vsr*.

Ponadto, mutatorowy fenotyp *N. gonorrhoeae* ze zinaktywowanymi genami endonukleaz *vsr* świadczy o zaangażowaniu endonukleaz Vsr w naprawę DNA wskazując na ich rolę biologiczną.

Reasumując, endonukleazy Vsr *N. gonorrhoeae* są zaangażowane w naprawę DNA, a regulacja aktywności endonukleaz Vsr przez białko MutL sprzyja lepszej kontroli tych białek w skutecznej ochronie komórki przed skutkami deaminacji m5C powstałej w wyniku reakcji katalizowanej przez m5C-MTaz.

### **Podsumowanie**

We wchodzących w skład dzieła pracach scharakteryzowałam wybrane enzymy wpływające na integralność genomu *N. meningitidis* i *N. gonorrhoeae*. Demonstrując zdolność systemu RM NmeDI, zawierającego endonukleazę R.NmeDI, do restrykcji bakteriofaga  $\lambda$  wykazałam, że enzym ten może wpływać na strukturę i integralność genomu poprzez zaangażowanie w ochronę przed wnikaniem obcego DNA do komórki. Towarzysząca endonukleazie restrykcyjnej R.NmeDI m5C-MTaza M.NmeDI posiada potencjał mutageny skutkujący powstaniem nieprawidłowej pary zasad T:G i w konsekwencji C→T tranzycji. Potencjał mutageny m5C-MTaz *N. meningitidis* może być niwelowany przez aktywność endonukleaz Vsr, szczególnie, że jedna z endonukleaz Vsr *N. meningitidis* jest multispecyficzna i rozpoznaje nieprawidłową parę zasad T:G w każdym kontekście nukleotydowym. *N. gonorrhoeae* kodująca kilka aktywnych m5C-MTaz również posiada endonukleazy Vsr, z których jedna jest multispecyficzna

i rozpoznaje nieprawidłową parę zasad T:G w każdym kontekście nukleotydowym. Organizacja i lokalizacja *loci* zawierających geny endonukleaz Vsr jest taka sama w chromosomie *N. meningitidis* FAM18 i *N. gonorrhoeae* FA1090. Jeden z genów *vsr* wraz z leżącymi obok genami systemu RM znajduje się w potencjalnym miejscu integracji ruchomych elementów genetycznych. Aktywność endonukleaz Vsr *N. gonorrhoeae* wzrasta w obecności białka MutL, co potencjalnie może pozwalać na wydajne usuwanie nieprawidłowych par zasad T:G bez konieczności wzrostu syntezy endonukleaz Vsr.

Podsumowując, prace przyczyniły się do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie integralności wysoce plastycznego genomu *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis*, które są istotnymi ludzkimi patogenami. Niewątpliwie powiększy to naszą wiedzę o biologii molekularnej tych drobnoustrojów, co w przyszłości może zaowocować wskazaniem celów działania inhibitorów i innych nowych leków w celu zahamowania rozprzestrzeniania się tych chorób.

**Za największe osiągnięcia uzyskane w wyniku przeprowadzanych badań uważam:**

- Identyfikację i wykazanie aktywności R.NmeDI (prototypu nowego podtypu endonukleaz restrykcyjnych typu II) i wskazanie, że może być on zaangażowany w utrzymanie integralności genomu *N. meningitidis*;
- Identyfikację i wykazanie aktywności endonukleaz Vsr kodowanych przez *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis*:
  - W momencie rozpoczęcia moich badań, pomimo danych bioinformatycznych wykazujących na występowanie genów kodujących endonukleazy Vsr w genomach wielu mikroorganizmów, dokładnie zbadana i scharakteryzowana była jedynie endonukleaza Vsr kodowana przez *E. coli* K-12, oraz wykazano *in vitro* zdolność endonukleazy Vsr V.BssHIII kodowanej przez *B. stearothermophilus* H3 do cięcia DNA zawierającego nieprawidłową parę zasad T:G [32];
  - *N. gonorrhoeae* FA1090 jest pierwszą bakterią i jak dotychczas jedynym mikroorganizmem, dla którego wykazano, że posiada dwie *in vitro* aktywne filogenetycznie odległe endonukleazy Vsr;



- *N. gonorrhoeae* FA1090 jest pierwszą wśród  $\beta$ -proteobakterii, a dopiero drugą bakterią wśród wszystkich mikroorganizmów, dla której wykazano aktywność *in vivo* endonukleaz Vsr;
- Wykazanie mulispecyficzności endonukleaz V.NgoAXIII i V.Nme18VIP przybliżyło nas do rozwiązania problemu naukowego związanego z kodowaniem przez *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis* wielu aktywnych m5C-MTaz i jedynie dwóch lub jednej endonukleazy Vsr. Multispecyficzne endonukleazy Vsr mogą zapewnić wydajną ochronę przed skutkami deaminacji m5C w sekwencjach modyfikowanych przez wszystkie m5C-MTaz kodowane przez dany mikroorganizm;
- Wykazanie występowania funkcjonalnych i fizycznych oddziaływań pomiędzy endonukleazami Vsr *N. gonorrhoeae* FA1090, a białkami MutL i MutS. *N. gonorrhoeae* jest pierwszą wśród  $\beta$ -proteobakterii, a drugą bakterią wśród wszystkich mikroorganizmów, dla której wykazano oddziaływania pomiędzy endonukleazami Vsr a białkami pomocniczymi.

#### **Plany naukowe:**

- Zbadanie związku pomiędzy patogennością *Neisseria gonorrhoeae* a naprawą DNA, ze szczególnym uwzględnieniem stopnia zależności patogenności od systemu naprawy DNA typu *Very Short Patch repair* (VSP) (grant UMO-2014/15/B/NZ6/02514):
  - Zbadanie wpływu systemu naprawy DNA VSP na adhezję i tworzenie biofilmu przez *N. gonorrhoeae* na ludzkich komórkach nabłonkowych;
  - Zbadanie wpływu systemu naprawy DNA VSP na inwazyjność i transcytozę komórek nabłonkowych przez *N. gonorrhoeae*;
  - Określenie wpływu systemu naprawy DNA VSP na reorganizację cytoszkieletu, cytotoksyczność *N. gonorrhoeae*, wytwarzanie cytokin i szlaki sygnałowe zachodzące w komórkach nabłonkowych;
- Zbadanie roli białek wielofunkcyjnych w biologii i patogenezie *N. gonorrhoeae* (wniosek złożony w ogłoszonym przez Narodowe Centrum Nauki, konkursie OPUS 15);
- Analiza odpowiedzi immunologicznej w komórkach zainfekowanych syncytialnym wirusem oddechowym (RSV) z rodziny *Pneumoviridae* (współpraca z dr. Maciejem

Czerkiesem z Zakładu Biosystemów i Miękkiej Materii, Pracowni Modelowania w Biologii i Medycynie w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN, Warszawa).

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

### a) Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora:

#### **Charakterystyka metylotransferaz DNA *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis***

- Piekarowicz, A., Kłyż, A., Kwiatek, A., Stein, D.C. (2001). Analysis of type I restriction modification systems in the *Neisseriaceae*: genetic organization and properties of the gene products. *Mol Microbiol.*, 41, 1199-210; PMID: 11555298;
- Kwiatek, A., Kobes, M., Olejnik, K., Piekarowicz, A. (2004). DNA methyltransferases from *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 associated with mismatch nicking endonucleases. *Microbiology*, 50, 1713-22; doi: 10.1099/mic.0.27011-0;

W pierwszej pracy przedstawiono analizę genetyczną *locus* zawierającego geny systemu RM typu I NgoAV kodowanego przez *N. gonorrhoeae* FA1090. *Locus* ten obejmuje *hsdM* kodujący podjednostkę metylotransferazy, *hsdR* kodujący podjednostkę endonukleazy restrykcyjnej, *orf2* kodujący homolog DinD oraz *hsdS1* i *hsdS2* kodujące podjednostki odpowiedzialne za specyficzność. Z dwóch podjednostek odpowiedzialnych za specyficzność, tylko *hsdS1* koduje aktywne białko. Ponadto w pracy wykazano, że białka kodowane przez *hsdM* i *hsdR* wykazują wysoką homologię do systemu RM EcoR124II wskazując, że system NgoAV należy do podtypu IC systemów RM. Ustalono również specyficzność systemu RM NgoAV. System ten rozpoznaje sekwencję 5' GCAN<sub>(8)</sub>TGC 3' (N=A/T/C/G).

W drugiej z prac przedstawiono charakterystykę kodowanych przez *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis* m5C-MTaz DNA, których geny leżą w sąsiedztwie genów kodujących endonukleazy Vsr. Kodowane przez *N. meningitidis* metylotransferazy M.NmeAI i M.NmeDI są aktywne *in vitro*. Metylotransferaza M.NmeDI rozpoznaje zdegenerowaną sekwencję 5' RCCGGB 3' (R=A/G, B=G/C/T) i metyluje drugi nukleotyd w obydwu niciach rozpoznawanej sekwencji. Enzym wykazuje większe powinowactwo do hemimetylowanej zdegenerowanej sekwencji niż niezmetylowanej sekwencji. W porównaniu z innymi m5C-MTazami rozpoznającymi sekwencję 5' RCCGGY 3', M.NmeDI zawiera dodatkową domenę TRD (TRD ang. *target recognizing domain*),

odpowiedzialną za rozpoznanie sekwencji zdegenerowanej. M.MmeAI rozpoznaje sekwencję 5' CCGG 3' i modyfikuje drugą cytozynę w obydwu niciach rozpoznawanej sekwencji. Kodowane przez *N. gonorrhoeae* FA1090 homologi m5C-MTaz M.NmeAI i M.NmeDI – M.NgoAORFC713P i M.NgoAORFC703P są nieaktywne.

b) Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora:

**Wpływ ekspresji systemów restrykcji-modyfikacji na fizjologię i patogenność *Neisseria gonorrhoeae***

- **Kwiatek, A.**, Mrozek., A, Bacal, P., Piekarowicz, A., Adamczyk-Poplawska, M. (2015). Type III methyltransferase M.NgoAX from *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 regulates biofilm formation and interactions with human cells. *Front Microbiol* 6:1426; doi: 10.3389/fmicb.2015.01426;
- **Kwiatek, A.**, Bacal, P., Wasiluk, A., Trybunko, A., Adamczyk-Poplawska, M. (2014). The dam replacing gene product enhances *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 viability and biofilm formation. *Front Microbiol* 5:712; doi: 10.3389/fmicb.2014.00712;

W obu pracach badano znaczenie biologiczne zmiennych fazowo systemów RM w biologii molekularnej i fizjologii *N. gonorrhoeae*. Jedna z prac dotyczy roli systemu RM NgoAX typu III, a druga endonukleazy Drg, kodowanej przez gen *drg* (ang. *dam replacing gene*), który w toku ewolucji powstał poprzez wstawienie w *locus*, zawierający gen *dam*, innego genu. Dodatkowo zbadany został szczep, w którym gen *drg* został zastąpiony genem *dam* z *N. meningitidis* FAM18.

Inaktywacja, zarówno genu *mod* kodującego podjednostkę modyfikacyjną systemu RM NgoAX, jak i genu *drg* skutkuje zmianami w globalnym transkryptomie *N. gonorrhoeae*. Inaktywacja genu *mod* systemu RM NgoAX powoduje, co najmniej 2-krotną, zmianę ekspresji 121 genów w porównaniu do szczepu dzikiego. Wśród 83 genów o zwiększonej ekspresji są, m.in. geny kodujące białka zaangażowane w replikację i naprawę DNA lub w formowanie błony i otoczki, natomiast wśród 38 genów o obniżonej ekspresji są geny, których produkty biorą udział w wytwarzaniu energii. Inaktywacja genu *drg* prowadzi do przynajmniej 1,5-krotnej zmiany ekspresji 195 genów. Zmianie ulega głównie ekspresja genów, których produkty białkowe uczestniczą w replikacji i naprawie DNA, translacji oraz formowaniu błony i ściany komórkowej. Insercja genu *dam* w gen *drg* skutkuje zmianą ekspresji 240 genów, wśród których

najliczniejszą grupę stanowią geny kodujące białka uczestniczące w wytwarzaniu energii oraz metabolizmie aminokwasów.

Inaktywacja, zarówno genu *mod* kodującego podjednostkę modyfikacyjną systemu RM NgoAX, jak i genu *drg* skutkuje także zmianami fenotypowymi wpływając na wzrost, formowanie biofilmu i oddziaływanie z ludzkimi komórkami nabłonkowymi. Brak aktywnej metylotransferazy M.NgoAX zmniejsza adhezję oraz wzmacnia inwazyjność gonokoków, natomiast inaktywacja genu *drg* skutkuje zmniejszoną żywotnością *N. gonorrhoeae*, w konsekwencji prowadząc do zaburzeń we wzroście i tworzeniu biofilmu oraz obniżenia adhezji do komórek nabłonkowych.

Ponadto, wykazano, że gen *drg* koduje aktywną endonukleazę restrykcyjną o specyficzności G<sup>me</sup>ATC (m<sup>me</sup>A - N6-metyloadenina).

Podsumowując, w pracach wykazano, że ekspresja zarówno należącej do typu III systemów RM, metylotransferazy M.NgoAX jak i endonukleazy restrykcyjnej Drg wpływa na transkryptom oraz fenotyp *N. gonorrhoeae*. W ten sposób przeprowadzone badania potwierdziły koncepcję tzw. „*phasevarion*” czyli grupy genów, które podlegają wspólnej kontroli ekspresji poprzez zmienność fazową systemów RM oraz wykazały, że badane systemy RM zaangażowane są nie tylko w ochronę przed wnikaniem obcego DNA do komórek, ale mają także znaczenie fizjologiczne wpływając na oddziaływanie gonokoków z komórkami gospodarza i lepsze przystosowanie do zajmowanej niszy ekologicznej.

#### **Charakterystyka bakteriofaga NgoΦ6 *Neisseria gonorrhoeae* FA1090**

- Piekarowicz, A., Kłyż, A., Majchrzak, M., Szczesna, E., Piechucki, M., Kwiatek, A., Mangel, T.K., Stein, D.C. (2014). *Neisseria gonorrhoeae* filamentous phage NgoΦ6 is capable of infecting a variety of Gram-negative bacteria. *J Virol.*, 88:1002-10; doi: 10.1128/JVI.02707-13;

Bakteriofagi są kolejnym elementem horyzontalnego transferu genów, który wpływa na rearanżację genomu bakteryjnego i ewolucję mikroorganizmów. W genomie *N. gonorrhoeae* występuje kilka profagów, w tym będący prototypem gonokokowych fagów nitkowatych NgoΦ6, którego materiałem genetycznym jest jednoniciowy DNA [33].

W pracy skonstruowano i scharakteryzowano, pochodzący od faga NgoΦ6, fagmid. Uwolnione z fagmidu cząstki są infekcyjne, mogą wywoływać stan lizogenii i namnażać się nie tylko w *N. gonorrhoeae*, ale w różnorodnych taksonomicznie odległych Gram-ujemnych bakteriach należących do  $\alpha$ -proteobakterii (*Paracoccus methylutens*),

$\beta$ -proteobakterii (*Neisseria sicca*) i  $\gamma$ -proteobakterii (*E. coli*, *Haemophilus influenzae* i *Pseudomonas sp.*). Ngo $\Phi$ 6 jest pierwszym opisanym nitkowatym bakteriofagiem o szerokim spektrum gospodarza. Ponadto, w odróżnieniu od innych fagów nitkowatych, Ngo $\Phi$ 6 infekuje komórki gospodarza przez mechanizm niezależny od mniejszego białka kapsydu, a wywołanie stanu lizogenii nie wymaga obecności aktywnej profagowej integrazy.

#### **Charakterystyka metylotransferazy RNA *Campylobacter jejuni***

- Sałamaszyńska-Guz, A., Taciak, B., Kwiatek, A., Klimuszko, D. (2014). The Cj0588 protein is a *Campylobacter jejuni* RNA methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 448:298-302; doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.104;

Katalizowana przez metylotransferazy metylacja RNA jest powszechną postranskrypcyjną modyfikacją kwasu rybonukleinowego. Praca dotyczy białka Cj0588 - jednej z metylotransferaz RNA *Campylobacter jejuni*. Cj0588 jest, należąca do rodziny TlyA(I), 2'-O-metylotransferazą. Metylacja rRNA katalizowana przez Cj0588 wpływa na biologię *C. jejuni*. Obecność genu *cj0588* jest istotna dla stabilności rybosomów i właściwości *C. jejuni*. Brak białka Cj0588 powoduje nagromadzenie się rybosomalnych podjednostek 50S, zmniejszenie ilości funkcjonalnych rybosomów oraz wzrost oporności na kapreomycynę.

#### **Analiza modulacji ekspresji genu inwazyjności *Yersinia enterocolitica***

- Raczkowska, A., Brzóstkowska, M., Kwiatek, A., Bielecki, J., Brzostek, K. (2011). Modulation of *inv* gene expression by the OmpR two-component response regulator protein of *Yersinia enterocolitica*. *Folia Microbiol (Praha)*. 56, 313-9; doi: 10.1007/s12223-011-0054-9;

Inwazyjna InvA jest wczesnym czynnikiem wirulencji *Yersinia enterocolitica*. Ekspresja inwazyjności InvA w odpowiedzi na sygnały środowiskowe jest regulowana przez kilka białek, m.in. przez białko RovA.

Praca dotyczy wpływu regulacji ekspresji genu inwazyjności przez dwuskładnikowy szlak transdukcji sygnału EnvZ/OmpR, który jest zaangażowany w osmoregulację odpowiadając na zachodzące w środowisku zmiany osmolarności. EnvZ jest kinazą posiadającą osmosensoryczną domenę, natomiast białko OmpR jest białkiem regulatorowym. W pracy wstępnie zbadano znaczenie biologiczne zależnej od EnvZ/OmpR ekspresji genu *inv* kodującego inwazyjność InvA. Próba określenia wpływu

białka OmpR na pozytywne (białko RovA) i negatywne (białko H-NS, ang. *histone-like nucleoid structuring protein*) regulatory inwazy, wykazała, że białko OmpR obniża zależną od RovA aktywację inwazy. Z kolei białko RovA może aktywować ekspresję inwazy bez względu na obecność białka H-NS. Ponadto w pracy zademonstrowano, że kinaza EnvZ nie jest tylko regulatorem fosforylacji białka OmpR.

#### **Mechanizm reakcji katalizowanej przez rekombinazy tyrozynowe**

- Ma, C.H., **Kwiatek, A.**, Bolusani, S., Voziyanov, Y., Jayaram, M. (2007). Unveiling hidden catalytic contributions of the conserved His/Trp-III in tyrosine recombinases: assembly of a novel active site in Flp recombinase harboring alanine at this position. *J Mol Biol.* 368, 183 – 196; doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.022;
- Du, Q., Livshits, A., **Kwiatek, A.**, Jayaram, M., Vologodskii, A. (2007). Protein-induced local DNA bends regulate global topology of recombination products. *J Mol Biol.* 368, 170 – 182; doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.010;

Obie prace dotyczą mechanizmu reakcji katalizowanej przez rekombinazy tyrozynowe. Pierwsza z nich dotyczy aminokwasów zaangażowanych w reakcję katalityczną, druga topologii DNA ulegającego rekombinacji.

W reakcji katalitycznej przeprowadzanej przez rekombinazy tyrozynowe kluczowe znaczenie ma nie tylko tyrozyna należąca do centrum aktywnego, ale także konserwowane histydyna lub tryptofan w pozycji 330. W rekombinazach, Flp kodowanej przez 2  $\mu$ m plazmid *Saccharomyces cerevisiae* i Cre kodowanej przez bakteriofaga P1, w pozycji 330 znajduje się Trp. W pracy wskazano możliwe znaczenie biologiczne występowania Trp w tym miejscu, pomimo tego, że wymiana Trp330 na Phe zwiększa aktywność rekombinacyjną Flp. Konieczność występowania w tej pozycji Trp wynika prawdopodobnie z zaangażowania Trp330 w aktywację ciętego wiązania fosfodiesterowego i odsunięcie reszty hydroksylowej oraz wiązania wodoru, a także z charakterystycznej pozycji tej reszty aminokwasowej w strukturze kompleksów rekombinacyjnych powstających w czasie reakcji katalizowanej przez Flp. Ponadto, możliwość supresji zmiany Trp330Ala przez Ala339Met sugeruje prawdopodobny mechanizm odtwarzania miejsca aktywnego w rekombinazie Flp oraz możliwość ewolucji nowych konfiguracji centrum aktywnego rekombinaz tyrozynowych.

W wyniku działania rekombinaz tyrozynowych na superskręcony kolista DNA zawierający 2 miejsca rekombinacji powstają 2 koliste cząsteczki, które mogą być niepołączone lub połączone w katenaty. Topologiczna złożoność produktów jest bardzo

zmienna, nawet w przypadku podobnych systemów rekombinacji, a kąty zagięcia,  $\phi$ , utworzone w izolowanych miejscach rekombinacji przez wiązanie białka przed złożeniem całego kompleksu, określają topologię produktu. W pracy zbadano te zależności dla dwóch rekombinaz – Flp i Cre. Pomimo dużego podobieństwa synaps dla tych rekombinazy, działanie Cre na miejsca docelowe generuje głównie niezwiązane koła, podczas gdy Flp daje wielokrotnie połączone katenaty. Uzyskane wyniki są istotne nie tylko dla poznania mechanizmu działania rekombinaz tyrozynowych, ale także przyczyniają się do pokazania, w jaki sposób małe „maszyny” białkowe działające lokalnie na dużych cząsteczkach DNA wykorzystują właściwości swoich substratów, aby uzyskać ukierunkowane globalne zmiany w topologii.

#### 6. Dane bibliometryczne.

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku pracy z 2018 wykorzystano ostatnio dostępną wartość  $IF_{2017}$ ) - **47,01**
- Liczba punktów MNiSW za publikacje wszystkie publikacje habilitanta - **375**
- Liczba cytowań wszystkich publikacji do dnia złożenia wniosku (wg bazy WoS) - **69**
- Liczba cytowań wszystkich publikacji do dnia złożenia wniosku (wg bazy WoS), bez autocytowań - **62**
- Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy WoS) - **5**

#### 7. Bibliografia.

1. Davidsen T, Tønjum T: **Meningococcal genome dynamics**. *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**(1):11-22.
2. Ambur OH, Davidsen T, Frye SA, Balasingham SV, Lagesen K, Rognes T, Tønjum T: **Genome dynamics in major bacterial pathogens**. *FEMS Microbiol Rev* 2009, **33**(3):453-470.
3. Eisen JA, Hanawalt PC: **A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes**. *Mutat Res* 1999, **435**(3):171-213.
4. Tock MR, Dryden DT: **The biology of restriction and anti-restriction**. *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**(4):466-472.
5. Loenen WA: **Tracking EcoKI and DNA fifty years on: a golden story full of surprises**. *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(24):7059-7069.

6. Ishikawa K, Fukuda E, Kobayashi I: **Conflicts targeting epigenetic systems and their resolution by cell death: novel concepts for methyl-specific and other restriction systems.** *DNA Res* 2010, **17**(6):325-342.
7. Sibley MH, Raleigh EA: **Cassette-like variation of restriction enzyme genes in *Escherichia coli* C and relatives.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(2):522-534.
8. Vasu K, Nagaraja V: **Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2013, **77**(1):53-72.
9. Low DA, Weyand NJ, Mahan MJ: **Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence.** *Infect Immun* 2001, **69**(12):7197-7204.
10. Lindahl T: **Instability and decay of the primary structure of DNA.** *Nature* 1993, **362**(6422):709-715.
11. Bandaru B, Wyszynski M, Bhagwat AS: **HpaII methyltransferase is mutagenic in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1995, **177**(10):2950-2952.
12. Bickle TA, Krüger DH: **Biology of DNA restriction.** *Microbiol Rev* 1993, **57**(2):434-450.
13. Tsutakawa SE, Muto T, Kawate T, Jingami H, Kunishima N, Ariyoshi M, Kohda D, Nakagawa M, Morikawa K: **Crystallographic and functional studies of very short patch repair endonuclease.** *Mol Cell* 1999, **3**(5):621-628.
14. Tsutakawa SE, Jingami H, Morikawa K: **Recognition of a TG mismatch: the crystal structure of very short patch repair endonuclease in complex with a DNA duplex.** *Cell* 1999, **99**(6):615-623.
15. Tsutakawa SE, Morikawa K: **The structural basis of damaged DNA recognition and endonucleolytic cleavage for very short patch repair endonuclease.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(18):3775-3783.
16. Heinze RJ, Giron-Monzon L, Solovyova A, Elliot SL, Geisler S, Cupples CG, Connolly BA, Friedhoff P: **Physical and functional interactions between *Escherichia coli* MutL and the Vsr repair endonuclease.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(13):4453-4463.
17. Monastiriakos SK, Doiron KM, Siponen MI, Cupples CG: **Functional interactions between the MutL and Vsr proteins of *Escherichia coli* are dependent on the N-terminus of Vsr.** *DNA Repair (Amst)* 2004, **3**(6):639-647.



18. Lieb M, Rehmat S, Bhagwat AS: **Interaction of MutS and Vsr: some dominant-negative mutS mutations that disable methyladenine-directed mismatch repair are active in very-short-patch repair.** *J Bacteriol* 2001, **183**(21):6487-6490.
19. Bhagwat AS, Lieb M: **Cooperation and competition in mismatch repair: very short-patch repair and methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 2002, **44**(6):1421-1428.
20. Tapsall J: **Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*.** *CMAJ* 2009, **180**(3):268-269.
21. McCarthy PC, Sharyan A, Sheikhi Moghaddam L: **Meningococcal Vaccines: Current Status and Emerging Strategies.** *Vaccines (Basel)* 2018, **6**(1).
22. Snyder LA, Butcher SA, Saunders NJ: **Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp.** *Microbiology* 2001, **147**(Pt 8):2321-2332.
23. Elkins C, Thomas CE, Seifert HS, Sparling PF: **Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence.** *J Bacteriol* 1991, **173**(12):3911-3913.
24. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D: **REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(Database issue):D298-299.
25. Saunders NJ, Snyder LA: **The minimal mobile element.** *Microbiology* 2002, **148**(Pt 12):3756-3760.
26. Budroni S, Siena E, Dunning Hotopp JC, Seib KL, Serruto D, Nofroni C, Comanducci M, Riley DR, Daugherty SC, Angiuoli SV *et al*: ***Neisseria meningitidis* is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(11):4494-4499.
27. Claus H, Weinand H, Frosch M, Vogel U: **Identification of the hypervirulent lineages of *Neisseria meningitidis*, the ST-8 and ST-11 complexes, by using monoclonal antibodies specific to NmeDI.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(8):3873-3876.
28. Kwiatek A, Kobes M, Olejnik K, Piekarowicz A: **DNA methyltransferases from *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 associated with mismatch nicking endonucleases.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 6):1713-1722.

29. Bandaru B, Gopal J, Bhagwat AS: **Overproduction of DNA cytosine methyltransferases causes methylation and C --> T mutations at non-canonical sites.** *J Biol Chem* 1996, **271**(13):7851-7859.
30. Cohen HM, Tawfik DS, Griffiths AD: **Promiscuous methylation of non-canonical DNA sites by HaeIII methyltransferase.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(17):3880-3885.
31. Criss AK, Bonney KM, Chang RA, Duffin PM, LeCuyer BE, Seifert HS: **Mismatch correction modulates mutation frequency and pilus phase and antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*.** *J Bacteriol* 2010, **192**(1):316-325.
32. Laging M, Lindner E, Fritz HJ, Kramer W: **Repair of hydrolytic DNA deamination damage in thermophilic bacteria: cloning and characterization of a Vsr endonuclease homolog from *Bacillus stearothermophilus*.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(7):1913-1920.
33. Piekarowicz A, Majchrzak M, Kłyż A, Adamczyk-Popławska M: **Analysis of the filamentous bacteriophage genomes integrated into *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 chromosome.** *Pol J Microbiol* 2006, **55**(4):251-260.

